

DOR[®]

Órgão de Expressão Oficial da APED

Volume 12, Número 4, 2004

Volume Monotemático dedicado à
INVESTIGAÇÃO BÁSICA SOBRE DOR EM PORTUGAL

Editor convidado: **Deolinda Lima**

*Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal
Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Portugal*

Director

José Manuel Castro Lopes

Editores

Luís Agualusa
José Manuel Castro Lopes
Teresa Vaz Pato
Sílvia Vaz Serra

Sumário

Editorial	
Aquém da Clínica	3
<i>Deolinda Lima</i>	
Mensagem do Presidente da APED	4
<i>José Manuel Castro Lopes</i>	
Mecanismos Fisiopatológicos da Dor Neuropática Diabética	5
<i>Carla Morgado e Isaura Tavares</i>	
Efeitos da Activação de Receptores GABA_B do Complexo Ventrobasal Talâmico em Ratos Sujeitos a Testes de Dor Inflamatória Aguda e Crónica	11
<i>Catarina Soares Potes, Fani Lourença Neto e José Manuel Castro Lopes</i>	
A Estimulação Mecânica de Articulações Monoartríticas Induz Fosforilação das ERKs 1 e 2 na Medula Espinhal	20
<i>Célia D. Cruz, Fani Neto, José Manuel Castro Lopes, Stephen B. McMahon e Francisco Cruz</i>	
Efeito do Antagonista do Receptor de Glicina (Estricnina) no Tempo de Latência de Resposta de Neurónios da Medula Espinhal de Rato: um Estudo com Multieléctrodos	28
<i>Helder Cardoso-Cruz, Clara M. Monteiro, Deolinda Lima e Vasco Galhardo</i>	
Caracterização do Novo Composto Iodoresiniferatoxina (IRTX): Efeitos no Receptor Vanilóide.	36
<i>Ana Charrua, António Avelino, Célia D. Cruz, Francisco Cruz</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 disquete, CD, DVD, ZIP o JAZZ para a seguinte morada:

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

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

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

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

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

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

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

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



© 2004 Permanyer Portugal
Av. Duque d'Ávila, 92, 7.º E - 1050-084 Lisboa
Tel.: 21 315 60 81 Fax: 21 330 42 96
E-mail: permanyer.portugal@permanyer.com

ISSN: 0872-4814
Dep. Legal: B-17.364/2000
Ref.: 398AP044



Impresso em papel totalmente livre de cloro
Impressão: Comgrafic



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

Reservados todos os direitos.

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

Editorial

Aquém da Clínica

Deolinda Lima

Foi mais uma vez entender do corpo editorial da revista *Dor* dar a conhecer aos seus leitores, na maioria profissionais que se dedicam à assistência médica e paramédica neste domínio da saúde, um pouco do que está por detrás dos conhecimentos que governam a sua prática diária. Fá-lo trazendo à «praça pública», o mesmo é dizer a um fórum de participação alargada e diversificada, uma série de dados que, de outro modo, só se revelariam mediante busca aturada e complexa nas muitas revistas científicas internacionais que tratam do assunto. O critério foi, não tanto o de juntar o que de mais recente e relevante se produziu em termos de investigação básica no domínio da dor, mas antes o de traçar, ainda que de modo sumário e incompleto, o panorama do que a esse respeito se faz em Portugal. Importa ressaltar, no entanto, que a opção não resultou na omissão de resultados situados entre os mais significativos para o progresso deste ramo do conhecimento, dado que a investigação em dor no nosso país ocupa hoje lugar de liderança em alguns domínios.

Os trabalhos seleccionados emanam do Grupo de Morfofisiologia do Sistema Somato-Sensitivo, que dirijo com muita satisfação e cujo trabalho se desenrola na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e no IBMC. Trata-se de um grupo com uma história de cerca de 20 anos, lançado em boa hora pelas mãos do Professor Antonio Coimbra e já com algumas sementes a germinar à distância, nomeadamente na Universidade de Braga. O conjunto de resultados apresentados, não sendo exaustivo, é suficientemente diverso para deixar no leitor a percepção da

diversidade de caminhos que importa percorrer para esclarecer os mecanismos de processamento da dor. Irão saber da possibilidade de manipular receptores periféricos de neurónios aferentes primários para minorar a dor, das cascatas intracelulares activadas na sinalização de eventos nociceptivos, da reorganização de circuitos neuronais da medula espinhal quando do desenvolvimento de alodínia, da plasticidade do sistema GABAérgico talâmico na evolução para a dor crónica e dos mecanismos subjacentes à dor na diabetes.

O leitor perguntar-se-á, a propósito de muitos dos trabalhos aqui coligidos, qual a sua relevância para aquilo que motiva o seu quotidiano profissional, o alívio da dor. A resposta será em alguns casos seguramente difícil, ou, talvez melhor, pelo menos assim esperamos, adiada. É que, se em certos trabalhos de investigação lidamos já com a aplicação clínica de resultados experimentais (caso da manipulação dos receptores VR1), noutros apenas laboramos com hipóteses de trabalho que virão, eventualmente, a ter importância no tratamento da dor, enquanto noutros ainda nos limitamos a tentar responder a questões, as mais variadas, sobre o modo de funcionamento do sistema. Acreditamos, porém, que todo o esforço de compreender, por mais afastado que aparente estar de uma qualquer aplicação prática, é útil, não tanto por dar satisfação à natural ânsia de saber, mas porque todo o conhecimento acaba por, de uma forma ou outra, afectar o nosso modo de estar na vida, neste caso concreto, de tratar a dor.

Mensagem do Presidente da APED

José Manuel Castro Lopes

Tenho por hábito utilizar o número de Dezembro da revista Dor para, nesta página, fazer um balanço da actividade da APED no ano que termina.

Este ano fica marcado pelas eleições para os corpos sociais da APED. Tendo concluído um mandato em que foram atingidos praticamente todos os objectivos a que se tinha proposto, a direcção cessante, face à inexistência de candidaturas alternativas e motivada por alguns projectos inacabados ou novos, propôs-se a cumprir um segundo mandato, renovando alguns dos seus elementos. A eleição teve dois aspectos muito negativos, na minha opinião, que foram a muito baixa participação dos associados e a unanimidade da votação. Tal não nos retira legitimidade ou afecta (muito) a motivação, mas impõe como objectivo adicional deste mandato desenvolver estratégias que levem a uma maior participação dos associados nas actividades da APED, a qual deverá existir apenas e enquanto houver associados interessados em partilhar não só os objectivos mas também as acções.

Enquanto 2003 ficará na história como o ano em que a norma que equipara a dor a 5.º sinal vital foi aprovada pela Direcção Geral de Saúde (DGS), o ano de 2004 será indubitavelmente recordado como o ano em que a Competência em Medicina da Dor foi aprovada pela Ordem dos Médicos. De todas as actividades da anterior direcção da APED, estes são, de facto, os dois aspectos mais relevantes, mais consequentes e com maior impacto no futuro do combate à dor no nosso País. Mas estamos bem cientes do valor relativo que têm declarações, estatutos, normas, leis e outros «papeis». Assim, tal como temos colaborado em diversas acções de formação e sensibilização para a norma da DGS, que começam a dar os seus frutos, oferecemos já os nossos préstimos para colaborar na regulamentação da atribuição da Competência em Medicina da Dor, a qual é da exclusiva responsabilidade da Ordem dos Médicos. Mas estamos certos que a fase eleitoral que se atravessa naquela instituição irá, compreensivelmente, atrasar este processo.

Um dos marcos regulares da actividade da APED é a comemoração do Dia Nacional de Luta Contra a Dor. Era intenção da direcção de APED assinalar o 6.º Dia Nacional de Luta Contra a Dor com uma acção dedicada aos profissionais de saúde, nomeadamente um congresso que ao mesmo tempo assinalasse o fim do seu

mandato. Tal não veio a ser possível devido à realização em Lisboa de um congresso europeu de Anestesiologia alguns dias antes. Por outro lado, os condicionalismos sociopolíticos que rodearam o dia 14 de Junho deste ano (dia seguinte às eleições para o Parlamento Europeu e dois dias após o início do Campeonato Europeu de Futebol) não eram propícios à organização de qualquer evento mediático semelhante à Corrida Contra a Dor realizada nos dois anos anteriores. Assim, mantendo a ideia inicial da acção de formação, a APED associou-se à Unidade de Dor do Hospital Fernando Fonseca (Amadora-Sintra), coordenada pela Dr.ª Georgina Coucelo, na organização de uma jornada sobre dor dedicada a médicos internos, alunos do curso de medicina, enfermeiros e outros profissionais de saúde. Outras acções de comemoração chegaram ao nosso conhecimento, realizadas noutros locais do País por associados da APED, nomeadamente em Guimarães, Açores e Madeira.

O congresso da APED acabaria por se realizar em Outubro, durante a Semana Europeia Contra a Dor, em conjunto com o Clube de Anestesia Regional, pelas circunstâncias já explicadas nesta página. Os oradores convidados pela APED proferiram excelentes comunicações, de alto interesse científico, sobre temas de grande relevância para o diagnóstico e tratamento da dor. Pena foi que o número de associados da APED que estiveram presentes tenha sido tão reduzido, muito inferior ao que se verificou no último congresso da APED, realizado em Espinho em 2001.

Para além das «grandes» iniciativas, a APED continuou a apoiar diversas organizações de seus associados, manteve a participação na Comissão de Acompanhamento do Plano Nacional de Luta Contra a Dor e as suas relações com a EFIC e a IASP. A este propósito, a direcção da APED decidiu apresentar uma candidatura para que o congresso da EFIC em 2009 se realize em Lisboa. Após termos «perdido» a organização do congresso de 2006 a favor de Istanbul, por apenas 1 voto de diferença, esperamos que o próximo conselho da EFIC, a realizar em Maio de 2005, possa aprovar a nossa candidatura, em detrimento das de Oslo, Roma e Atenas.

Termino, agradecendo mais uma vez a colaboração de todos os que contribuíram para os êxitos da APED em 2004 e fazendo votos de um ano novo cheio de sucessos, pessoais, profissionais e associativos.

Artigo de revisão

Mecanismos Fisiopatológicos da Dor Neuropática Diabética

Carla Morgado^{1,2} e Isaura Tavares¹

A diabetes é uma doença crónica muito frequente em países desenvolvidos, tendo sido estimado que no ano de 2000 existiam cerca de 151 milhões de diabéticos em todo o mundo (Zimmet, et al., 2001). Mais de metade dos diabéticos desenvolve neuropatia durante os 25 anos subsequentes ao aparecimento da doença, independentemente do facto de se tratar de doentes com diabetes tipo 1 ou 2 (Galer, et al., 2000; Simmons, et al., 2002). A diabetes é, pois, uma das causas mais comuns de neuropatia em países desenvolvidos e a ela se associa elevada morbidade. A forma mais comum de neuropatia diabética é a polineuropatia simétrica periférica caracterizada pela degeneração dos nervos periféricos particularmente ao nível dos membros inferiores (Duck, et al., 1993; Podwall, et al., 2004).

A dor é um sintoma frequentemente referido pelos diabéticos. Atinge sobretudo os membros inferiores (planta do pé e calcanhares) sendo descrita como uma constante sensação de queimadura, ardor e/ou guinada (Galer, et al., 2000; Kapur, 2003; Podwall, et al., 2004). A contribuir para a gravidade do problema da dor neuropática diabética saliente-se a baixa eficácia dos analgésicos normalmente utilizados com sucesso noutros tipos de dor (Przewloki, et al., 2001). Se ainda subsistem dúvidas quanto aos mecanismos da dor neuropática em geral no caso da neuropatia diabética a falta de conhecimentos que permitam uma melhor compreensão e, conseqüentemente, uma melhor actuação é ainda mais evidente. Porém, nos últimos anos, modelos experimentais de diabetes têm permitido esclarecer alguns dos mecanismos da dor neuropática diabética. O modelo mais estudado é o de ratos diabéticos em que a hiperglicemia é induzida por administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), um agente que destrói selectivamente as células β das ilhotas de Lan-

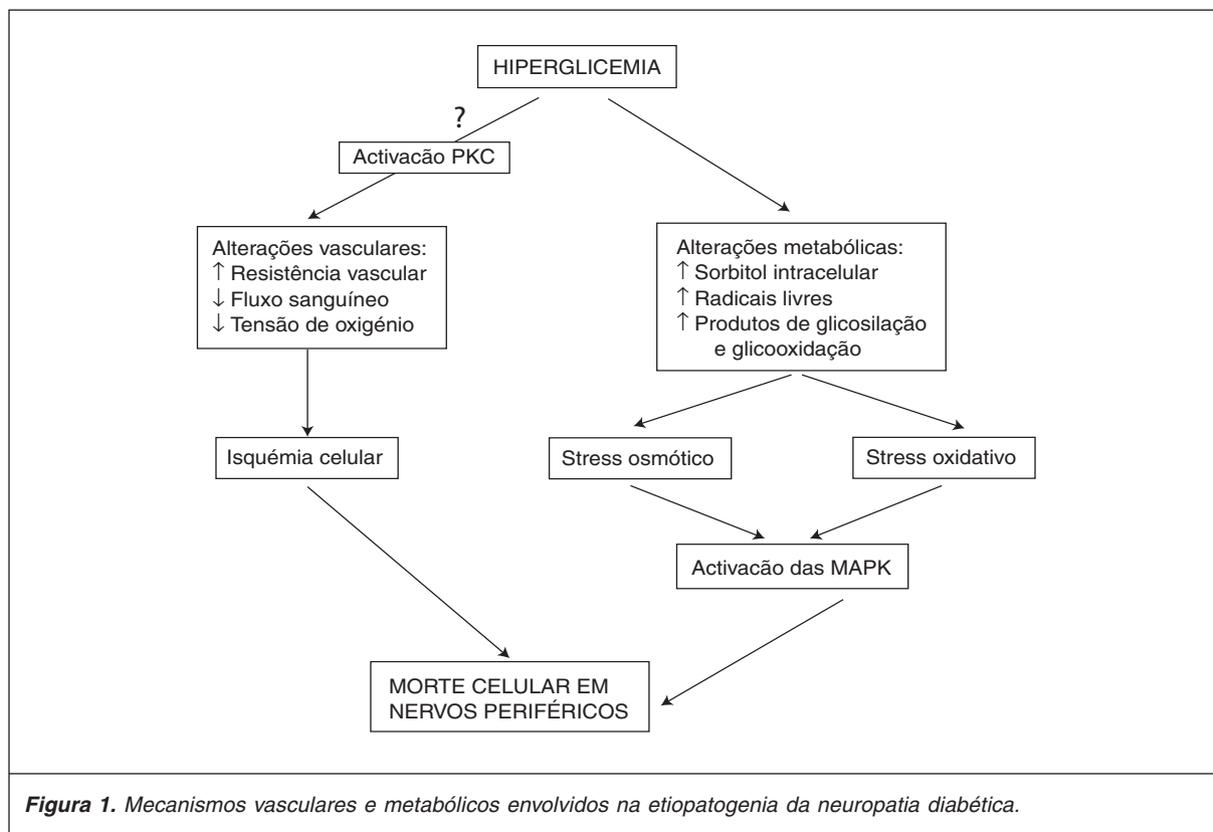
gerhans no pâncreas. Poucos dias após a administração de STZ os animais apresentam alodinia táctil, hiperalgesia a estímulos mecânicos e químicos e dor espontânea (Ahlgren, et al., 1993; Calcutt, et al., 1996; Courteix, et al., 1993). Neste trabalho efectuámos uma revisão dos mecanismos fisiopatológicos da dor neuropática diabética abordando as alterações periféricas, espinhais e supraspinhais e discutindo as implicações destes achados no tratamento farmacológico da diabetes.

Mecanismos periféricos

A hiperglicemia induz profundas alterações morfofuncionais dos nervos periféricos que incluem desmielinização segmental e paranodal, atrofia e perda axonais, degeneração walleriana e regeneração aleatória das fibras afectadas (Wright, et al., 1994), a que se acresce diminuição da velocidade de condução do impulso nervoso (Obrosova, 2003). Na origem de tais alterações parecem estar mecanismos vasculares e metabólicos resultantes da hiperglicemia (Fig. 1). Na diabetes ocorrem disfunções endoteliais dos *vasa nervorum* que levam ao aumento da resistência vascular e diminuição do fluxo sanguíneo e da tensão de oxigénio, o que, colectivamente, induz processos de isquemia/hipoxia nos nervos periféricos (Kapur, 2003; Obrosova, 2003; Wright, et al., 1994). Um dos mecanismos moleculares de diminuição do fluxo vascular é a activação da PKC (cinase proteica C), provavelmente induzida pelo aumento da glicose intracelular a nível periférico. Efectivamente, os inibidores da PKC aumentam marcadamente o fluxo sanguíneo em órgãos como a retina, e o oposto ocorre com indutores da enzima (Koya, et al., 1998). As disfunções vasculares induzem, em última análise, alterações nervosas nomeadamente por desencadarem morte celular programada – apoptose – em células dos nervos periféricos, das quais os neurónios dos gânglios raquidianos constituem exemplo paradigmático (Srinivasan, et al., 2000). A apoptose na diabetes deverá envolver disfunções do sistema mitocondrial e activação da cascata celular da apoptose por diminuição da síntese de bcl-2, uma molécula com função antiapoptótica (Srinivasan, et al., 2000). Relativamente aos mecanismos metabólicos indutores de lesão dos nervos destacam-se as alterações do metabolismo do sorbitol (Fig. 1).

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

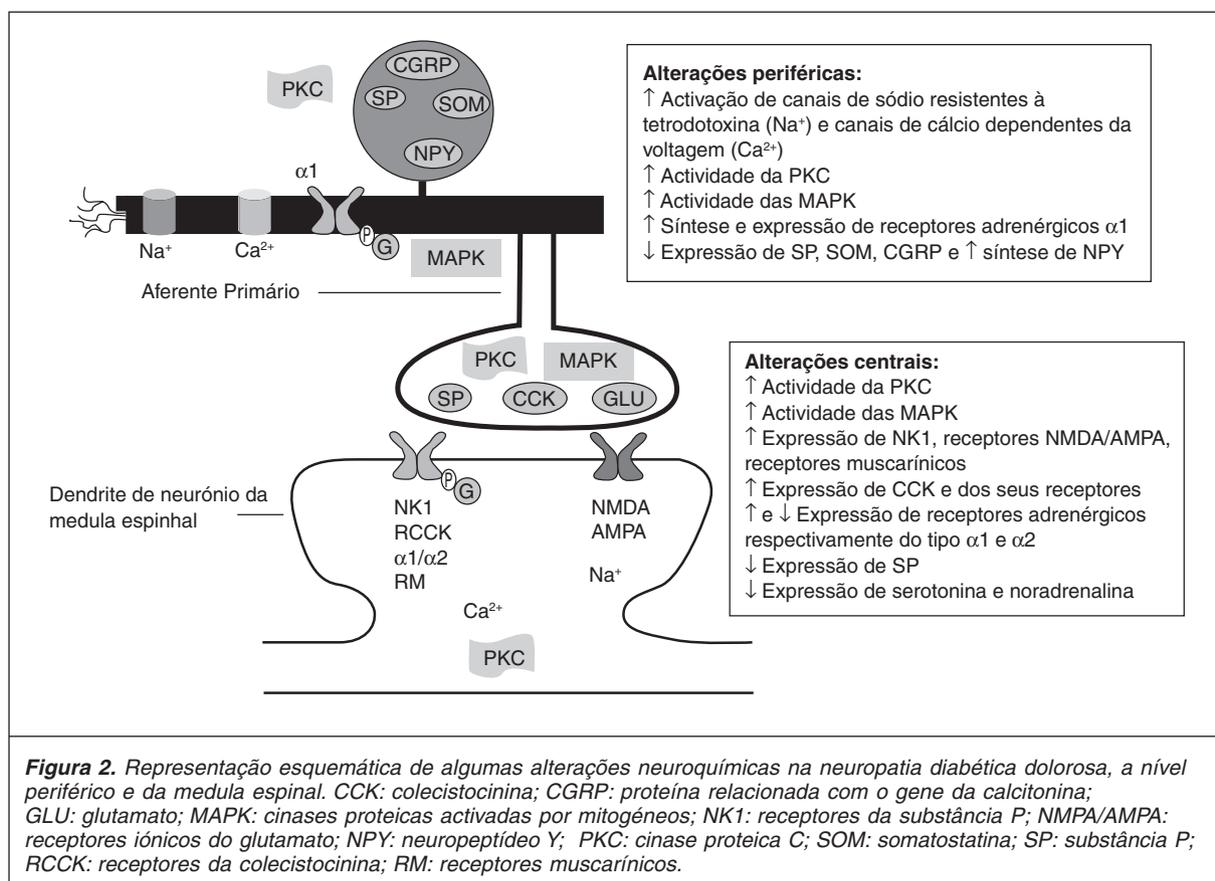
²Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação
Universidade do Porto, Portugal



Durante a diabetes há um aumento marcado da actividade da enzima reductase de aldoses com consequente acumulação de sorbitol a nível celular, o que induz *stress* osmótico e potencia a glicosilação e glicooxidação dos componentes celulares. Estes distúrbios metabólicos podem produzir *stress* oxidativo nos neurónios e células de Schwann (Kapur, 2003; Obrosova, 2003; Wright, et al., 1994). O *stress* oxidativo e osmótico e os produtos resultantes da glicosilação e glicooxidação induzem a cascata de cinases proteicas activadas por mitogénos (MAPK) e, efectivamente, os neurónios dos gânglios raquidianos de ratos diabéticos têm aumentos marcados de diversos tipos de MAPK (p. ex. ERK, MAPK p38). À activação das MAPK associa-se uma fosforilação aberrante de neurofilamentos documentada nos nervos periféricos em modelos experimentais e em humanos, o que parece acarretar perda axonal dos nervos periféricos (Ferryhough, et al., 1999; Purves, et al., 2001). A possibilidade de interferir neste mecanismo de activação das MAPK foi recentemente evidenciada ao demonstrar que, em animais tratados com STZ, a administração de inibidores da MAPK p38 previne alterações na condução nervosa a nível periférico (Agthong, et al., 2002).

As lesões dos nervos periféricos acima descritas podem afectar fibras nociceptivas, o que poderá ser um dos desencadeantes da dor na diabetes. Registos electrofisiológicos no rato diabético

demonstraram hiperexcitabilidade das fibras C e A δ associada ao aumento do número de potenciais de acção durante a estimulação sustentada, a descargas ectópicas independentes do estímulo e à diminuição da capacidade de polarização destas fibras (Alhgren, et al., 1994; Chen, et al., 2001; 2003; Khan, et al., 2002). Tais fenómenos podem ter por base alterações variadas como activação de canais iónicos nomeadamente de sódio e cálcio. Em ratos diabéticos, detectaram-se aumentos quer do número de canais de sódio resistentes à tetrodotoxina na membrana axonal dos aferentes primários quer da densidade de corrente dos mesmos. Admite-se que o aumento de corrente possa resultar directamente do aumento do número de canais mas poderá também ser devido à activação de canais inactivos em situações não patológicas (Hirade, et al., 1999). Em ratos tratados com STZ detectaram-se também alterações nos canais de cálcio dependentes da voltagem nos aferentes primários, nomeadamente aumento dos seus números e dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de algumas das subunidades que os compõem. Os aferentes primários apresentavam também maior permeabilidade ao cálcio e incremento da libertação das reservas citoplasmáticas deste ião com consequente aumento da concentração de cálcio intracelular e alterações nas vias de transdução de sinal, nomeadamente por activação de cinases proteicas (Chen, et al., 2001; Hall, et al., 2001; Yusaf, et al., 2001). Em ratos diabéticos, os bloqueadores dos



canais de cálcio induzem efeito antialodínico e analgésico (Luo, et al., 2002), o que parece justificar a eficácia dos anticonvulsivos no alívio de quadros algícos em diabéticos (Krishnan, et al., 2003).

Alguns autores admitem que na base das alterações dos canais iónicos periféricos possa estar a activação da PKC. Para além da acção directa sobre os canais iónicos, a PKC poderá actuar ainda fosforilando proteínas G a eles associadas ou outros mensageiros secundários envolvidos no processamento da dor (Hall, et al., 2001). Apesar das incertezas relativamente aos mecanismos, a influência da PKC na dor neuropática diabética é inequívoca dado que a administração periférica dos seus inibidores alivia a hiperalgesia mecânica em ratos diabéticos e diminui a disfunção da condução nervosa periférica possivelmente por redução da hiperexcitabilidade das fibras C (Ahlgren, et al., 1994).

A dor neuropática diabética parece também associar-se a alterações da expressão de neurotransmissores/receptores importantes na transmissão da dor. No que diz respeito aos neurotransmissores, os neurónios dos gânglios raquidianos apresentam diminuições dos níveis de substância P (SP), somatostatina e CGRP (Diemel, et al., 1992; 1994; Rittenhouse, et al., 1996) e aumentos de outros neurotransmissores como indicado pela maior expressão do RNAm do neuropeptídeo Y (Rittenhouse, et al., 1996) (Fig. 2). Relati-

vamente a receptores, foram detectados aumentos quer do RNAm dos receptores adrenérgicos do tipo α1 nos neurónios dos gânglios raquidianos quer dos locais de ligação dos respectivos agonistas/antagonistas (Fig. 2). O aumento daqueles receptores adrenérgicos nas membranas dos aferentes primários tem um papel importante na excitabilidade das fibras C mediante mecanismos complexos que parecem envolver activação da PKC com consequente aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Lee, et al., 2000). Inicialmente pensou-se que as alterações destes receptores se relacionavam com a activação do sistema nervoso simpático, de um modo análogo ao que acontece em modelos de neuropatia traumática, mas as alterações que ocorrem no sistema nervoso simpático durante a diabetes não parecem contribuir para a dor neuropática diabética (Ahlgren, et al., 1993).

Mecanismos centrais

Durante a neuropatia diabética os neurónios da medula espinal apresentam activação ectópica espontânea e hiperexcitabilidade, alterações que parecem afectar neurónios de largo espectro dinâmico (WDR), nomeadamente os do feixe espinotalâmico (Chen, et al., 2002; Khan, et al., 2002; Pertovaara, et al., 2001). Admite-se que tais fenómenos possam contribuir quer para

a sensibilização central quer para a cronicidade da dor.

Algumas das alterações na expressão dos neurotransmissores e receptores detectadas nos aferentes primários reflectem-se no corno dorsal da medula espinhal (Fig. 2). Ao decréscimo na expressão de SP no corno dorsal da medula espinhal de animais diabéticos associa-se um aumento dos seus receptores (receptores NK1) (Kamei, et al., 1990) que parece estar na base da antinocicepção intensa detectada após administração de CI-1021, um antagonista dos receptores NK1 que actua especificamente a nível central (Field, et al., 1998). Um outro exemplo de alterações periféricas com reprodução na medula espinhal diz respeito aos receptores adrenérgicos do tipo α 1. No corno dorsal de ratos diabéticos ocorrem aumentos acentuados da expressão destes receptores e dos locais de ligação de agonistas e antagonistas específicos (Bitar, et al., 1999; Lee, et al., 2000). A estas alterações do sistema adrenérgico na medula espinhal do rato diabético, acrescem alterações dos receptores adrenérgicos α 2. Na medula espinhal dos ratos tratados com STZ, o RNAm dos receptores α 2 diminui bem como os locais de ligação dos seus agonistas, o que deverá justificar a baixa acção antinociceptiva do respectivo agonista (clonidina) após instilação intratecal em ratos diabéticos (Bitar, et al., 1999). A complexidade das alterações dos receptores adrenérgicos tem sido correlacionada com a desregulação do metabolismo da noradrenalina na medula espinhal de ratos diabéticos cujo *turnover* e libertação está claramente diminuído. O aumento da densidade de ligação dos receptores adrenérgicos α 1 poderá representar um mecanismo compensatório para a diminuição de noradrenalina (Bitar, et al., 1999). As alterações periféricas na actividade da PKC também se reflectem a nível espinhal. A administração intratecal de indutores da actividade da PKC aumenta a libertação de aminoácidos excitatórios e SP na medula espinhal e activa os receptores NMDA. O facto destas alterações neuroquímicas interferirem no processamento da dor no rato diabético ficou demonstrado por estudos que mostram inibição da hiperalgesia e alodinia após administração intratecal de inibidores da PKC (Ohsawa, et al., 1999). Para além dos neurotransmissores/receptores cujas alterações periféricas se reflectem a nível espinhal, foram detectadas alterações adicionais noutros sistemas de transmissores e seus receptores na medula espinhal durante a neuropatia diabética. O glutamato parece estar envolvido na neuropatia diabética dado ocorrerem aumentos da densidade dos locais de ligação dos receptores NMDA e AMPA e da afinidade de ligação de antagonistas daqueles receptores na medula espinhal de ratos diabéticos (Li, et al., 1999). Tem sido sugerido que tais alterações possam reflectir um aumento da afinidade de ligação do glutamato aos respectivos receptores predispondo os neurónios espinais a hiperexcitabilidade (Li, et al., 1999). De

facto, a administração de antagonistas dos receptores NMDA têm um efeito analgésico importante em ratos diabéticos (Malcangio, et al., 1998).

Outros sistemas de neurotransmissores/receptores alterados na medula de ratos diabéticos têm sido estudados na perspectiva das suas interacções com neuroagentes importantes na transmissão dolorosa como o ácido γ -aminobutírico (GABA) e os opióides. Os locais de ligação e a afinidade de ligação dos receptores muscarínicos aumentam na medula de ratos diabéticos e a administração intratecal de agonistas dos receptores muscarínicos induz antinocicepção. Este fenómeno parece envolver uma diminuição da libertação de glutamato a partir dos terminais dos aferentes primários na medula espinhal com intervenção do sistema espinhal GABAérgico. A activação dos receptores muscarínicos induz libertação de GABA que actua pré-sinápticamente impedindo a libertação de glutamato. A intervenção do GABA neste processo é evidenciada pela inibição do efeito antinociceptivo dos agonistas muscarínicos quando se administram antagonistas dos receptores GABA_B (Chen, et al., 2003). Um outro neurotransmissor cuja alteração durante a neuropatia diabética afecta directamente outros sistemas de transmissores é a colecistocinina (CCK) dado estar associada à resistência da dor neuropática diabética aos opióides. De facto, a administração concomitante de antagonistas de CCK e agonistas opióides apresenta um efeito analgésico maior do que quando se procede a administração isolada de cada um deles. A acção da CCK está ademais exacerbada na medula de ratos diabéticos dado que a administração intratecal de antagonistas dos seus receptores exerce um efeito antinociceptivo proporcionalmente maior do que em ratos normais (Coudoré-Civiale, et al., 2000; Kamei, et al., 2001).

Na continuação da descrição das alterações dos neurotransmissores/receptores na medula espinhal durante a neuropatia diabética, têm vindo a desenhar-se novos rumos de investigação para o futuro. A importância dos receptores vanilóides (TRPV1) foi sugerida com base na observação de que a administração intratecal de soro anti-TRPV1 reverte a hiperalgesia e alodinia observada nestes animais (Kamei, et al., 2001). O papel das MAPK no desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia na dor neuropática diabética também tem sido discutido após ter sido detectado aumento da actividade das MAPK na medula espinhal e bloqueio da alodinia após administração intratecal de inibidores destas proteínas em ratos tratados com STZ (Ciuella, et al., 2003; Sweitzer, et al., 2004).

A nível supraspinal deverão ocorrer alterações neuroquímicas e anatómicas complexas durante a neuropatia diabética. Porém, de um modo análogo ao que acontece com outros tipos de dor crónica (inflamatória e neuropática), só muito recentemente se tem abordado este tema em par-

ricular no que respeita às alterações do sistema supraspinal endógeno de controlo da dor. Os dois neurotransmissores mais relevantes na acção inibitória descendente – serotonina e noradrenalina – encontram-se alterados na neuropatia diabética dolorosa. No córtex cerebral e bolbo raquidiano de ratos tratados com STZ ocorre diminuição da síntese e concentração de serotonina (Manjarrez-Gutiérrez, et al., 2000; Sandrini, et al., 1997; Souvovong, et al., 2004) e aumento da densidade dos respectivos receptores (Sandrini, et al., 1997; Sumiyoshi, et al., 1997). No bolbo raquidiano destes animais, a concentração de noradrenalina está diminuída (Ramakrishnan, et al., 1995). Estes dados sugerem que a neuropatia diabética pode estar associada a uma modulação descendente inibitória da dor menos eficaz. A utilidade dos antidepressivos inibidores da recaptção da serotonina ou da serotonina/noradrenalina, que levam a um aumento de concentração destes neurotransmissores nas fendas sinápticas, poderá decorrer da reposição das acções inibitórias do sistema (McQuay, et al., 1996; Sindrup, et al., 1999). Porém é ainda pouco claro quais as áreas supraspinais envolvidas no fenómeno. Efectivamente, o envolvimento de sistemas de modulação clássicos como os do núcleo do rafe e formação reticular adjacente, repetidamente demonstrado na dor neuropática por traumatismo periférico (Ma, et al., 1999; Pertovaara, et al., 1996; Porreca, et al., 2002; Wei, et al., 1999), não parece ocorrer na neuropatia diabética (Pertovaara, et al., 2001).

Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico da dor provocada por neuropatias incluindo a diabética é frequentemente insatisfatório dada a baixa eficácia de substâncias como as substâncias opióides e os anti-inflamatórios não esteróides. Algumas das causas da ineficácia dos opióides no tratamento da dor neuropática foram abordadas neste trabalho como, por exemplo, a degeneração de fibras C com perda dos respectivos receptores de membrana (Chen, et al., 2002) e o aumento da expressão espinal de CCK e do seu antagonismo no efeito antinociceptivo dos opióides (Coudoré-Civiale, et al., 2000). Curiosamente, tal antagonismo da CCK na analgesia por opióides parece estender-se a níveis mais altos do neurónio, tendo sido já detectados aumentos do RNAm daquela substância no encéfalo de ratos diabéticos (Kamei, et al., 2001).

Outros fármacos abordados interferem sobre receptores do GABA e do glutamato. Tal como noutras neuropatias, o efeito antinociceptivo do baclofeno, agonista dos receptores GABA_B, é muito baixo, sendo necessárias doses elevadas para a obtenção daquele efeito, com as consequentes acções laterais adversas (Calcutt, et al., 1997; Malgancio, et al., 1998). Os antagonistas dos receptores NMDA do glutamato mostraram alguma eficácia na diminuição de hiperalgésia e alodinia

na neuropatia diabética dolorosa mas o carácter ubiqüitário do glutamato impede, obviamente, abordagens farmacológicas mais generalizadas (Calcutt, et al., 1997; Malgancio, et al., 1998). Mais recentemente abordou-se a utilidade de inibidores das MAPK na dor neuropática (Sweitzer, et al., 2004), com resultados promissores que merecem estudos futuros mais detalhados.

Actualmente, o tratamento farmacológico mais eficaz na neuropatia diabética dolorosa consiste na administração oral de fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes/antiepilépticos. Relativamente aos antidepressivos, os princípios activos que demonstraram maior eficácia nos ensaios clínicos com indivíduos diabéticos foram a imipramina e a amitriptilina (inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina), verificando-se uma eficácia mais reduzida para a desipramina (inibidor selectivo da recaptção da noradrenalina) e para a paroxetina ou fluoxetina (inibidores selectivos da recaptção de serotonina). Ensaios clínicos com substâncias anticonvulsivantes, como o mexiletina, fenitoína, carbamazepina, oxcarbazepina e gabapentina apresentaram bons resultados no alívio da dor de indivíduos diabéticos (Krishnan, et al., 2003; McQuay, et al., 1996; Sindrup, et al., 1999). A aplicação tópica de capsaicina também apresentou efeitos significativos em 3 dos 5 ensaios clínicos efectuados com indivíduos afectados por neuropatia diabética dolorosa (Sindrup, et al., 1999). A aplicação tópica ou utilização de pensos de lidocaína é a menos utilizada, existindo poucos ensaios clínicos que atestem a sua eficácia (Krishnan, et al., 2003).

Em resumo, alguns dos mecanismos fisiológicos da dor neuropática diabética permanecem pouco compreendidos apesar dos estudos efectuados terem mostrado algumas semelhanças com a fisiopatologia de neuropatias provocadas por traumatismo dos nervos periféricos. Importa continuar os estudos particularmente no que respeita aos mecanismos centrais com particular destaque na acção do sistema supraspinal endógeno de controlo da dor.

Bibliografia

- Agthong S, Tomlinson DR. Inhibition of p38 MAP kinase corrects biochemical and neurological deficits in experimental diabetic neuropathy. *Ann NY Acad Sci* 2002;973:359-62.
- Ahlgren SC, Levine JD. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin diabetic rats. *Neuroscience* 1993;52:1049-55.
- Ahlgren SC, Levine JD. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin diabetic rats is not sympathetically maintained. *Brain Res* 1993;616:171-5.
- Ahlgren SC, Levine JD. Protein kinase C inhibitors decrease hyperalgesia and C-fiber hyperexcitability in the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol* 1994;72:684-92.
- Bitar MS, Bajic KT, Farook T, Thomas MI, Pilcher C. Spinal cord noradrenergic dynamics in diabetic and hypercortisolaemic states. *Brain Res* 1999;830:1-9.
- Calcutt NA, Chaplan SR. Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1997;122:1478-82.
- Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 1996;68:293-9.
- Chen SR, Pan HL. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol* 2002;87:2726-33.

- Chen SR, Pan HL. Spinal GABA_B receptors mediate antinociceptive actions of cholinergic agents in normal and diabetic rats. *Brain Res* 2003; 965:67-74.
- Chen SR, Pan HL. Up-regulation of spinal muscarinic receptors and increased antinociceptive effect of intrathecal muscarine in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Therap* 2003;307:676-81.
- Chen SR, Sweigart KL, Lakoski JM, Pan HL. Functional μ opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats. *Anesthesiology* 2002;97:1602-8.
- Chen X, Levina JD. Altered temporal pattern of mechanically evoked C-fiber activity in a model of diabetic neuropathy in the rat. *Neuroscience* 2003;121:1007-15.
- Chen X, Levina JD. Hyper-responsivity in a subset of C-fiber nociceptors in a model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Neuroscience* 2001;102:185-92.
- Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S, Gonzalez MI, Pinnock RD, Lee K. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2003;138:751-6.
- Coudoré-Civiale MA, Courteix C, Fialip J, Boucher M, Eschalié A. Spinal effect of the cholecystokinin-B receptor antagonist CI-988 on hyperalgesia, allodynia and morphine-induced analgesia in diabetic and mononeuropathic rats. *Pain* 2000;88:15-22.
- Courteix C, Eschalié E, Lavarenne J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 1993;53:81-8.
- Diemel LT, Brewster WJ, Fernyhough P, Tomlinson DR. Expression of neuropeptides in experimental diabetes; effects of treatment with nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor. *Mol Brain Res* 1994;21:171-5.
- Diemel LT, Stevens EJ, Willars GB, Tomlinson DR. Depletion of substance P and calcitonin gene-related peptide in sciatic nerve of rats with experimental diabetes; effects of insulin and aldose reductase inhibition. *Neurosci Lett* 1992;137:253-6.
- Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JZ. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy in a population-based cohort. The Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993;43:817-24.
- Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, et al. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* 1999;48:881-9.
- Field M, McCleary S, Boden P, Suman-Chauhan N, Hughes J, Singh L. Involvement of the central tachykinin NK₁ receptor during maintenance of mechanical hypersensitivity induced by diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Therap* 1998;285:1226-32.
- Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description and quality of life. *Diabetes Res Pract* 2000;47:123-8.
- Hall KE, Liu J, Sima A, Wiley JW. Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rats with diabetic neuropathy. *J Neurophysiol* 2001;86:760-70.
- Hirade M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, Kikkawa R, Kitasato H. Tetrodotoxin-resistant sodium channels of dorsal root ganglion neurons are readily activated in diabetic rats. *Neuroscience* 1999;90:933-9.
- Kamei J, Ogawa M, Kasuya Y. Development of supersensitivity to substance P in the spinal cord of the streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;35:473-5.
- Kamei J, Zishida K. The role of spinal cholecystokinin B receptors in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Brain Res* 2001;892:370-5.
- Kamei J, Zushida K, Morita K, Sasaki M, Tanaka S. Role of vanilloid VR1 receptor in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2001;422:83-6.
- Kapur D. Neuropathic pain and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19:9-15.
- Khan GM, Chen SR, Pan HL. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience* 2002;114: 291-9.
- Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47:859-66.
- Krishnan S, Rayman G. New treatments for diabetic neuropathy: symptomatic treatments. *Curr Diab Reports* 2003;3:459-67.
- Lee YH, Ryu TG, Park SJ. Alpha-1-adrenoceptors involvement in painful diabetic neuropathy: a role in allodynia. *Neuroreport* 2000;11: 1417-20.
- Li N, Young MM, Bailey CJ, Smith ME. NMDA and AMPA glutamate receptor subtypes in the thoracic spinal cord in lean and obese-diabetic *ob/ob* mice. *Brain Res* 1999;849:34-44.
- Luo ZD, Calcult NA, Higuera ES, et al. Injury type-specific calcium channel $\alpha_2\delta_1$ subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. *J Pharmacol Exp Therap* 2002;303:1199-205.
- Ma W, Bisby MA. Ultrastructural localization of increased neuropeptide immunoreactivity in the axons and cells of the gracile nucleus following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience* 1999;93:335-48.
- Malcangio M, Tomlinson DR. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain* 1998;76:151-7.
- Manjarrez-Gutiérrez G, Rocío JR, Bueno-Santoyo S, González-Ramírez M, Hernández J. Changes in brain serotonin biosynthesis in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin: effect of insulin treatment. *Rev Invest Clin* 2000;52:509-16.
- McQuay HJ, Tramer M, Nye BA, Carrol D, Wiffen PJ, Moore RA. A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 1996; 68:217-27.
- Obrosova IG. Update on the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Curr Diab Reports* 2003;3:439-45.
- Ohsawa M, Kamei J. Possible involvement of spinal protein kinase C in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 1999;372:221-8.
- Pertovaara A, Wei H, Hamalainen MM. Lidocaine in the rostroventromedial medulla and the periaqueductal gray attenuates allodynia in neuropathic pain. *Neurosci Lett* 1996;218:127-30.
- Pertovaara A, Wei H, Kalmari J, Ruotsalainen M. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. *Exp Neurol* 2001;167:425-34.
- Podwall D, Gooch C. Diabetic neuropathy: clinical features, etiology and therapy. *Curr Neurol Neurosci Report* 2004;4:55-61.
- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 2002;25:319-25.
- Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 2001; 429:79-91.
- Purves T, Middlemas A, Agthong S, et al. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J* 2001; 15:2508-14.
- Ramakrishnan R, Namasivayam A. Norepinephrine and epinephrine levels in the brain of alloxan diabetic rats. *Neurosci Lett* 1995;186:200-2.
- Rittenhouse PA, Marchand JE, Chen J, Kream RM, Leeman S. Streptozotocin-induced diabetes is associated with altered expression of peptide-encoding mRNAs in rat sensory neurons. *Peptides* 1996;17: 1017-22.
- Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the rat brain. *Life Sci* 1997;60:1393-7.
- Simmons Z, Feldman E. Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 2002;15:595-603.
- Sindrup SH, Jensen RS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanisms of drug action. *Pain* 1999;83:389-400.
- Sounvoravong S, Nakashima M, Wada M, Nakashima K. Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2004;484:217-23.
- Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy. Evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2000;49:1932-8.
- Sumiyoshi T, Ichikawa I, Meltzer HY. The effect of streptozotocin-induced diabetes on dopamine 2, serotonin 1A and serotonin 2A receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacol* 1997;16:183-90.
- Sweitzer SM, Medicherla S, Almirez R, et al. Antinociceptive action of a p38 α MAPK inhibitor, SD-282, in a diabetic neuropathy model. *Pain* 2004;109:409-19.
- Wei H, Pertovaara A. MK-801, an NMDA receptor antagonist, in the rostroventromedial medulla attenuates development of neuropathic symptoms in the rat. *Neuroreport* 1999;10:2933-7.
- Wright RA, Nukada H. Vascular and metabolic factors in the pathogenesis of experimental diabetic neuropathy in mature rats. *Brain* 1994;117: 1395-407.
- Yusaf SP, Goodman J, González IM, et al. Streptozotocin-induced neuropathy is associated with altered expression of voltage-gated calcium channel subunit mRNAs in rat dorsal root ganglion neurones. *Bioch Bioph Res Comm* 2001;289:402-6.
- Zimmet P, Alberti KGM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414:782-6.

Artigo original

Efeitos da Activação de Receptores GABA_B do Complexo Ventrobasal Talâmico em Ratos Sujeitos a Testes de Dor Inflamatória Aguda e Crónica

Catarina Soares Potes, Fani Lourença Neto e José Manuel Castro Lopes

Resumo

Estudos anteriores sugeriram que em núcleos talâmicos de transmissão, tais como os do complexo ventrobasal (VB), os receptores GABA_B estão envolvidos na modulação da actividade neuronal, em resposta a estímulos noxios crónicos. Contudo, não se conhece o efeito da sua activação numa condição como a dor aguda ou crónica de origem inflamatória. Esse efeito foi estudado no presente trabalho, através da análise da acção do baclofeno, um agonista específico dos receptores GABA_B, injectado por estereotaxia no VB, sobre dois testes comportamentais de dor: o teste do formol (dor aguda) e o teste de flexão do tornozelo em animais monoartríticos (dor crónica).

Os animais foram injectados com 2,5 µl de soro fisiológico (controlos) ou com 2,5 µl de baclofeno na concentração 350 ng/µl. No teste do formol, os animais controlo apresentaram comportamentos relacionados com a dor associada às fases 1 e 2 do teste. Pelo contrário, os ratos injectados com baclofeno (2,5 µl, 350 ng/µl) demonstraram um abaixamento estatisticamente significativo de todos os comportamentos associados à dor. No teste de flexão do tornozelo utilizaram-se grupos de ratos com 2, 4 e 14 dias de monoartrite. As pontuações do teste de flexão do tornozelo nos animais controlo mantiveram-se próximas do máximo (pontuação 20) e praticamente constantes ao longo de todo o teste, indicando a presença de alodínia. Observou-se o mesmo em ratos com 2 dias de MA injectados com baclofeno. Contrariamente, nos ratos com 14 dias de MA a injeção de baclofeno foi eficaz na redução da alodínia verificando-se uma descida das pontuações do teste de flexão do tornozelo a valores mínimos de 6,3 ± 1,6 aos 15 min pós-injeção. Cinquenta minutos após a injeção de baclofeno as pontuações começaram a aumentar até atingirem o valor inicial. Testes motores demonstraram que a injeção de baclofeno (2,5 µl, 350 ng/µl) não afectava significativamente a capacidade motora dos animais.

Os resultados deste estudo demonstram que a activação dos receptores GABA_B pelo baclofeno inibe os neurónios do VB de ratos MA diminuindo a alodínia. Adicionalmente, a resposta é dependente do tempo de inflamação, sugerindo que os neurónios VB talâmicos estarão num estado excitatório diferente ao longo da doença. A activação dos receptores GABA_B do VB tem também um efeito analgésico em animais normais com dor aguda, tal como foi observado no teste do formol. Concluindo, foi demonstrado um papel específico para os receptores GABA_B do VB no processamento da dor aguda e crónica inflamatória.

Palavras-chave: GABA_B. Baclofeno. Tálamo. Dor crónica inflamatória. Dor aguda. Monoartrite. Teste do formol.

Correspondência

Introdução

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o neurotransmissor mais importante do sistema nervoso central (SNC), onde desempenha funções fundamentais na regulação da actividade neuronal, na plasticidade e na patogénese. O GABA actua em dois tipos de receptores, o ionotrópico GABA_A e o metabotrópico GABA_B (Bowery, 1999).

Os receptores GABA_B medeiam respostas inibitórias lentas e duradouras actuando por inibição pré-sináptica de canais de Ca²⁺ activados pela voltagem, inibindo a libertação de neurotransmissores excitatórios, e/ou através de potenciais pós-sinápticos inibitórios, por activação de canais de K⁺, inibindo a excitabilidade neuronal (Bowery, 1999; Misgeld, et al., 1995). Existem alguns ligandos para este receptor (Humenuik, et al., 1995; Bowery, 1999), sendo o baclofeno o agonista mais utilizado. Acredita-se que a baixas concentrações o baclofeno actua pré-sinápticamente de modo a diminuir a libertação de neurotransmissores via hetero e auto-receptores, enquanto que a altas concentrações deverá alterar a excitabilidade membranar pós-sináptica por indução de uma hiperpolarização membranar (Yamada, et al., 1999).

Diversos estudos electrofisiológicos e farmacológicos têm implicado os receptores GABA_B em mecanismos de processamento da dor (Dirig e Yaksh, 1995; Lin, et al., 1996; Green e Dickenson, 1997). A monoartrite (MA) é um modelo bem definido de dor crónica inflamatória, a qual é induzida por injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund (CFA) na articulação tibiotársica da pata traseira de ratos (Butler, et al., 1992). Os ratos com monoartrite crónica apresentam sinais de hiperalgesia e alodínia que são quantificáveis pelo teste de flexão do tornozelo (Butler e Weil-Fugazza, 1994). Neste modelo de dor, foram efectuados estudos de ligação onde se verificaram alterações do receptor GABA_B na medula espinhal ipsilateral à inflamação periférica (Castro-Lopes, et al., 1995). A nível supra-espinhal, observou-se uma diminuição do ARNm do receptor GABA_B1b no complexo ventrobasal talâmico (VB) contralateral à pata artrítica de ratos MA (Ferreira-Gomes, et al., 2004), sugerindo que os receptores GABA_B deverão estar envolvidos na modulação da actividade neuronal em núcleos de transmissão talâmicos em resposta a estímulos nóxicos crónicos. O VB compreende os núcleos de transmissão ventro postero-medial (VPM) e ventro postero-lateral (VPL), que projectam maioritariamente para o córtex cerebral somatossensorial, sendo por isso associados à componente sensorial-discriminativa da dor (Guilbaud, et al., 1994; Price, 1995). Contudo, o efeito da sua activação nesta condição de dor crónica inflamatória não é conhecido.

Torna-se também importante verificar o papel da activação dos receptores GABA_B do VB de ratos normais sujeitos a um estímulo nóxico agu-

do, de forma a poder comparar com o efeito verificado num estado de dor crónica. O teste de formol é um modelo fiável de dor animal induzido por uma lesão aguda do tecido (Tjølsen, et al., 1992). Os comportamentos nociceptivos induzidos pelo formol são quantificáveis e apresentam duas fases: uma primeira fase (dor aguda) que dura aproximadamente 5 min e uma fase tardia, que começa 15-20 min após injeção durando 20 a 40 min. Esta última (fase inflamatória), que também é denominada de fase tónica ou crónica, é dependente da inflamação local e/ou de alterações prolongadas no SNC (Tjølsen, et al., 1992).

No presente estudo, foram efectuadas injeções estereotáxicas de baclofeno no VB de ratos, de forma a avaliar os efeitos da activação do receptor GABA_B nesta região talâmica em animais com hiperalgesia e alodínia, através dos testes de nocicepção de flexão do tornozelo e do formol.

Materiais e métodos

Animais utilizados e indução da inflamação crónica

Utilizaram-se ratos Wistar machos (IBMC, Porto, Portugal) pesando entre 270 e 310 g. Para o teste de flexão do tornozelo foram utilizados ratos com 2, 4 e 14 dias de MA. A MA foi induzida por injeção intracapsular de 50 μ l de adjuvante completo de Freund (CFA) na articulação tibiotársica esquerda sob breve anestesia volátil (isofluorano), como já descrito (Butler, et al., 1992). De forma a minimizar comportamentos motivados por medo, os animais foram habituados ao experimenter durante vários dias antes da injeção de CFA e durante a evolução da MA, até à execução dos testes comportamentais. A evolução da reacção inflamatória foi monitorizada todos os dias utilizando uma escala subjectiva que toma em consideração os sinais de inflamação local e o comportamento motor do animal, onde 0 significa que não há sinais de inflamação e 4 indica que há uma inflamação grave com repercussões na actividade motora do animal (Castro-Lopes, et al., 1992). Todos os animais que desenvolveram sinais de poliartrite foram excluídos dos testes comportamentais subsequentes. Em todas as experiências foram seguidas as normas éticas para o estudo de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983) bem como a directiva 86/609/EEC da União Europeia.

Implante da cânula guia

No grupo de 14 dias de MA, foi implantada cirurgicamente uma cânula guia 7 dias após injeção de CFA, utilizando o mesmo procedimento já descrito anteriormente (Neto e Castro-Lopes, 2000). Os ratos dos grupos de 2 e 4 dias de MA foram operados 5 e 3 dias antes da injeção de CFA, respectivamente, e os ratos para o teste do formol 7 dias antes da execução do teste. Os animais foram anestesiados com uma mistura de hidroclorato de quetamina (Ketalar,

60 mg/kg) e hidrocloreto de medetomidina (Domitor, 0,25 mg/kg) e o crânio foi fixado a um aparelho de estereotaxia. A cânula guia (Neolus 23 gauge, Terumo, Belgium) foi implantada 3-5 mm dorsalmente ao local de injeção no VB contralateral à articulação artrítica, seguindo as coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (1998), e fixada ao crânio com dois parafusos pequenos de aço inoxidável e cimento de dentista.

Injecções intracerebrais

Todos os ratos foram injectados no VB contralateral com 2,5 µl de soro fisiológico (grupos controlo) ou baclofeno, através de uma agulha (B-D Micro-Fine + 29 gauge, Becton Dickinson, France) inserida na cânula guia.

Nos ratos monoartríticos, os grupos controlo foram injectados com 2,5 µl de soro fisiológico a pH 7,6 e foram divididos em três grupos: 2 dias (2 d) MA, n = 5; 4 dias (4 d) MA, n = 5; 14 dias (14 d) MA, n = 4. Os ratos injectados com baclofeno à concentração 350 ng/µl (preparada com água estéril para injectáveis) foram igualmente divididos em três grupos (2 d MA, n = 6; 4 d MA, n = 4 e 14 d MA, n = 6). Uma dose de 200 ng/µl baclofeno foi administrada a outro grupo de ratos com 14 dias de MA (n = 4). Para o teste do formol, foram injectados 2,5 µl de soro fisiológico (controlo, n = 6) ou baclofeno (350 ng/µl, n = 6) no VB dez minutos antes da injeção de formol (ver em Avaliação comportamental – Teste do formol). Todas as soluções foram administradas ao longo de um período de 60 s. A selecção da concentração de baclofeno a testar e o melhor volume a injectar no VB foram estimadas através de testes preliminares e pesquisa bibliográfica (Ulrich e Huguenard, 1996; Le Feuvre, et al., 1997; Mahmoudi e Zarrindast, 2002).

Avaliação comportamental – Teste do formol

O teste do formol (Tjølsen, et al., 1991, 1992; Almeida, et al., 1999) foi efectuado sete dias após o implante da cânula em ratos normais. Os animais foram manuseados na câmara de teste durante 30 min todos os dias ao longo da semana que precedeu o teste do formol, e foram colocados nessa mesma câmara uma hora antes da experiência ser iniciada, de forma a diminuir a variabilidade nos comportamentos evocados pelo formol (Tjølsen, et al., 1992).

Os animais controlo e injectados com baclofeno foram processados em paralelo em todas as séries experimentais. Dez minutos antes do teste do formol os ratos foram injectados com 2,5 µl de soro fisiológico (controlo, n = 6) ou baclofeno (350 ng/µl, n = 6) no VB contralateral à pata injectada. Todos os ratos foram injectados subcutaneamente com 50 µl de formol neutro a 5%, na face dorsal da pata esquerda traseira. Os animais foram devolvidos à câmara de teste imediatamente após injeção

e o comportamento foi gravado em vídeo durante 60 min. Subsequentemente, as actividades dos ratos foram classificadas e analisadas através de um programa de computador produzido para este efeito (criado por A. Tjølsen e K. Hole). Foram analisadas as seguintes categorias de comportamento (Almeida, et al., 1999): 1) tempo dispendido em actividades relacionadas com a dor focalizada; 2) tempo dispendido em actividades relacionadas com a dor não focalizada, e 3) número de reflexos involuntários da pata injectada ou dos quadris traseiros (*jerks* da pata). O comportamento de dor desenvolvido pelos animais foi avaliado pelo tempo dispendido na categoria 1 (comportamento focalizado de dor) e 1 mais 2 (comportamento total de dor) durante 12 períodos sucessivos de 5 min cada, e também pelo número de *jerks* da pata efectuados nos mesmos períodos (Almeida, et al., 1999).

Avaliação comportamental – Teste de flexão do tornozelo

O teste de flexão do tornozelo para ratos MA (Butler e Weil-Fugazza, 1994) foi efectuado imediatamente antes da injeção e a dezassete tempos diferentes nos 90 min seguintes (2, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 e 90 min). Este teste foi efectuado por um investigador que desconhecia qual a solução injectada, e consiste na avaliação do número de vocalizações e/ou reacções de luta produzidos pelo rato em resposta a cinco flexões e extensões alternadas do tornozelo feitas pelo experimentador. A pontuação do teste é determinada por meio de uma escala de avaliação, onde pontuações elevadas (2 pontos) são atribuídas a vocalizações em resposta a manipulações moderadas (flexão ou extensão) da articulação inflamada, e pontuações baixas (0 pontos) são dadas à ausência total das respostas avaliadas. A soma das reacções registadas a cada flexão ou extensão, com valor máximo de 20 pontos, dá a pontuação do teste de flexão do tornozelo, indicativa do grau de alodínia e hiperalgesia do animal.

Avaliação comportamental – Função motora

Foram efectuados vários testes de avaliação da função motora (reflexo *placing/stepping*, reflexo *righting* [Dirig e Yaksh, 1995; Euler, et al., 1996; Whishaw, et al., 1999], teste *positional sense* [White, et al., 1989], reflexo *withdrawal*, reflexo *toe spread* [Euler, et al., 1996]) num grupo separado de ratos (n = 10), os quais foram primeiro injectados com soro fisiológico e posteriormente com 350 ng/µl de baclofeno no VB, tal como descrito anteriormente. Estes testes visaram verificar se o efeito analgésico observado nos ratos injectados com esta dose de baclofeno, aquando da execução dos testes de formol e de flexão do tornozelo, não seria consequência de um efeito sobre a actividade motora. Os ratos foram primeiro testados com uma injeção de soro fisiológico de forma a estabelecer o grau de desempenho assumido como normal nestes animais, bem como de maneira a mini-

mizar diferenças interindividuais na execução dos testes. O desempenho do rato foi classificado como (-) se não possuísse reflexo, (+) se tivesse um reflexo diminuído e (++) se o reflexo era normal.

Foram ainda efectuados outros testes de avaliação motora: o teste de natação (Euler, et al., 1996), o teste de tónus muscular (White, et al., 1989), a observação da postura e ambulação do animal (Dirig e Yaksh, 1995) e uma variação do teste de elevação da cauda (Whishaw, et al., 1999), no qual a cauda dos ratos foi elevada de modo a que as patas traseiras do animal perdessem o contacto com o chão, obrigando o rato a andar para a frente. A escala de classificação utilizada nestes testes foi (-) se o animal não conseguisse completar o teste e (+) se conseguisse completar o teste com sucesso. No caso do teste ser completado com alguma dificuldade por parte do rato o seu desempenho foi classificado de (\pm). Finalmente, foi efectuado uma adaptação do teste de *hanging* usado por Yang, et al. (2004). Para este teste foi utilizado um filamento metálico com 60 cm de comprimento suspenso a 40 cm de altura entre duas barras verticais, acima de um colchão de espuma. O tempo máximo que o animal conseguiu manter-se agarrado ao filamento apenas com as patas dianteiras até se soltar foi cronometrado, o qual dá uma estimativa do tónus e força muscular do rato.

Exame histológico

Quando todos os testes previstos para os animais foram completados, injectou-se 1 μ l de corante Chicago *sky blue* 6B a 2% (m/v) através da cânula guia implantada e os animais foram decapitados seguidamente. Os cérebros foram removidos e mantidos a -80°C para subsequente processamento e exame histológico do local de injeção, em secções coronais com 30 μ m de espessura corados pela técnica de Nissl. A avaliação dos locais de injeção foi feita tendo como referência o *Atlas do Encéfalo do Rato*, de Paxinos e Watson (1998).

Análise estatística

Os resultados referentes ao teste do formol foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) tanto para os ratos controlo como para os injectados com baclofeno. Uma vez que o padrão de comportamento de dor pode diferir entre as duas fases do teste do formol devido a representarem dois tipos distintos de dor (Tjølsen, et al., 1992), o comportamento dos animais controlo e injectados com baclofeno durante a primeira (0-5 min) e segunda (20-45 min) fases do teste foi comparado separadamente por ANOVA I e ANOVA II, respectivamente.

As pontuações do teste de flexão do tornozelo foram expressas como média \pm SEM tanto para os ratos controlo como para os injectados com baclofeno e comparadas estatisticamente a cada tempo por ANOVA II seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Os resultados referentes ao teste motor de *hanging* foram apresentados como média \pm SEM para os mesmos ratos quando injectados com soro fisiológico ou baclofeno e comparados estatisticamente por ANOVA I.

Para todas as análises estatísticas feitas neste trabalho foi aceite um nível de significância de 0,05.

Resultados

Teste do formol

Os ratos controlo foram injectados com soro fisiológico no VB através da cânula guia pré-implantada. Após a injeção de formol estes animais desenvolveram comportamentos relacionados com a dor similares aos já descritos para ratos normais (não operados) (Dubuisson e Dennis, 1977; Tjølsen, et al., 1992) (Fig. 1a, b e c).

A injeção de baclofeno produziu variações significativas nos comportamentos relacionados com a dor induzidos pela administração de formol. Assim, os ratos injectados com baclofeno ($n = 6$) demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa no tempo passado em comportamentos de dor total (Fig. 1b) em ambas as fases, por comparação com os ratos controlo. Na realidade, os valores mantiveram-se extremamente baixos, aproximadamente perto de zero durante todo o período experimental, tornando-se quase impossível distinguir as duas fases do teste (Fig. 1b). Relativamente ao comportamento de dor focalizado, embora os valores se mantivessem extremamente baixos durante todo o teste, nos ratos injectados com baclofeno não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos na primeira fase do teste do formol (Fig. 1a). Isto deveu-se ao facto dos animais controlo exibirem poucos comportamentos de dor focalizada nesta fase. No entanto, na segunda fase do teste houve um abaixamento estatisticamente significativo do comportamento focalizado de dor nos animais injectados com baclofeno (Fig. 1a). Finalmente, o número de *jerks* da pata dos animais injectados com baclofeno diminuiu de uma forma estatisticamente significativa em ambas as fases do teste (Fig. 1c).

Progressão da inflamação crónica

No dia seguinte à injeção de CFA todos os animais apresentaram uma inflamação grave restrita à pata injectada e revelaram os sinais comportamentais associados à hiperalgesia e alodínia, tal como já descrito (Neto e Castro-Lopes, 2000). Os animais estavam perfeitamente habituados ao investigador e não revelaram qualquer sinal de medo ou agressividade durante a sua manipulação. A intensidade da inflamação foi monitorizada diariamente de acordo com uma escala subjectiva (Castro-Lopes, et al., 1992), e a média destas pontuações diárias está representada na figura 2.

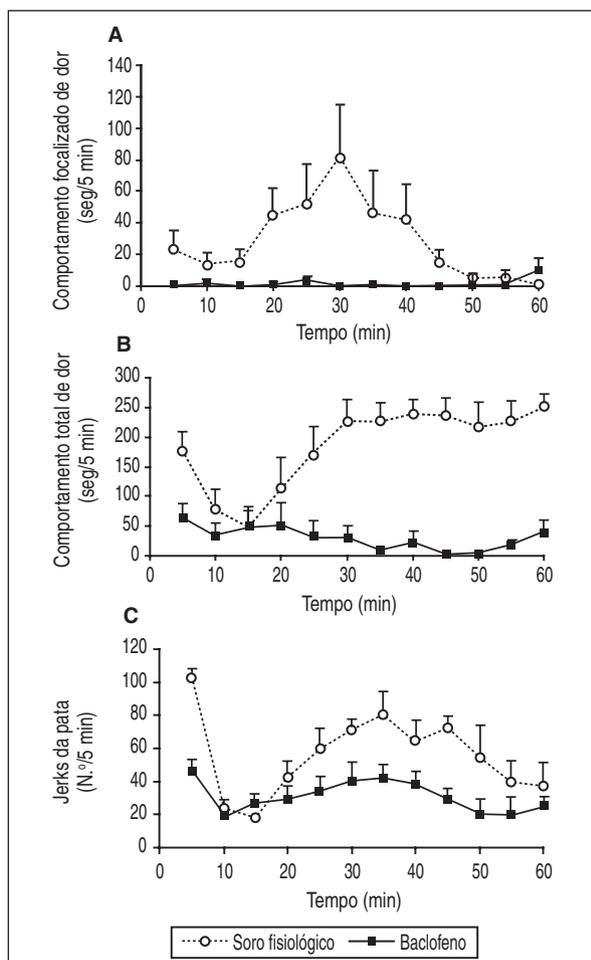


Figura 1. Teste do formol efectuado em ratos injectados com 2,5 µl de soro fisiológico ou 350 ng/µl de baclofeno no VB. Gráficos ilustrativos de a) comportamento de dor focalizada; b) comportamento de dor total, e c) número de jerks da pata após injeção de formol a 5% na pata traseira esquerda. Os dados foram contabilizados a cada 5 min (média ± SEM). Os ratos injectados com baclofeno apresentaram um abaixamento estatisticamente significativo em ambas as fases, tanto no tempo gasto no comportamento total de dor (1.^a fase, $p \leq 0,02$; 2.^a fase, $p \leq 0,01$), como no número de jerks da pata (1.^a fase, $p \leq 0,01$; 2.^a fase, $p \leq 0,02$), por comparação com os animais controlo. A pontuação obtida no comportamento focalizado de dor foi estatisticamente mais baixo que nos controlos apenas na segunda fase do teste ($p \leq 0,02$).

Teste de flexão do tornozelo

Nos dias 2, 4 e 14 de MA, os animais foram aleatoriamente seleccionados para as injeções intratálâmicas de soro fisiológico ou baclofeno.

Dois dias de MA

Os ratos com 2 dias de MA injectados tanto com soro fisiológico ($n = 5$) como com baclofeno (350 ng/µl, $n = 6$) não demonstraram alterações na pontuação do teste de flexão do tornozelo durante os 90 min de teste (Fig. 3).

Quatro dias de MA

Os ratos com 4 dias de MA injectados com soro fisiológico ($n = 5$) tiveram pontuações muito

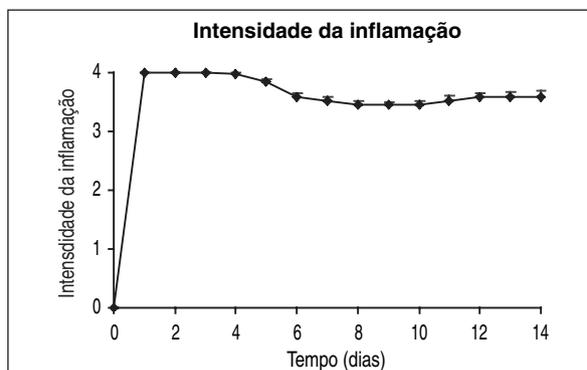


Figura 2. Avaliação da intensidade da inflamação (média ± SEM) dos animais com MA induzida por injeção de CFA ($n = 19$) nos dias precedentes à injeção de soro fisiológico ou baclofeno no VB (2, 4 e 14 dias de MA). O dia 0 representa o dia da injeção de CFA. No dia seguinte à injeção de CFA todos os animais desenvolveram uma inflamação grave (4 pontos) restrita à pata injectada, mantendo-se as pontuações elevadas durante os 14 dias seguintes.

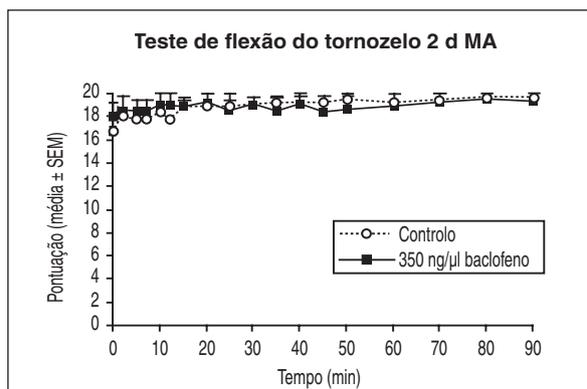


Figura 3. Média das pontuações do teste de flexão do tornozelo (\pm SEM) de animais com 2 dias de MA injectados com soro fisiológico ($n = 5$) e com baclofeno (350 ng/µl, $n = 6$). O teste de flexão do tornozelo para ratos MA (Butler e Weil-Fugazza, 1994) foi efectuado imediatamente antes da injeção (tempo 0) e a 17 tempos diferentes durante os 90 min seguintes. Os animais injectados tanto com soro como com baclofeno não revelaram variações visíveis nas pontuações do teste durante os 90 min.

elevadas no teste de flexão do tornozelo durante os 90 min de período experimental (Fig. 4a). Em contrapartida, o padrão de resposta ao teste foi inconsistente nos animais com 4 dias de MA injectados com baclofeno, e alguns animais evidenciaram sinais de analgesia. Nas figuras 4a e 4b estão representados os resultados dos animais que demonstraram alguma redução das pontuações do teste de flexão do tornozelo. Verificou-se que um animal demonstrou um decréscimo nas pontuações do teste aos 2 min, e estas mantiveram-se baixas até ao final do teste (rato B, Fig. 4b), enquanto que noutros animais foi observado um abaixamento temporário aproximadamente aos 5 min, com pontuações muito oscilantes, recuperando rapidamente valores elevados (ratos A e C, Fig. 4b). Finalmente, o último animal apresentado revelou um comportamento distinto

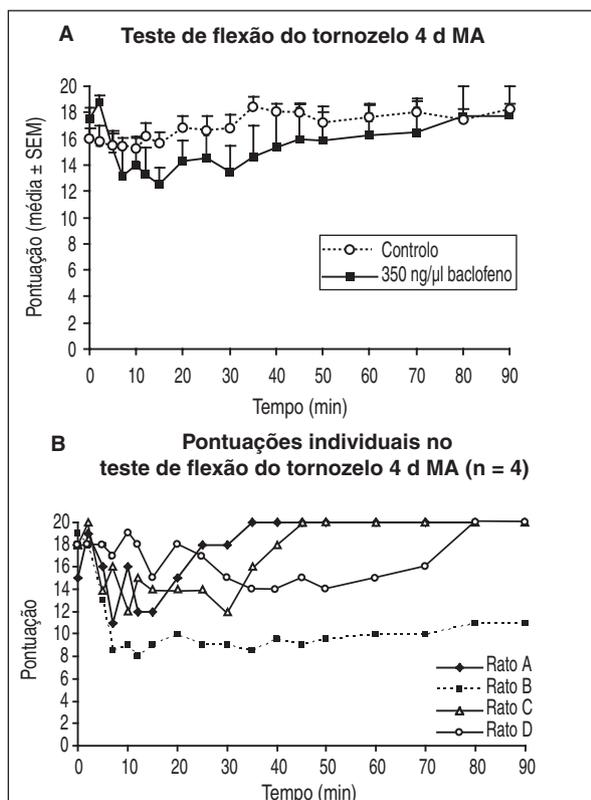


Figura 4. a) Média das pontuações do teste de flexão do tornozelo (\pm SEM) de animais com 4 dias de MA injectados com soro fisiológico ($n = 5$) e com baclofeno ($350 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $n = 4$). Foi observada uma redução estatisticamente não significativa das pontuações do teste de flexão do tornozelo dos ratos injectados com baclofeno. b) Pontuações individuais no teste de flexão do tornozelo dos animais de 4 dias MA injectados com baclofeno ($350 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $n = 4$).

dos anteriores com pontuações do teste de flexão do tornozelo muito irregulares nos primeiros 20 min de teste, verificando-se apenas aos 30 min pós-injecção de baclofeno uma pequena redução das mesmas (rato D, Fig. 4b).

Catorze dias de MA

As pontuações do teste de flexão do tornozelo dos animais controlo com 14 dias de MA ($n = 4$) mantiveram-se elevadas e praticamente constantes durante os 90 min de período experimental (Fig. 5). Contrariamente, as injecções de baclofeno no VB em ratos com 14 dias de monoartrite induziram comportamentos distintos que demonstraram ser dependentes da dose administrada. Assim, a injecção de $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de baclofeno ($n = 4$) causou uma diminuição ligeira das pontuações do teste de flexão do tornozelo, que revelou não ser estatisticamente significativa comparando com os animais controlo (Fig. 5). Por outro lado, a dose de $350 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de baclofeno ($n=6$) demonstrou ser capaz de produzir analgesia. A esta dose, as pontuações começaram a decrescer progressivamente, atingindo valores mínimos a cerca de 15 min pós-injecção (média $6,3 \pm 1,6$). A partir dos 50-60 min após injecção

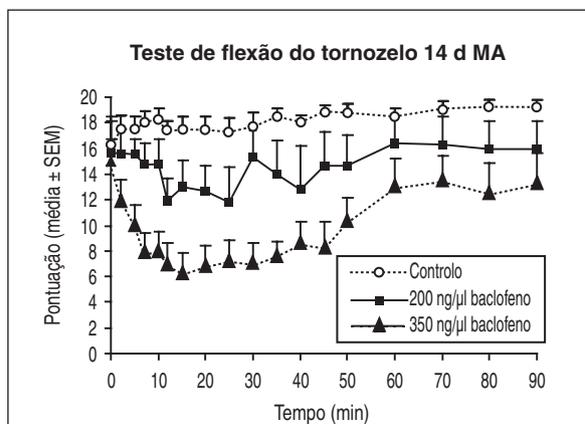


Figura 5. Média das pontuações do teste de flexão do tornozelo (\pm SEM) de animais com 14 dias de MA injectados com soro fisiológico ($n = 4$) e com baclofeno ($200 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $n = 4$ e $350 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $n = 6$). As pontuações dos ratos MA injectados com soro ($n = 4$) mantiveram-se elevadas e praticamente constantes durante os 90 min do teste. A injecção de $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de baclofeno ($n = 4$) causou uma redução estatisticamente não significativa das pontuações. A dose de $350 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de baclofeno ($n = 6$) foi eficaz na redução da alodínia ($p \leq 0,01$).

de baclofeno, as pontuações começaram a subir para valores perto do valor inicial, atingindo o valor $13,3 \pm 2,4$ no final do teste. Foram encontradas diferenças significativas por comparação com os animais controlo (Fig. 5).

Apenas as injecções que atingiram o VB induziram analgesia nos ratos testados. As injecções que atingiram zonas na proximidade do VB não produziram efeitos similares (Fig. 6).

Função motora

O baclofeno, tal como outros agentes GABAérgicos, possui propriedades relaxantes do tônus muscular e antiespásticas (Dirig e Yaksh, 1995; Balerio e Rubio, 2002). Em estudos animais, a acção de relaxamento muscular de uma substância poderá perturbar avaliações de efeitos analgésicos que tenham como resultado final uma acção motora (Balerio e Rubio, 2002). Estudos preliminares efectuados no âmbito deste trabalho demonstraram que quando os animais eram injectados com $2,5 \mu\text{l}$ de baclofeno à concentração $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ sofriam uma perda do tônus muscular apreciável, desenvolviam comportamentos agressivos e letargia. Assim, as capacidades motoras dos ratos injectados com $2,5 \mu\text{l}$ de baclofeno a $350 \text{ ng}/\mu\text{l}$, a dose capaz de desenvolver efeitos analgésicos nos testes de flexão do tornozelo e do formol, foram averiguadas em 10 animais de forma a distinguir analgesia de sedação.

Não foram verificadas diferenças significativas no desempenho dos ratos quando injectados com baclofeno ou com soro. No entanto, dois animais não superaram com tanto sucesso alguns dos testes impostos depois de serem injectados com baclofeno. Assim, um deles teve pontuação (+) no teste de *toe spread* e (\pm) no

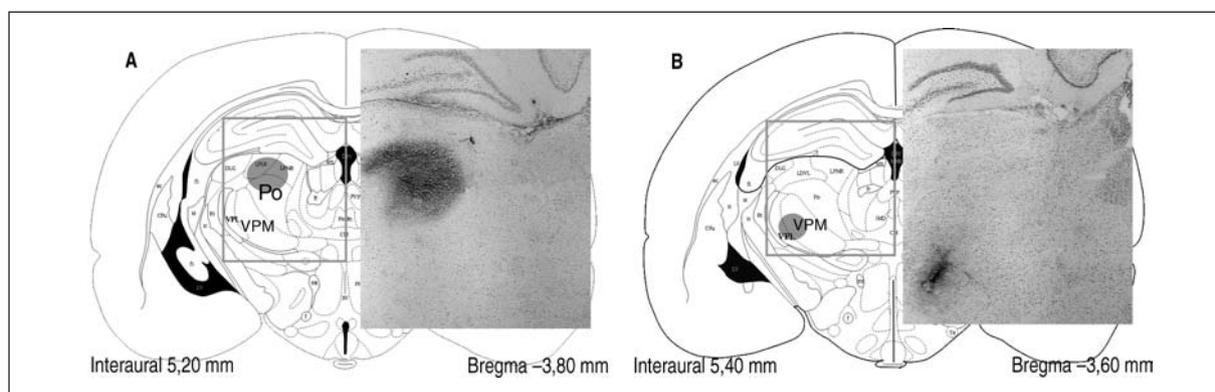


Figura 6. Fotografias de microscopia de campo claro de dois locais de injeção e os desenhos esquemáticos correspondentes de acordo com o Atlas do Encéfalo de Rato (Paxinos e Watson, 1998). Na fotografia da esquerda (a) a injeção de 2,5 μ l de baclofeno (350 ng/ μ l) em ratos com 14 dias de MA não atingiu o VB e conseqüentemente não foi detectada nenhuma diminuição nas pontuações do teste de flexão do tornozelo (resultados não mostrados). Na fotografia da direita (b) a injeção ficou confinada ao VB resultando numa diminuição significativa das pontuações do teste de flexão do tornozelo, comparando com o grupo controlo.

teste de suspensão da cauda; e outro obteve uma pontuação (+) no reflexo de *placing/stepping* e (\pm) nos testes de postura/ambulação e elevação da cauda. Em compensação, os animais quando injectados com baclofeno tiveram em média melhores resultados no teste de *hanging* ($14,6 \pm 5,1$ s, n = 8) relativamente à obtida quando injectados com soro fisiológico ($11,3 \pm 3,1$ s, n = 8; diferença não estatisticamente significativa), provavelmente devido a estes animais estarem menos ansiosos.

Discussão

No presente estudo, foi observada uma redução tanto na pontuação do teste de flexão do tornozelo em ratos monoartríticos como também em todos os comportamentos associados à dor quando avaliados pelo teste do formol, após injeção de baclofeno no VB, o que indica um efeito antinociceptivo deste agonista selectivo dos receptores GABA_B. As injeções de baclofeno que, por razões técnicas, não alcançaram o VB mas sim outros núcleos talâmicos na vizinhança, não causaram quaisquer alterações no teste de flexão do tornozelo nem no teste do formol, o que sugere um efeito específico deste agonista do GABA_B no VB.

Vários estudos realizados ao longo das duas últimas décadas evidenciam a importância do complexo talâmico VB na nocicepção. O VB recebe projecções do feixe espinotalâmico, cujos neurónios recebem afluxo nociceptivo periférico (Guilbaud, et al., 1994). Vários estudos demonstraram que existem numerosos neurónios no VB activados por estímulos somáticos nódicos (mecânicos ou térmicos), o que sugere a sua participação nos aspectos sensitivo-discriminativos da dor (Guilbaud, et al., 1980; Kenshalo, et al., 1980; Chung, et al., 1986). Para além disso, estudos de electrofisiologia revelaram que existem profundas alterações nas respostas dos neurónios somatossensitivos do VB de ratos artríticos

quando comparados com os de ratos normais (Gautron e Guilbaud, 1982). De facto, os neurónios do VB apresentaram um aumento da actividade após estimulação mecânica nódica e não-nódica da articulação ou de áreas na vizinhança da região inflamada (Guilbaud e Kayser, 1987; Guilbaud, 1991). Estudos de actividade metabólica adicionais revelaram também um aumento da actividade neuronal desta região talâmica em ratos monoartríticos (Neto, et al., 1999).

Redução dos comportamentos associados a dor no teste do formol

No presente estudo, a injeção de baclofeno no VB contralateral à pata injectada com formol reduziu os comportamentos associados à dor apresentados pelos ratos, tanto na fase 1 como na fase 2 do teste do formol, em comparação com os animais controlo.

No teste do formol, a primeira fase começa imediatamente após a injeção de formol e dura aproximadamente 5 min. Esta é a fase de dor aguda e é provavelmente devida à estimulação química directa de nociceptores (Tjølsen, et al., 1992). Nesta fase participam ainda a substância P e a bradiquinina (Shibata, et al., 1989). É sabido que as vias ascendentes e as populações neuronais supraespinhais relacionadas com a transmissão nociceptiva proveniente das articulações inflamadas são bastante diferentes das envolvidas na estimulação nódica no rato normal (Guilbaud, et al., 1994;Coderre, et al., 1993; Cervero e Laird, 2003). No entanto, a redução dos comportamentos relacionados à dor na primeira fase do teste do formol indica que a activação dos receptores GABA_B no VB de animais normais sujeitos a um estímulo nódico agudo é passível de produzir analgesia. Isto demonstra que os receptores GABA_B no VB estão muito provavelmente envolvidos não só no processamento da dor crónica como também da aguda.

Na segunda fase do teste do formol os comportamentos relacionados com a dor apresentados pelos animais injectados com baclofeno no VB diminuíram significativamente. Esta fase corresponde à fase de dor inflamatória, também denominada de fase de dor crónica ou fase tónica, na qual o uso de analgésicos anti-inflamatórios não-esteróides (NSAIDs) reduz os comportamentos nociceptivos que lhe estão associados (Tjølsen, et al., 1992), mas não afecta os comportamentos de dor na primeira fase do teste. Para além disso, parecem estar envolvidos nesta fase tardia de dor mediadores inflamatórios como a histamina, a serotonina, as prostaglandinas e a bradiquinina (Shibata, et al., 1989). Entre as duas fases, os animais não apresentam comportamentos de dor, como foi também observado no presente estudo, e tem sido discutido que esta interfase representa um mecanismo de autoanalgesia despoletado pela dor inicial (Franklin e Abbott, 1993). Foi também sugerido que as alterações neuronais centrais que ocorrem durante a breve fase inicial após injeção subcutânea de formol na pata são essenciais para a expressão de dor na fase tónica mais tardia (Coderre, et al., 1990). Deste modo, uma vez que o baclofeno foi capaz de impedir a expressão total de dor na primeira fase e possivelmente os mecanismos por ela induzidos na medula espinhal, o aparecimento de dor na fase tónica tardia foi, provavelmente, comprometido.

Muitos estudos já usaram a administração de baclofeno por várias vias no teste do formol (Dirig e Yaksh, 1995; Shafizadeh, et al., 1997; Mahmoudi e Zarrindast, 2002; Czuczwar, et al., 2003), tendo todos eles encontrado propriedades antinociceptivas neste fármaco, as quais são habitualmente atribuídas a um efeito na medula espinhal. No entanto, é também sabido que o baclofeno tem uma acção inibitória sobre o sistema motor, e por isso mesmo é usado clinicamente no tratamento da espasticidade de várias origens (Pedersen, et al., 1974). Uma vez que, em estudos com animais, esta acção motora pode afectar os resultados das medições de analgesia quando estas se baseiam em acções motoras, neste estudo foram efectuados diversos testes motores aos animais injectados com baclofeno. Estes testes demonstraram que a analgesia observada nos ratos injectados com baclofeno, tanto no teste do formol como no teste da flexão do tornozelo, não foi devida a inibição da actividade motora. Por outro lado, um estudo recente mostrou que a acção analgésica do baclofeno é distinta dos efeitos motores que induz (Balerio e Rubio, 2002).

Redução da pontuação do teste da flexão do tornozelo

Nos animais com 14 dias de MA, foi observada uma diminuição da pontuação do teste da flexão do tornozelo, e portanto da alodínia, após activação dos receptores GABA_B pelo baclofeno, o que sugere uma inibição dos neurónios do VB por esses receptores. O efeito hipalgésico do baclofeno foi observado após se ter infligido um estímulo

nóxico agudo adicional em animais com uma inflamação, a qual presumivelmente origina um influxo nóxico crónico. Alguns autores sugerem que os receptores GABA_B estão associados com auto-e/ou hetero-receptores pré-sinápticos nos núcleos de transmissão talâmicos (Le Feuvre, et al., 1997; Poorkhalkali, et al., 2000). Neste sentido a activação de hetero-receptores pré-sinápticos localizados em fibras espinhotalâmicas excitatórias aferentes poderá ser responsável pelo efeito analgésico observado, uma vez que a sua acção excitatória no VB seria inibida.

A redução da pontuação do teste da flexão do tornozelo observada nos ratos MA após injeção de baclofeno foi dependente do tempo de inflamação. Assim, a mesma concentração de baclofeno (350 ng/μl) não induziu analgesia nos ratos com 2 dias de MA e nos ratos com 4 dias de MA foram detectados alguns sinais de analgesia mas os resultados foram inconsistentes entre diferentes animais e não foram estatisticamente significativos, enquanto que nos ratos com 14 dias de MA esta dose foi suficiente para diminuir consideravelmente as pontuações do teste da flexão do tornozelo. Estes resultados são provavelmente consequência das reacções plásticas que estão a ocorrer no SNC durante a evolução da monoartrite. De facto, em estádios iniciais da inflamação, mecanismos neuronais periféricos, tais como sensibilização de nociceptores e activação de mediadores inflamatórios, parecem contribuir para a dor inflamatória (Coderre, et al., 1993; Cervero e Laird, 2003). Em fases tardias da inflamação ocorrem mudanças profundas, tais como alterações na produção de neurotransmissores e dos seus receptores, que levam ao aumento da excitabilidade observada nas áreas do SNC envolvidas na transmissão da informação dolorosa (Dubner e Ruda, 1992; Coderre, et al., 1993). Foram recentemente descritas alterações dependentes do tempo de inflamação na expressão do ARNm para diversos receptores de neurotransmissores (Neto, et al., 2000; Ferreira-Gomes, et al., 2004). Num desses estudos, foram observadas reduções significativas nos níveis de ARNm para o GABA_B1b no VB aos 4, 7 e 14 dias de MA, no lado contralateral à pata inflamada, mas não foram detectadas diferenças aos 2 dias de MA em comparação com os controlos (Ferreira-Gomes, et al., 2004). Os resultados das experiências de hibridação *in situ* (Ferreira-Gomes, et al., 2004) e da injeção de baclofeno no VB (estudo presente) sugerem que, aos 2 dias de MA, a dor inflamatória crónica encontra-se numa fase inicial e que ainda não ocorreram alterações muito profundas no sistema GABA_B nesta região talâmica. Os animais com 4 dias de MA apresentaram pontuações para o teste da flexão do tornozelo inconsistentes, o que sugere a existência de características individuais que determinam o modo como o animal responde ao estímulo nóxico, isto é, o estado de inflamação crónica e o grau de excitabilidade do SNC é diferente entre animais em estádios iniciais da doença. Neste sentido, os efeitos do baclofeno aqui

apresentados, os quais foram dependentes do tempo de inflamação, suportam a ideia de que em dor crónica inflamatória ocorrem alterações dinâmicas no SNC ao longo do tempo, tal como sugerido por outros autores (Dubner e Ruda, 1992;Coderre, et al., 1993).

Em conclusão, o presente trabalho sugere um papel específico para os receptores GABA_B no VB, tanto no processamento da dor aguda como da dor crónica inflamatória. A activação dos receptores GABA_B no VB reduziu a alodínia em ratos num estado avançado de monoartrite e foi também capaz de induzir efeitos analgésicos em ratos normais com dor aguda. Para além disso, o seu papel no processamento da dor crónica parece estar dependente do tempo de progressão da inflamação, o que sugere um estado diferente de excitação dos neurónios talâmicos do VB a diferentes estadios inflamatórios. O modo exacto como a activação de receptores GABA_B no VB é capaz de induzir analgesia nas duas condições de dor encontra-se, no entanto, ainda em investigação, sendo necessários mais estudos farmacológicos e electrofisiológicos para o esclarecer.

Bibliografia

Almeida A, Störksson R, Lima D, Hole K, Tjølsen A. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *Eur J Neurosci* 1999;11:110-22.

Balerio GN, Rubio MC. Baclofen analgesia: involvement of the GABAergic system. *Pharmacol Ther* 2002;42:281-6.

Bowery NG. Metabotropic GABA_B receptors. *Neurotransmissions* 1999;15:3-11.

Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain* 1992;48:73-81.

Butler SH, Weil-Fugazza J. The foot-bend procedure as test of nociception for chronic studies in a model of monoarthritis in the rat. *Pharmacol Ther* 1994;4:327-34.

Castro-Lopes JM, Malcangio M, Pan BH, Bowery NG. Complex changes of GABA_A and GABA_B receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy. *Brain Res* 1995;679:289-97.

Castro-Lopes JM, Tavares I, Tölle TR, Coito A, Coimbra A. Increase in GABAergic cells and GABA levels in the spinal cord in unilateral inflammation of the hindlimb in the rat. *Eur J Neurosci* 1992;4:296-301.

Cervero F, Laird JMA. From acute to chronic pain: peripheral and central mechanisms. Em: Bountra C, Munglani R, Schmidt WK, editores. *Pain: current understanding, emerging therapies, and novel approaches to drug discovery*. Nova Iorque: Marcel Dekker; 2003. p. 29-44.

Chung JM, Lee KH, Surmeier DJ, Sorkin LS, Kim J, Willis WD. Response characteristics of neurons in the ventral posterior lateral nucleus of the monkey thalamus. *J Neurophysiol* 1986;56:370-90.

Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 1993;52:259-85.

Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990;535:155-8.

Czuczwar M, Kiś J, Łuszczki J, Turski WA, Przesmycki K. Evaluation of interaction between gabapentin and baclofen in the rat formalin test in mice. *Pol J Pharmacol* 2003;55:803-6.

Dirig DM, Yaksh TL. Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J Pharmacol and Exp Ther* 1995;275:219-27.

Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci* 1992;15:96-103.

Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161-74.

Euler M, Åkesson E, Samuelsson E, Seiger Å, Sundström E. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1996;137:242-54.

Ferreira-Gomes J, Neto FL, Castro-Lopes JM. Differential expression of GABA_B1b receptor mRNA in the thalamus of normal and monoarthritic animals. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1603-11.

Franklin KB, Abbott FV. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain

modulation by GABA_A receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46:661-6.

Gautron M, Guilbaud G. Somatic responses of ventrobasal thalamic neurons in polyarthritic rats. *Brain Res* 1982;237:459-71.

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.

Guilbaud G. Central neurophysiological processing of joint pain on the basis of studies performed in normal animals and in models of experimental arthritis. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:637-46.

Guilbaud G, Bernard JF, Besson JM. Brain areas involved in nociception and pain. Em: Wall PD, Melzack R, editores. *Textbook of pain*. 3.^a ed. Edimburgo: Churchill Livingstone; 1994. p. 113-28.

Guilbaud G, Kayser V. The ventrobasal complex of the rat thalamus: its involvement in the sensory-discriminative aspects of nociception, including models of clinical pain. Em: Besson JM, Guilbaud G, Peschanski M, editores. *Thalamus and Pain*. Amesterdão: Elsevier Science; 1987. p. 185-207.

Guilbaud G, Peschanski M, Gautron M, Binder D. Neurons responding to noxious stimulation in VB complex and caudal adjacent regions in the thalamus of the rat. *Pain* 1980;8:303-18.

Humeniuk RE, Ong J, Kerr DI, White JM. Characterization of GABA_B ligands in vivo. *Gen Pharmacol* 1995;26:417-24.

Kenshalo DR Jr, Giesler GJ Jr, Leonard RB, Willis WD. Responses of neurons in primate ventral posterior lateral nucleus to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 1980;43:1594-614.

Le Feuvre Y, Fricker D, Leresche N. GABA_A receptor-mediated IPSCs in rat thalamic sensory nuclei: patterns of discharge and tonic modulation by GABA_B autoreceptors. *J Physiol* 1997;502:91-104.

Lin Q, Peng YB, Willis WD. Role of GABA receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. *J Neurophysiol* 1996;75:109-23.

Mahmoudi M, Zarrindast MR. Effect of intracerebroventricular injection of GABA receptor agents on morphine-induced antinociception in the formalin test. *J Psychopharmacol* 2002;16:85-91.

Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian Central Nervous System. *Prog Neurobiol* 1995;46:423-62.

Neto FL, Castro-Lopes JM. Antinociceptive effect of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist in the thalamus of monoarthritic rats. *Neurosci Letters* 2000;296:25-8.

Neto FL, Schadrack J, Ableitner A, et al. Supraspinal metabolic activity changes in the rat during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience* 1999;94:607-21.

Neto FL, Schadrack J, Platzer S, Ziegglängsberger W, Tölle TR, Castro-Lopes JM. Expression of metabotropic glutamate receptors mRNA in the thalamus and brainstem of monoarthritic rats. *Mol Brain Res* 2000;81:140-54.

Paxinos G, Watson W. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1998.

Pedersen E. Clinical assessment and pharmacologic therapy of spasticity. *Arch Phys Med Rehabil* 1974;55:344-54.

Poorkhalkali N, Juneblad K, Jönsson AC, et al. Immunocytochemical distribution of the GABA_B receptor splice variants GABA_BR1a and R1b in the rat CNS and dorsal root ganglia. *Anat Embryol* 2000;201:1-13.

Price JL. Thalamus. Em: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 2.^a ed. San Diego: Academic Press; 1995. p. 629-48.

Shafizadeh M, Semnani S, Zarrindast MR, Hashemi B. Involvement of GABA_B receptors in the antinociception induced by baclofen in the formalin test. *Gen Pharmacol* 1997;28:611-5.

Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38:347-52.

Tjølsen A, Berge OG, Hole K. Lesions of bulbo-spinal serotonergic or noradrenergic pathways reduce nociception as measured by the formalin test. *Acta Physiol Scand* 1991;142:229-36.

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.

Ulrich D, Huguenard JR. GABA_B receptor-mediated responses in GABAergic projection neurons of rat nucleus reticularis thalami in vitro. *J Physiol* 1996;493:845-54.

Whishaw IQ, Haun F, Kolb B. Analysis of behavior in laboratory rodents. Em: Windhorst U, Johansson H, editores. *Modern techniques in neuroscience*. Berlin: Springer-Verlag; 1999. p. 1243-75.

White HS, Woodhead JH, Franklin MR, Swinyard EA, Wolf HH. Experimental selection, quantification, and evaluation of antiepileptic drugs. Em: Levy R, Mattson R, Meldrum B, editores. *Antiepileptic drugs*. Nova Iorque: Raven Press; 1989. p. 99-110.

Yamada K, Yu B, Gallagher JP. Different subtypes of GABA_B receptors are present at pre and postsynaptic sites within the rat dorsolateral septal nucleus. *The American Physiol Soc* 1999;287:5-83.

Yang SL, Park HY, Lee SH, et al. Transdermal eperisone elicits more potent and longer-lasting muscle relaxation than oral eperisone. *Pharmacol* 2004;71:150-6.

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

Artigo original

A Estimulação Mecânica de Articulações Monoartríticas Induz Fosforilação das ERKs 1 e 2 na Medula Espinhal

Célia D. Cruz^{1,3}, Fani Neto¹, José Manuel Castro Lopes¹, Stephen B. McMahon³ e Francisco Cruz^{1,2}

Resumo

O corno dorsal da medula espinhal recebe e processa o fluxo sensitivo gerado por estimulação de estruturas periféricas, incluindo a estimulação nóxica. A monoartrite, induzida por injeção de adjuvante de Freund completo (CFA) no tornozelo de ratos, induz várias alterações nas respostas funcionais dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal. Muitas destas alterações dependem de modificações no funcionamento das vias de sinalização intracelulares nestes neurónios. Os membros da via das cínases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERKs) são expressos abundantemente no sistema nervoso e, na medula espinhal, são activados por estimulação nóxica de estruturas periféricas. Estudos recentes demonstraram que as ERKs desempenham um papel importante, pelo menos, alguns estados de sensibilidade dolorosa alterada.

Neste trabalho, investigámos o modo como a actividade das ERKs na medula espinhal é modulada durante a progressão da monoartrite. Os nossos resultados indicam que a fosforilação das ERKs aumenta à medida que aumenta o tempo de inflamação. Utilizámos também PD98059, um inibidor específico da activação das ERKs, de modo a avaliar os efeitos funcionais da fosforilação das ERKs. Este inibidor reduziu significativamente o comportamento nociceptivo dos animais monoartríticos quer nas fases iniciais quer nas finais da patologia. Estes resultados sugerem que os níveis de fosforilação das ERKs estão aumentados em animais monoartríticos, o que se reflecte no comportamento do animal. Dado que as ERKs desempenham um importante papel funcional, o uso de inibidores específicos destas proteínas poderá ter relevância terapêutica para o tratamento da dor crónica.

Palavras-chave: ERKs. Monoartrite. Medula espinhal.

Introdução

A dor crónica é caracterizada pela percepção alterada de estímulos periféricos, nomeadamente pelo estabelecimento de alodinia e hiperalgesia. Os fenómenos de alodinia – descrito como sendo a percepção de estímulos normalmente inócuos como dolorosos – e de hiperalgesia – sendo esta um aumento da resposta exagerada em resposta a estímulos nóxicos – reflectem mudanças que ocorrem ao nível da medula espinhal, envolvendo mecanismos excitatórios e ini-

bitórios (Millan, 1999), e que se sabe também ocorrerem nos centros supra-espinhais de controlo de dor (Neto, et al., 1999; Woolf e Slater, 2000). Tais mudanças adaptativas dependem muitas vezes de pequenos ajustes dos mecanismos modulatórios de regulação de expressão génica, função de receptores e/ou canais iónicos (Besse, et al., 1992; Dray, et al., 1994; Ji e Woolf, 2000). As cascatas de sinalização intracelular podem estar envolvidas nestas alterações.

Várias cascatas foram já implicadas na sinalização intracelular neuronal (Aley e Levine, 1999; Lewin e Walters, 1999; Sluka, 1997; Sluka e Willis, 1998), das quais a cascata das cínases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERKs) parece assumir uma importância particular no sistema nervoso (Grewal, et al., 1999; Sweatt, 2001). As ERKs são abundantemente expressas

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

²Departamento de Urologia
Faculdade de Medicina do Porto, Portugal

³Neurorestoration group, Wolfson CARD, King's College
London, UK

em neurónios no sistema nervoso central (CNS) adulto (Derkinderen, et al., 1999) e medeiam a transdução de sinais intracelulares em resposta a uma variedade de estímulos. Após a sua activação por fosforilação, as ERKs conseguem translocar-se para o núcleo, activar factores de transcrição tais como o Elk-1 ou o CREB (Chang e Karin, 2001), e, assim, modular a expressão génica.

Trabalhos recentes sugeriram um possível envolvimento das ERKs no processamento da dor somática e visceral ao nível da medula espinhal. No rato, as ERKs são activadas rapidamente em neurónios da medula espinhal após estimulação periférica nóxica aguda, induzida por vários tipos de estímulos (Ji, et al., 1999; Karim, et al., 2001; Galán, et al., 2002; Pezet, et al., 2002; Galán, et al., 2003). Além disso, o uso de inibidores específicos da fosforilação, o PD98059 ([2-(2'-amino-3'-metoxifenil)-oxanaftaleno-4-ona] e o U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadieno), indica que as ERKs desempenham um papel importante nos mecanismos de hiperalgesia e alodinia (Ji, et al., 1999; Ji, et al., 2002; Galán, et al., 2002; Galán, et al., 2003).

No presente trabalho, ratos monoartríticos a diferentes tempos de evolução da doença foram utilizados após estimulação do tornozelo inflamado, de modo a avaliar a activação das ERKs em neurónios da medula espinhal. Além disso, utilizámos o PD98059, um inibidor da fosforilação das ERKs, de modo a modular a sua actividade e determinar os seus efeitos no comportamento reactivo à dor nestes animais.

Material e métodos

Indução da inflamação crónica

Todos os ensaios foram efectuados em ratos Wistar machos adultos (colónia do IBMC, Porto, Portugal) com peso aproximado entre os 200 e os 300 g. Os animais foram mantidos com acesso *ad libitum* a comida e água e em condições controladas de luz (ciclo de 12 h luz/12 h escuro) e temperatura (22 °C). Todos os métodos utilizados estão de acordo com a Directiva da Comunidade Europeia de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC) e com as directivas éticas para a investigação da dor experimental em animais (Zimmermann, 1983).

A monoartrite foi induzida através da injeção de 50 µl de adjuvante completo de Freund (CFA, Difco Laboratories, Michigan, USA) na articulação tibiotársica esquerda do animal, sob anestesia de isoflurano (5% para indução, 2,5% para manutenção), de acordo com Butler, et al., 1992.

Os animais controlo foram injectados com 50 µl de soro fisiológico e mantidos durante 2 dias. Durante o curso da monoartrite, o grau de inflamação foi observado e avaliado de acordo com a escala proposta por Castro-Lopes, et al., 1992.

Estimulação mecânica

No dia da experiência, os ratos controlo (C), bem como os animais com dois (2 d MA), quatro (4 d MA), sete (7 d MA) e catorze (14 d MA) dias de monoartrite foram anestesiados com pentobarbital de sódio (50 mg/kg⁻¹ i.p.). De seguida, o tornozelo esquerdo foi estimulado mecanicamente (E, n = 6 por grupo experimental) através da flexão e extensão repetida da articulação durante 5 min, ou não estimulado (NE, n = 6 por grupo experimental).

Preparação do tecido e imunocitoquímica

Todos os animais foram perfundidos através do ramo ascendente da aorta com 250 ml de solução Tyrode fria sem cálcio e oxigenada seguido de 750 ml de paraformaldeído a 4% com 14% de ácido pícrico saturado. As medulas espinhais foram removidas e pós-fixadas no mesmo fixador durante 4 h, sendo, de seguida, guardadas em crioprotector durante 24 h (sacarose a 30% com azida sódica 0,1% em tampão fosfato 0,1 M). Seguidamente, a porção caudal dos segmentos L3 e os segmentos L4 e L5 da medula espinhal (Grant, 1995) foram dissecadas. Fatias transversais com 40 µm de espessura foram obtidas das amostras da medula espinhal, utilizando um micrótopo de congelação e foram armazenados a -20 °C em solução de crioprotector até serem utilizados (Lu e Haber, 1992).

Após descongelação, uma em cada quatro fatias de medula espinhal foi imunorreagido com o anticorpo anti-pERKs. Resumidamente, as fatias foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) e a actividade da peroxidase endógena foi inibida, recorrendo-se a uma incubação com PBS com peróxido de hidrogénio 0,3%, durante 30 min. Após duas lavagens em PBS e uma lavagem em PBS com Triton X-100 0,3% (PBST), as fatias foram incubadas, durante 1 h, com a solução de bloqueio (glicina 0,15 mM e 10% de soro normal de suíno, NSS, em PBST). De seguida, as fatias foram incubadas com anticorpo específico para anti-pERKs (feito em coelho; New England Biolabs, UK) numa diluição de 1:1.000, durante 48 h a 4 °C. As fatias foram então lavadas 3 vezes com uma solução de PBST com 2% de NSS, sendo, de seguida, incubadas durante 1 h com anticorpo biotinilado de suíno anticoelho (1:200; Dakopatts, Dako A/5, Copenhaga, Dinamarca). De seguida, as fatias foram lavadas com PBST e incubadas durante 1 h num complexo de avidina-biotina (ABC, 1:200; Vector Laboratories, Peterborough, UK). A visualização foi conseguida com o recurso à reacção da 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) (5 min em tampão Tris 0,05 M com DAB a 0,05 e 0,003% de peróxido de hidrogénio). As fatias foram então montadas em lâminas de vidro revestidas com gelatina, desidratadas em xilol e cobertas com Eukitt. Os anticorpos foram diluídos em PBST com 2% de NSS e o complexo ABC foi diluído em PBST.

Controlos apropriados para a reactividade cruzada foram feitos, e esta não foi observada em qualquer situação.

Análise dos dados de imunocitoquímica

As células imunorreactivas (IR) foram contadas separadamente em 4 regiões diferentes da medula espinhal (corno dorsal superficial – lâminas I-III, corno dorsal profundo – lâminas IV-VI, corno ventral – lâminas VII-IX e canal central – lâmina X), em 5 fatias não adjacentes da porção caudal do segmento L3 e em 10 fatias não adjacentes dos segmentos L4 e L5. Os resultados de todas as contagens foram avaliados para cada região da medula espinhal e para cada grupo experimental. Foi também feita a média do número total (em todas as regiões da medula espinhal) de células IR para as pERKs em cada grupo experimental. Os dados foram comparados estatisticamente através do teste ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido de um teste *post-hoc* de Student Newman-Keuls. Foi aceite um nível de significância de 0,05.

Cirurgia e análise comportamental após injeção do PD98059

Nestes ensaios, foram utilizados diferentes grupos de ratos monoartríticos em duas alturas distintas de doença (4 e 14 dias). Sob anestesia com medetomidina 0,025 mg/100 g e ketamina 6 mg/100 g em solução aquosa, foram implantados catéteres, de forma permanente, no espaço subaracnoideu lombar (ao nível do segmento L4) dos animais de acordo com a técnica de Bennett, et al. (1996) e Kerr, et al. (1999). Todas as cirurgias foram realizadas 4 dias antes do teste comportamental. Além disso, todos os animais foram habituados durante as 3 semanas anteriores ao teste comportamental, de modo a minimizar os comportamentos provocados pelo medo e *stress* induzidos pelo manipulador. No dia do ensaio, os ratos foram submetidos ao teste de flexão do tornozelo (Butler e Weil-Fugazza, 1994). Resumidamente, a articulação afectada foi sujeita a cinco flexões e cinco extensões alternadas e os movimentos de luta e vocalizações foram contabilizados e registados de acordo com uma escala previamente definida. Um teste de flexão do tornozelo foi realizado imediatamente antes da injeção de 15 µl de soro fisiológico (para ratos com 4 ou 14 d MA, grupo controlo, n = 4) ou do PD98059 (Calbiochem, UK) em solução (1 e 2 µg para os ratos com 4 d e 14 d de MA, respectivamente, n = 4 por grupo experimental) através do cateter para o espaço subaracnoideu lombar. Após a injeção, os animais foram sujeitos a testes de flexão do tornozelo sucessivos, a diferentes tempos durante um período de 90 min (1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 min). Tanto os tornozelos inflamados como os normais foram manipulados pelo mesmo manipulador, que des-

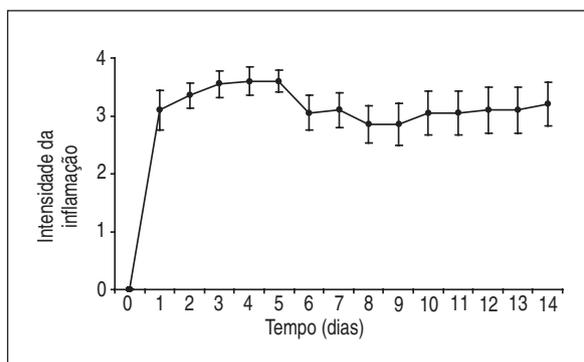


Figura 1. Intensidade de inflamação (média ± semana) de animais monoartríticos (n = 4) antes da injeção de CFA (tempo 0) e durante os 14 dias seguintes. A intensidade foi registada diariamente segundo uma escala definida por Castro Lopes, et al. (1992).

conhecia qual a substância que tinha sido injectada através do cateter. Os animais foram perfundidos imediatamente após os testes, as medulas espinhais foram dissecadas e a posição dos catéteres foi confirmada. Os resultados dos testes de flexão do tornozelo foram estatisticamente analisados através do método de análise do Modelo Geral Linear para medições repetidas, seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Resultados

Inflamação

Os ratos injectados com soro fisiológico não desenvolveram sinais de monoartrite e mantiveram-se saudáveis e com comportamento normal até ao fim das experiências. Pelo contrário, animais injectados com CFA desenvolveram uma monoartrite estável e restrita ao tornozelo esquerdo. Assim, ao segundo dia de inflamação, era já evidente o edema do tornozelo e os animais demonstravam uma atitude defensiva em relação à articulação afectada, evitando movimentar o membro afectado. Nesta altura, a pontuação inflamatória atingiu os valores quase máximos (Fig. 1).

Activação das ERKs em neurónios espinhais após movimento do tornozelo inflamado

Em fatias de medula espinhal de animais injectados com soro fisiológico, quer estimulados, quer não estimulados, não foram observadas nenhuma célula IR para as pERKs (Fig. 2A). Em fatias de animais MA não estimulados (NE), poucas células pERKs-positivas foram observadas (Tabela 1, Figs. 2B e 3). A imunoreactividade foi sempre observada no corno dorsal ipsilateral e as células imunorreactivas apresentavam corpos celulares e prolongamentos celulares com uma marcação intensa e, em alguns casos, também foi observada marcação nuclear.

Tabela 1. Número de células pERKs 1 e 2 positivas nos segmentos L3-L5 da medula espinhal de ratos MA. Dados apresentados como média \pm erro médio

Grupos experimentais	Número total	Lam I-III	Lam IV-VI	Lam VII-IX	Lam X
Controlo NE	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Controlo E	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
2 d MA-NE	0,7 \pm 0,5	0,5 \pm 0,3	0,2 \pm 0,2	0 \pm 0	0 \pm 0
2 d MA-E	14,5 \pm 2,9*	11,2 \pm 1,9*	2,9 \pm 0,9[†]	0,2 \pm 0,1 [†]	0,2 \pm 0,1 [†]
4 d MA-NE	0,5 \pm 0,4	0,5 \pm 0,4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
4 d MA-E	16,6 \pm 1,9*	12,3 \pm 1,4*	3,6 \pm 0,5[†]	0,5 \pm 0,1 [†]	0,2 \pm 0,0 [‡]
7 d MA-NE	1,1 \pm 0,9	1,1 \pm 0,9	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
7 d MA-E	43,0 \pm 5,1*	22,1 \pm 2,6*	15,5 \pm 2,1[†]	5,0 \pm 0,7[†]	0,4 \pm 0,2 [‡]
14 d MA-NE	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
14 d MA-E	50,7 \pm 9,5*	33,0 \pm 4,6*	12,1 \pm 3,2[†]	3,7 \pm 1,3[†]	1,9 \pm 0,5[‡]

NE e E correspondem a animais não estimulados e estimulados, respectivamente; MA indica a presença de monoartrite. Valores a **negrito** correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre animais não estimulados e estimulados para o mesmo ponto temporal, bem como a diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) quando comparados com os grupos controlo; * corresponde a diferenças significativas entre a fase inicial (2 e 4 dias) e a fase tardia (7 e 14 dias) de MA ($p < 0,001$; teste T); [†] e [‡] correspondem a diferenças estatísticas significativas entre as fases inicial (2 e 4 dias) e tardia (7 e 14 dias) de MA ($p < 0,001$ ou $p < 0,01$, respectivamente; teste Mann-Whitney).

Pelo contrário, o número de células imunorreactivas em fatias da medula espinhal de animais MA estimulados (E) estava bastante aumentado em todos os tempos da inflamação, quando

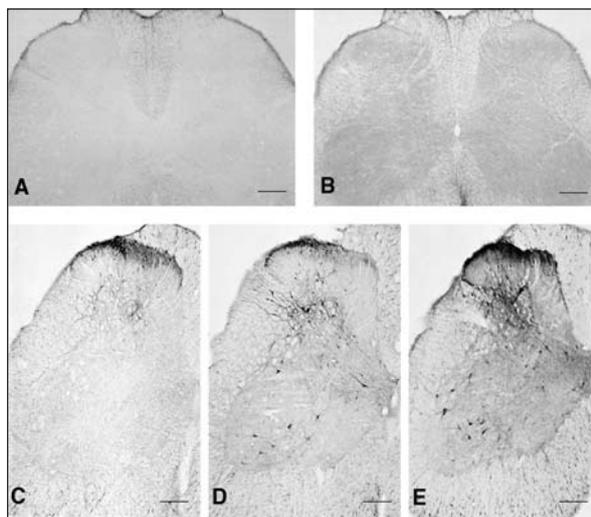


Figura 2. Microfotografias de cortes da medula espinhal (segmento L4) de ratos injectados no tornozelo com soro fisiológico (controlo) ou monoartríticos (MA) evidenciando células imunorreactivas para a forma fosforilada das ERKs. A) Controlo, estimulado. B) 7 dias MA, não estimulado: não são observados níveis significativos de imunorreactividade em nenhum dos lados da medula espinhal. C) 2 dias MA, estimulado: observaram-se células imunorreactivas nas lâminas superficiais do corno dorsal (lâminas I-III). A imunorreacção surgiu apenas no lado ipsilateral à injeção de CFA e estimulação. D) 7 dias MA, estimulado: o número de células imunorreactivas aumentou significativamente nas lâminas superficiais da medula espinhal. Foram ainda observadas células imunorreactivas nas lâminas profundas do corno dorsal (lâminas IV-VI) e no corno ventral ipsilateral. E) 14 dias MA, estimulado: os resultados observados foram semelhantes aos encontrados em cortes de medula espinhal de ratos estimulados com 7 dias de MA. Além disso, foram também observadas algumas células imunorreactivas na lâmina X. Barra de calibração = 200 μ m.

comparado com as fatias de animais MA-NE para os mesmos tempos ($p < 0,05$). Além disso, à medida que a inflamação progrediu, foi possível observar um aumento do número de células pERKs positivas nos segmentos L3-L5 da medula espinhal de ratos estimulados. Assim, em fatias de animais com 2 e 4 dias MA-E, o número total de células pERKs positivas/fatia foi de $14,5 \pm 2,9$ e $16,6 \pm 1,9$, respectivamente (Tabela 1, Figs. 2C e 3). Aos 7 e 14 dias de MA, a estimulação induziu um aumento da activação, tendo-se então observado $43,0 \pm 5,1$ e $50,7 \pm 9,5$ células pERKs positivas/fatia, respectivamente (Tabela 1, Figs. 2D, 2E e 3). As diferenças observadas entre animais estimulados na fase inicial (2 e 4 d) e final (7 e 14 d) de MA são estatisticamente significativas ($p < 0,001$) (Fig. 3).

Nas várias lâminas dos segmentos L3-L5 da medula espinhal de animais MA-E, verificou-se que ocorriam diferenças significativas entre diversos grupos. Assim, nas lâminas superficiais (I-III) do corno dorsal observou-se a todos os tempos de MA um número de células IR que era significativamente superior ao observado em fatias da medula espinhal de animais controlo ($p < 0,05$) (Tabela 1, Fig. 4). Além disso, aos 7 e 14 dias de MA, a fase tardia da doença estudada neste trabalho, observou-se um aumento estatisticamente significativo em comparação com a fase mais inicial da doença ($p < 0,001$) (Tabela 1, Fig. 4). No corno dorsal profundo (lâminas IV-VI), foram observadas menos células que nas lâminas superficiais. Ainda assim, a todos os tempos de MA, o número de células IR era significativamente superior ao observado em fatias de animais controlo ($p < 0,001$) (Tabela 1, Fig. 4). Também nesta zona foi possível observar um aumento significativo do número de células IR na fase tardia da doença ($p < 0,001$) (Tabela 1, Fig. 4). Aos 7 e 14 dias de MA, foi também encontrada

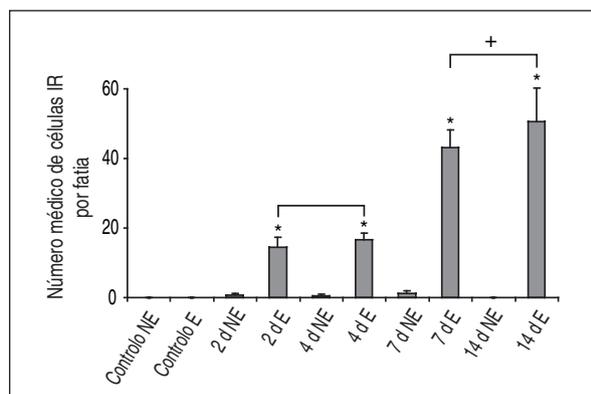


Figura 3. Número médio de células imunorreactivas para a forma fosforilada das ERKs por corte em todas as lâminas da medula espinhal (L3-L5) de ratos controlo ou monoartríticos aos 2 (2 d), 4 (4 d), 7 (7 d) e 14 (14 d) dias de monoartrite, não estimulados (NS) e estimulados (S). Nos animais MA estimulados, observaram-se diferenças significativas a todos os tempos de MA, em comparação com os animais controlo e animais com tempo semelhante de MA não estimulados. (* $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os 2 e os 4 dias nem entre os 7 e 14 dias. No entanto, foram observados aumentos significativos aos 7 e 14 dias pós-injecção de CFA, em comparação com os 2 e 4 dias de MA (* $p < 0,05$).

imunorreactividade a níveis significativos nas lâminas do corno ventral (VII-IX) bem como na lâmina X (Tabela 1, Figs. 2D, 2E e 4), ao passo que nos animais com 2 e 4 dias de MA estimulados, o mesmo não se verificou. Nas lâminas VII-IX foram encontradas diferenças significativas entre as fases inicial e tardia de MA ($p < 0,001$), bem como na lâmina X ($p < 0,01$).

Efeito da administração intratecal de PD98059 no comportamento reactivo à dor avaliado pelo teste da flexão do tornozelo

No dia da injecção intratecal, animais com 4 ou 14 dias de MA foram escolhidos ao acaso para a injecção de soro fisiológico ou PD98059. O valor médio da pontuação do teste de flexão do tornozelo foi obtido imediatamente antes da injecção e a tempos diferentes nos 90 min seguintes quer para os animais injectados com soro fisiológico ($n = 5$), quer para os animais com 4 ($n = 5$) ou 14 ($n = 5$) dias de MA e injectados com PD98059 (Fig. 5). De um modo geral, o comportamento nociceptivo foi alterado pela injecção de PD98059 ($p < 0,001$). No grupo controlo de ratos MA, a injecção de soro fisiológico não teve qualquer efeito. Estes animais foram submetidos a sucessivas manipulações do tornozelo, com a pontuação do teste de flexão do tornozelo a aumentar significativamente, quando comparada com a pontuação inicial ($p < 0,05$), indicando a ocorrência de alodinia grave.

No grupo com 4 dias de MA, a injecção de $1 \mu\text{g}$ de PD98059 induziu um diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da pontuação do

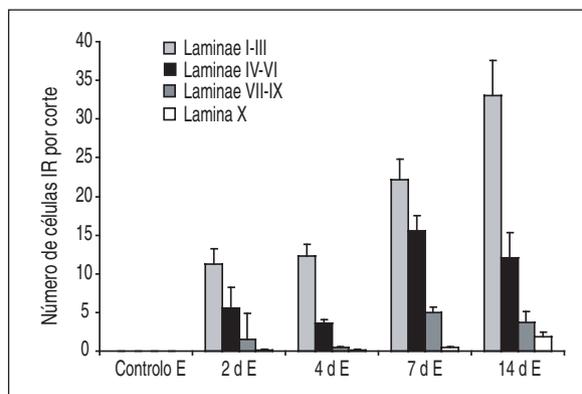


Figura 4. Número de células imunorreactivas (IR) para a forma fosforilada das ERKs nas diferentes lâminas em cortes de medula espinhal de ratos controlo ou monoartríticos (MA) aos 2 (2 d), 4 (4 d), 7 (7 d) e 14 dias (14 d). As diferenças estatísticas estão descritas na tabela 1. À medida que a inflamação progrediu, o número de células IR aumentou nas lâminas superficiais e profundas do corno dorsal. Aos 7 e 14 dias de MA, foi também observada imunorreactividade no corno ventral e na lâmina X.

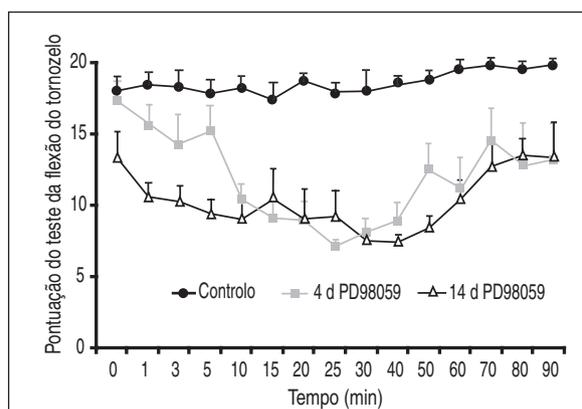


Figura 5. Pontuações obtidas no teste da flexão do tornozelo (média \pm erro médio) de animais monoartríticos (MA) injectados intratecalmente com soro fisiológico ou PD98059 ($n = 5$ em cada grupo experimental). O teste, desenvolvido para ratos MA (Butler e Weil-Fugazza, 1994), foi feito imediatamente antes da injecção (tempo 0) de soro fisiológico (círculos pretos), ou de PD98059 aos 4 ($1 \mu\text{g}$, quadrados cinzentos) e aos 14 dias ($2 \mu\text{g}$, triângulos brancos) de MA. Seguidamente, o teste foi efectuado a 14 tempos diferentes durante os 90 min seguintes. Nos grupos injectados com PD98059, verificou-se um decréscimo acentuado atingindo-se a pontuação mínima aos 30 min (ratos 4 d MA) e 40 min (ratos 14 d MA).

teste de flexão do tornozelo. Esta diminuição foi particularmente evidente entre os 10 e 50 min pós-injecção, tendo-se observado uma diminuição da pontuação do teste de flexão de tornozelo, a qual atingiu os valores mínimos de $6,3 \pm 0,5$ aos 25 min. Em seguida, as pontuações do teste de flexão do tornozelo começaram a aumentar novamente, e os animais demonstraram sinais de desconforto.

Nos animais com 14 dias de MA, 1 µg de PD98059 não produziu qualquer efeito evidente (dados não apresentados). No entanto, a injeção intratecal de 2 µg induziu uma diminuição na pontuação do teste de flexão do tornozelo, a qual ocorreu numa forma mais tardia e menos prolongada que no grupo de animais com 4 dias de MA, dado que as pontuações mínimas foram observadas apenas entre os 25 e 50 min, com valores mínimos de $6,7 \pm 0,5$ aos 40 min. Após este intervalo, os animais começaram a evitar a manipulação, tendo a pontuação do teste de flexão do tornozelo voltado aos valores iniciais. A análise estatística mostrou haver diferenças significativas entre este grupo e o grupo controlo ($p < 0,05$), mas não foram encontradas quaisquer diferenças entre os animais com 4 e 14 dias de MA.

Discussão

Vários investigadores documentaram a activação das ERKs por fosforilação, na medula espinal, causada por vários estímulos nócicos (Ji, et al., 1999; Karim, et al., 2001; Galán, et al., 2002; Pezet, et al., 2002; Galán, et al., 2003). Até agora, a maioria dos estudos utilizaram estimulação nócica aguda de patas posteriores não inflamadas, e existe apenas uma situação descrita de activação das ERKs após estimulação visceral (Galán, et al., 2003). No entanto, nenhum estudo foi ainda feito sobre como as condições inflamatórias crónicas podem afectar a activação das ERKs, na medula espinal, induzida por estímulos nócicos, ou como o uso de inibidores das ERKs podem influenciar o comportamento de animais com dor crónica inflamatória.

Activação das ERKs na medula espinal após estimulação de tornozelos normais e monoartríticos

Neste estudo, ratos a diferentes tempos após injeção de CFA apresentaram activação das ERKs 1 e 2 após serem submetidos a um estímulo mecânico (flexão de tornozelo), que pretende simular uma condição fisiológica (o movimento de caminhar). Além disso, ratos com exactamente o mesmo tempo de MA, mas que não foram submetidos ao estímulo, não apresentaram um número significativo de células marcadas para as pERKs 1 e 2. Outros estudos já demonstraram a expressão de c-Fos na medula espinal de ratos com tempos semelhantes de monoartrite (Schadrack, et al. 1998; Castro, et al., 1999). No nosso caso, à medida que a doença progrediu, foi observado um número cada vez maior de células pERKs positivas induzidas pelo estímulo. Isto está em contraste com a expressão de c-Fos em resposta a um estímulo térmico nócico, a tempos semelhantes, em que se verifica um aumento inicial seguido de uma diminuição dos núcleos positivos para c-Fos (Schadrack, et al., 1998). Contrariamente à ex-

pressão de c-Fos, que também pode ocorrer no lado contralateral à estimulação, a expressão de pERKs foi sempre ipsilateral ao tornozelo inflamado e estimulado.

Observámos um aumento importante no número de células IR nas lâminas superficiais (I-III) da medula espinal como resposta ao movimento da articulação inflamada. A activação das lâminas superficiais está normalmente associada a mecanismos de dor aguda (Coghill, et al., 1991; Porro e Cavazzuti, 1996), implicando a activação das ERKs no processamento da dor aguda ao nível espinal. É de realçar que a expressão de pERKs também estava aumentada nas lâminas mais profundas do corno dorsal, onde os neurónios que estão envolvidos na sensibilização central relacionada com condições inflamatórias crónicas parecem estar localizados (Lantéri-Minet, et al., 1993; Schadrack, et al., 1998; Tölle, et al., 1995). Do mesmo modo, é sabido que a actividade metabólica neuronal está aumentada em animais MA, quando medida pelo método da 2-desoxiglucose (Schadrack, et al., 1999). Para além disso, nesse mesmo estudo, os aumentos na actividade neuronal foram mais evidentes nas lâminas mais profundas (lâminas V-VI) do corno dorsal ipsilateral da medula espinal de ratos com 14 dias de MA, que foram submetidos ao estímulo da flexão do tornozelo inflamado (Schadrack, et al., 1999), correlacionando-se este facto com a expressão aumentada de c-Fos (Schadrack, et al., 1998) e com a activação das ERKs 1 e 2 observada neste trabalho. Curiosamente, foi detectado um aumento da actividade das ERKs (este trabalho) mas não da expressão de c-Fos (Schadrack, et al., 1998), no corno ventral e no canal central de ratos com 7 e 14 dias de MA estimulados. Do mesmo modo, a actividade metabólica neuronal estava aumentada nas mesmas regiões da medula espinal, em ratos MA de 14 dias submetidos a estimulação mecânica semelhante à que foi realizada neste estudo (Schadrack, et al., 1999).

Como foi discutido acima, as neurotrofinas são reguladores importantes da activação das ERKs após ligação aos receptores tirosina cínase. Na poliartrite, a activação aumentada das ERKs pode estar relacionada com um aumento de expressão do NGF e do seu receptor (Pezet, et al., 1999; Pezet, et al., 2000). Além disso, o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), outra neurotrofina importante, também pode dar um contributo significativo para o aumento da actividade destas cínases. A activação selectiva do seu receptor, receptor tirosina cínase B (TrkB), por estímulos nócicos (Pezet, et al., 2002) ou por ligação do BDNF, induz a activação das ERKs. Em condições de dor neuropática crónica, os níveis de BDNF estão aumentados (Ha, et al., 2001; Miletic e Miletic, 2002) e foram implicados na hiperalgesia inflamatória em ratinhos (Groth e Aanonsen, 2002). Logo, o BDNF poderá estar

também implicado no afluxo nócico aumentado durante a MA e contribuir para o aumento da activação das ERKs.

Além disso, está já bem estabelecido que a activação de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, metabotrópicos) induz a activação destas cínases (Kolch, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram uma relação directa entre a activação dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), mediadores neuronais importantes da nocicepção (Varney e Gereau, 2002), e a modulação da actividade das ERKs (Ferraguti, et al., 1999), enquanto que *in vivo* foi demonstrado que a activação do mGluR 1 e 5 por estímulos nócicos regula a activação das ERKs em neurónios da medula espinhal, sugerindo o seu envolvimento na dor inflamatória (Karim, et al., 2001). Na medula espinhal, a expressão de mGluR está aumentada em situações de inflamação crónica (Boxal, et al., 1998; Dolan, et al., 2003), o que os torna possíveis candidatos para explicar o aumento da actividade das ERKs.

No que diz respeito ao padrão temporal da activação das ERKs, não foram encontradas diferenças significativas no número de células IR observadas ao segundo ou quarto dias de inflamação. Isto acontece provavelmente porque estes grupos corresponderão à fase inicial da doença. Do mesmo modo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na actividade metabólica neuronal em diferentes lâminas da medula espinhal entre ratos com 2 e 4 dias de MA (Schadrack, et al., 1999). Adicionalmente, não se encontraram diferenças significativas entre o número de células pERKs IR observadas aos 7 e aos 14 dias de inflamação. Possivelmente, isto indica que, uma semana após a injeção de CFA, os mecanismos responsáveis pela activação das ERKs 1 e 2 nos neurónios espinhais foram modificados e que estas alterações se estabeleceram gradualmente e tornaram-se duradouras.

Por outro lado, foram observadas diferenças significativas entre as fases inicial (2-4 dias) e final (7-14 dias) de MA, com o número de células pERKs positivas aumentado na fase final. Mais uma vez, a comparação com a actividade metabólica neuronal é evidente, dado que os estudos com 2-desoxiglucose demonstraram haver valores de actividade metabólica significativamente aumentados na medula espinhal de ratos com 14 dias de MA, quando comparados com animais com 2 e 4 dias de inflamação (Schadrack, et al., 1999). Além disso, foi proposto que, durante as fases iniciais da doença, há o recrutamento do sistema de controlo inibitório nócico difuso (DNIC) com origem supra-espinhal (Danziger, et al., 1999; Danziger, et al., 2001). Esta regulação inibitória, proveniente de locais supra-espinhais, também foi sugerido por estudos de 2-desoxiglucose no rato MA (Neto, et al., 1999). Logo, isto poderia significar que, durante as fases iniciais de MA, 2 e 4 dias, a regulação inibi-

tória dos mecanismos espinhais de nocicepção é tal, que a actividade das ERKs está reprimida. Pelo contrário, na fase mais tardia dos 7 e 14 dias de MA, os processos inflamatórios crónicos podem induzir o desenvolvimento de uma modulação inibitória alternativa, que é, possivelmente, independente do DNIC e que com ele interfere, tal como já foi sugerido (Danziger, et al., 1999; Danziger, et al., 2001), reflectindo-se, provavelmente, num aumento da actividade das ERKs nestes tempos de MA.

Efeitos da inibição da actividade das ERKs através da injeção intratecal de PD98059

Tendo em conta o facto de se ter verificado que, em situações de MA, o número de células neuronais imunorreactivas para a forma fosforilada das ERKs estava aumentado, levantámos a hipótese de que a modulação da actividade das ERKs na medula espinhal, através do uso de inibidores específicos, poderia ter relevância funcional. Decidimos administrar PD98059 através de um cateter intratecal, de modo a permitir uma administração mais precisa e um efeito mais localizado. Tendo em conta que não encontrámos diferenças significativas entre os 2 e 4 dias e entre os 7 e 14 dias de MA, decidimos usar ratos com 4 e 14 dias de MA, de modo a efectuar o estudo dos efeitos do PD98059 nas fases inicial e tardia de monoartrite, respectivamente. Concluímos que, nas fases iniciais da doença, 1 µg do inibidor induziu diminuições significativas no comportamento nociceptivo dos animais, determinado pelo teste de flexão do tornozelo, ao passo que, para obter resultados semelhantes numa fase mais tardia de MA foi necessário administrar 2 µg do inibidor. Estes resultados são concordantes com as nossas observações de que na fase mais tardia de MA os níveis de actividade das ERKs, estimados pelo número de células imunorreactivas, foram significativamente superiores aos encontrados na fase inicial da doença.

Apesar de serem necessários mais estudos para testar as consequências da administração de PD98059, parece que o seu efeito hipoalgésico e de hipoexcitabilidade nos neurónios espinhais na inflamação periférica, tal como foi observado na MA, faz com que o PD98059 seja um bom candidato para uso terapêutico no controlo dos sintomas de hiperalgesia e alodinia associados à inflamação crónica periférica.

Bibliografia

- Aley K, Levine J. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci* 1999;19(6):2181-6.
- Bennett DLH, French J, Priestley JV, McMahon SB. NGF but not NT-3 or BDNF prevents the A fibre sprouting into laminae II of the spinal cord that occurs following axotomy. *Mol Cell Neurosci* 1996;8:211-20.
- Besse D, Weil-Fugazza J, Lombard MC, Butler SH, Besson JM. Monoarthritis induces complex changes in mu-, delta-, opioid- and kappa-opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Europ J Neurosci* 1992;223(2-3):123-31.
- Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain* 1992;48:73-81.

- Butler SH, Weil-Fugazza J. The foot-bend procedure as test of nociception for chronic studies in a model of monoarthritis in the rat. *Pharmacol Commun* 1994;4:327-34.
- Castro AR, Bowery N, Castro-Lopes JM. 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.
- Castro-Lopes JM, Tavares I, Tölle TR, Coito A, Coimbra A. Increase in GABAergic cells and GABA levels in the spinal cord in unilateral inflammation of the hindlimb in the rat. *Eur J Neurosci* 1992;4:296-301.
- Coghill RC, Price DD, Hayes RL, Mayer DJ. Spatial distribution of nociceptive processing in the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 1991; 65:133-40.
- Danziger N, Weil-Figazza J, Le Bars D, Bouhassira D. Alteration of descending modulation of nociception during the course of monoarthritis in the rat. *J Neurosci* 1999;19(6):2394-400.
- Danziger N, Weil-Figazza J, Le Bars D, Bouhassira D. Stage-dependent changes in the modulation of spinal nociceptive neuronal activity during the course of inflammation. *Europ J Neurosci* 2001;13:230-40.
- Derkinderen P, Ensen H, Girault JA. The ERKs/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 1999;10(5):24-34.
- Dray A, Urban L, Dickenson A. Pharmacology of chronic pain. *TIPS* 1994;15:190-7.
- Doubell TP, Mannion RJ, Woolf CJ. The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. Em: Wall PD, Melzack R, editores. *Textbook of pain*. 4.^a ed. Londres: Churchill Livingstone; 1999. p. 165-81.
- Galán A, López-García JA, Cervero F, Laird JM. Phosphorylation of spinal extracellular-signalling regulated kinase-1 and -2 by intraplantar carrageenan in rodents. *Neurosci Lett* 2002;322(1):37-40.
- Galán A, Cervero F, Laird JM. Extracellular signalling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;116:126-34.
- Grewal SS, York RD, Stork PJS. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:544-53.
- Groth R, Aanonsen L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or *trkB*, prevent inflammation-induced hyperalgesia. *Pain* 2002;100(1-2):171-81.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific phosphorylation in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 1999;2(12):1114-9.
- Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 2000;8:1-10.
- Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 2002;22:478-85.
- Karim F, Wang CC, 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.
- Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DLH, et al. Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1999;19:5138-48.
- Lewin MR, Walters ET. Cyclic GMP pathway is critical for inducing long-term sensitization of nociceptive sensory neurons. *Nat Neurosci* 1999;2(1):18-23.
- Neto FL, Schadrack J, Ableitner A, et al. Supraspinal metabolic activity changes in the rat during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience* 1999;94(2):607-21.
- Pezet S, Onteniente B, Grannec G, Calvino B. Chronic pain is associated with increased *TrkA* immunoreactivity in spinoreticular neurons. *J Neurosci* 1999;19(13):5482-92.
- Pezet S, Onteniente B, Jullien J, et al. Differential regulation of NGF receptors in primary sensory neurons by adjuvant-induced arthritis in the rat. *Pain* 2000;90:113-25.
- Pezet S, Malcangio M, Lever IJ, et al. Noxious stimulation induces *Trk* receptor and downstream ERKs phosphorylation in spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 2002;21:684-95.
- Porro CA, Cavazzuti M. Functional imaging studies of the pain system in man and animals. *Prog Brain Res* 1996;110:47-62.
- Schadrack J, Castro-Lopes JM, Avelino A, Zieglgansberger W, Tölle TR. Modulated expression of *c-Fos* in the spinal cord following noxious thermal stimulation of monoarthritic animals. *J Neurosci Res* 1998;53:203-13.
- Schadrack J, Neto FL, Ableitner A, et al. Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience* 1999; 94(2):595-605.
- Sluka K. Phosphorylation of the cAMP transduction cascade contributes to the mechanical hyperalgesia and allodynia induced by intradermal injection of capsaicin. *Br J Pharmacol* 1997;122:1165-73.
- Sluka K, Willis WD. Increased spinal release of excitatory amino acids following intradermal injection of capsaicin is reduced by a protein kinase G inhibitor. *Brain Res* 1998;798:281-6.
- Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 2001;76:1-10.
- Tölle TR, Schadrack J, Castro-Lopes JM, Zieglgansberger W. Immediate early genes in nociception. Em: Tölle TR, Schadrack J, Zieglgansberger W, editores. *Immediate early genes in the Central Nervous System*. Berlin: Springer; 1995. p. 51-77.
- Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 1997;14:2-31.
- Willis WD, Westlund KN, Carlton SM. *Pain*. Em: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 2.^a ed. San Diego: Academic Press; 1995. p. 725-50.
- Woolf CJ, Slater MW. Increasing the gain in pain. *Science* 2000;288:1765-8.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-10.

Artigo original

Efeito do Antagonista do Receptor de Glicina (Estricnina) no Tempo de Latência de Resposta de Neurónios da Medula Espinhal de Rato: um Estudo com Multieléctrodos

Helder Cardoso-Cruz¹, Clara M. Monteiro¹, Deolinda Lima^{1,2}
e Vasco Galhardo^{1,2}

Resumo

A administração de estricnina, um antagonista do receptor da glicina, desencadeia um estado de dor táctil persistente denominado por alodinia. Com o objectivo de estudar alterações no circuito populacional espinhal induzidas pela aplicação de estricnina, foram registados pequenos grupos de neurónios vizinhos antes e depois da sua aplicação. Neste estudo foi registada a actividade de 267 neurónios em 14 ratos anestesiados com uretano. Os registos foram levados a cabo com matrizes de 8 eléctrodos de tungsténio orientados rostrocaudalmente com um espaçamento entre si de 240 μm . A estimulação mecânica foi aplicada na pata posterior do rato, contralateral ao registo e consistiu em períodos de 60 s a 0,5 Hz de toque suave (não doloroso) e por períodos de 30 s de pressão nóxica. Após administração intratecal de estricnina, as respostas à estimulação foram avaliadas cada 15 min até um total de 3 h. A maior parte dos neurónios desenvolveu sinais de hiperexcitabilidade após aplicação de estricnina, traduzida por um aumento da actividade espontânea (151 células) ou por um aumento das respostas à estimulação táctil e/ou nóxica (116 células). Um total de 69 células que apresentaram respostas precisas à estimulação táctil foram seleccionadas para a análise do tempo de latência de resposta (TLR). Vinte e sete desses neurónios apresentaram uma diminuição do TLR ao estímulo após aplicação de estricnina. Esta diminuição variou entre 0,1 e 16,3 ms, com 17 células a apresentarem uma diminuição até 5 ms. O maior decréscimo ocorreu nos neurónios com valores de latência *naive* mais elevados. Os neurónios com aumento do TLR (12 células) apresentaram na maioria dos casos (9 células) uma variação de até 5,0 ms. Esta variação da latência poderá estar associada a mecanismos de sensibilização induzidos pela remoção da inibição glicinérgica das sinapses espinhais. Estes resultados sugerem que a diminuição do TLR poderá estar associada ao desenvolvimento da hiperexcitabilidade espinhal, provavelmente devido a um *unmasking* dos aferentes silenciosos.

Palavras-chave: Estricnina. Injecção intratecal. Dor. Medula espinhal. Sistema somatossensitivo.

¹Instituto de Biologia Molecular e Celular
Universidade do Porto, Portugal

²Instituto de Histologia e Embriologia
Faculdade de Medicina
Universidade do Porto, Portugal

Correspondência:

Vasco Galhardo,
Instituto de Biologia Molecular de Celular
Unidade de Morfofisiologia do Sistema Nervoso
Rua do Campo Alegre, 823
4150-180 Porto, Portugal
E-mail: galhardo@med.up.pt
URL: <http://users.med.up.pt/galhardo>

Introdução

Estudos farmacológicos têm sugerido que a transmissão da informação aferente na medula espinhal está sujeita a modulação por sistemas de receptores locais. A glicina e o GABA são dois aminoácidos neurotransmissores inibitórios envolvidos nesse processo, estando presentes na medula espinhal em altas concentrações (Pol e Gorcs, 1988; Todd e Sullivan, 1990). Recentes estudos em rato para identificação da localização dos receptores da glicina e GABA_A através da quantificação da expressão da proteína fos a nível laminar, induzida pela aplicação de antagonistas selectivos destes receptores (estricnina e picrotoxina, respectivamente), demonstraram que os receptores da glicina se encontram concentrados nas lâminas III-VI, enquanto que os receptores GABA_A se encontram distribuídos pelas lâminas I-VI (Cronin, et al., 2004).

A activação directa dos receptores de glicina e GABA na medula espinhal resulta numa forte corrente inibitória da actividade espontânea e de resposta a estímulos a nível de neurónios secundários (Lin, et al., 1994). O bloqueamento dos receptores de glicina e GABA na medula espinhal mediante a utilização de antagonistas selectivos resulta num aumento da actividade de fundo, das respostas à estimulação periférica (Yaksh, 1989; Lin, et al., 1994; Peng, et al., 1996; Sotgiu e Biella, 2002) e em alterações a nível do campo receptivo dos neurónios (McGaraunghy e Henry, 1998). Estudos em animais não anestesiados nos quais foram aplicadas doses subconvulsivas de estricnina (antagonista do receptor da glicina) e bicuculina (antagonista do receptor de GABA_A) revelaram uma marcada hiperactividade espinhal para estímulos inócuos (Bagust, et al., 1981; Beitz e Larson, 1985). Estes dados sugerem que a libertação de glicina e GABA na medula espinhal pode modular funções sensoriais por activação tónica desses receptores (Lin, et al., 1994, 1996). O antagonista do receptor espinhal da glicina, a estricnina, produz um rápido e reversível estado de alodinia no rato (Sotgiu e Biella, 2002). Esta hipersensibilidade consiste na redução da intensidade do estímulo que é necessário aplicar para desenvolver comportamentos associados a dor que, geralmente, correspondem a um aumento da excitabilidade dos neurónios espinhais (sensitização central) (Coderre e Melzack, 1992; Sivilotti e Woolf, 1994; Lin, et al., 1994, 1996; Peng, et al., 1996; Sherman, et al., 1997). Há evidências que sugerem que transmissores excitatórios ou neuromoduladores libertados pelos aferentes primários nociceptivos podem induzir sensitização central associada a um comportamento alodínico (Sivitotti e Woolf, 1994). Todavia, a perda da inibição pode também resultar num aumento da excitabilidade. A regulação do balanço excitatório e inibitório

pelos sistemas de receptores espinhais glicinérgicos e GABAérgicos é uma chave importante para explicar como a diminuição na eficiência dos circuitos espinhais inibitórios pode contribuir para doenças associadas ao processamento sensorial da dor (Sivitotti e Woolf, 1994).

O presente trabalho teve como objectivo a análise de alterações no circuito populacional espinhal induzidas pela administração de estricnina. Para esse efeito foram registados pequenos grupos de neurónios espinhais vizinhos antes e depois da aplicação de estricnina, a fim de caracterizar os efeitos na resposta nociceptiva e no comportamento dos neurónios à estimulação táctil.

Material e métodos

Neste estudo foram utilizados 14 ratos machos adultos *Sprague-Dawley* (250-400 g). Os animais foram anestesiados com uretano (1,5 mg/kg, i.p.) e em seguida colocados no aparelho de estereotaxia para realização de uma laminectomia entre as vértebras T11 e L2. A vértebra mais rostral e a mais caudal foram fixas e a dura mater foi removida na área exposta para promover o registo celular. A medula espinhal foi coberta com óleo mineral para evitar desidratação superficial. Após a indução da anestesia a cada animal foi administrada uma dose de solução de sulfato de atropina (0,02 mg/kg, s.c.) e 1 ml/h de soro (Sac. 2% p/v em NaCl 0,9% p/v, s.c.) durante a experiência. O nível de anestesia e paralisia da musculatura foi testado regularmente através da análise do reflexo palpebral, do recolher das patas e dos reflexos à compressão da cauda. A temperatura corporal foi monitorizada através de um termómetro rectal e mantida a 37 °C por *feedback* com uma manta homeotérmica de aquecimento.

No registo da actividade extracelular foram utilizadas matrizes contendo oito eléctrodos de tungsténio (FHC, Bowdoinham ME, USA) com orientação rostrocaudal, espaçados entre si 240 µm com uma impedância variando entre 4-7 MΩ. Os neurónios que respondiam à estimulação da pata posterior contralateral foram registados entre as lâminas II e V da medula espinhal. A estimulação aplicada consistiu em períodos de 60 s de toque suave aplicado por um servo robótico (Robix, Advanced Design Inc, Arizona, USA) a uma frequência de 0,5 Hz e a estimulação dolorosa em períodos de 30 s de pressão contínua aplicada por uma pinça cirúrgica. O campo receptivo das células foi mapeado por estimulação mecânica e as células foram classificadas de acordo com as suas respostas aos estímulos: neurónios de escala dinâmica larga (WDR, *wide-dynamic-range*), neurónios de limiar baixo (LT, *low-threshold*), neurónios nociceptivos específicos (NS, *nociceptive-specific*) e neurónios sem resposta a

estímulo (NR, *non-responsive*) (Chung, 1986). Os neurónios WDR respondiam a todos os estímulos, os LT respondiam mais vigorosamente à estimulação táctil, enquanto aos neurónios NS respondiam exclusivamente à estimulação nóxica. Após a caracterização *naive* das respostas das células, foi administrado no local de inserção da matriz de eléctrodos de registo com uma seringa de Hamilton 100 nmol de estriquina (2 μ l) (Sigma Chemicals) na superfície da medula espinal. As respostas à estimulação foram avaliadas cada 15 min até um total de 3 h. Todas as soluções utilizadas foram preparadas no período prévio ao início da experiência. A dissolução das substâncias foi feita em solução artificial cerebrospinal (ACSF) (151,1 mM Na⁺, 2,6 mM K⁺, 0,9 mM Mg²⁺, 1,3 mM Ca²⁺, 122,7 mM Cl⁻, 21,0 mM HCO⁻, 2,5 mM HPO₄²⁻, 3,5 mM dextrose, pH = 7,4). No final de cada experiência, o local de registo foi assinalado através da injeção de corrente DC (1,19 mA durante 30 s) através de um dos filamentos de tungsténio. A medula foi posteriormente removida e armazenada em solução de paraformaldeído a 4% (v/v) durante 5 dias, e depois transferida para soluções de sacarose de concentrações crescentes 10-30% (p/v) até ao momento de secionamento em fatias de 50 μ m. Os cortes foram montados em lâminas e corados com tiona para identificação histológica do local de registo ao microscópio óptico.

Para a determinação do tempo de latência de resposta (TLR) foi utilizado um gerador de TTL (Master-8, A.M.P.I, Israel). Este gerador de TTL foi responsável pelo envio de um sinal com duração precisa (5 volts, 0,5 Hz) ao estimulador robótico com a finalidade de iniciar a sua actividade e outro em simultâneo ao sistema de registo da actividade neuronal, correspondendo o TLR ao intervalo de tempo entre a aplicação do estímulo táctil no campo receptivo de um neurónio e a resposta do mesmo. A actividade neuronal foi registada com um processador de aquisição multicanal (MAP, Plexon Inc, Dallas, Texas) e analisada em *off-line* através de histogramas de actividade (PSTH, *peristimulus rate histograms*) gerados a partir do *software Neuroexplorer* (Nex Technologies, versão 2). As análises complementares foram desenvolvidas em Matlab (*Release* 12.1, MathWorks, Inc). A resposta de cada neurónio à estimulação mecânica foi quantificada e expressa em impulsos por segundo (Hz). A significância estatística entre os períodos de estimulação e espontâneo foi avaliada através do teste de análise variância *two-way* (ANOVA) do tipo Kolmogorov-Smirnov. Foi considerado existir significância para $p < 0,05$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Este estudo seguiu as linhas éticas para a experimentação em animais impostas pela Directiva da Comunidade Europeia n.º 86/609/EEC, de 24 de Novembro de 1986.

Resultados

Os resultados a seguir apresentados estão baseados no registo de 267 neurónios ($19,0 \pm 5,54$ neurónios por experiência) na medula espinal ao nível T13-L4, com um deslocamento dorso-ventral variando 300-700 μ m, sendo a localização estimada dos neurónios entre as lâminas III e V.

Após 5-10 min do início da aplicação da estriquina, um número significativo de neurónios apresentou sinais de hiperexcitabilidade: um aumento da actividade espontânea (151 células) ou um aumento das respostas à estimulação táctil e/ou nóxica (116 células). Cento e catorze neurónios alteraram o seu padrão de actividade, ficando silenciosos, deixando ou passando a responder à estimulação. No conjunto dessas células, 43 neurónios iniciaram actividade, 20 tornaram-se silenciosos, 2 deixaram de responder à estimulação, 15 passaram a responder à estimulação e 34 neurónios alteraram o seu tipo de resposta ao estímulo depois da estriquina. A maioria dos neurónios com respostas tácteis precisas seleccionados para a determinação do tempo de latência de resposta (TLR) ao estímulo inócuo apresentaram uma diminuição da sua latência (27 células em 69).

Actividade espontânea

A aplicação de estriquina na maioria dos neurónios elevou a linha base de actividade que, por volta dos 45-60 min, retornou ao nível inicial do período controlo. Todavia, é de assinalar também o facto de existirem células que sofrem alterações na sua taxa de disparo mas não voltam a recuperar o nível inicial. Na figura 1 estão representadas algumas alterações típicas induzidas pela estriquina na actividade espontânea de células em animais diferentes. Neste estudo, após aplicação de estriquina, 86 células (Fig. 1A-B) apresentaram um aumento da actividade espontânea (das quais apenas 64 retomaram o nível inicial), 56 células (Fig. 1C-D) uma diminuição (das quais apenas 25 retomaram o nível inicial) e 137 células não apresentaram qualquer alteração (Fig. 1F).

O aumento da actividade espontânea das células teve início entre os 2-5 min após aplicação, tendo atingido um pico de actividade máxima cerca dos 15 min, permanecendo constante durante cerca de 30 min, tendendo a decrescer gradualmente após 45-60 min do início da aplicação (Fig. 1A). Uma hora após a aplicação da estriquina na maioria das células o nível da actividade espontânea é comparável ao período controlo (pré-aplicação). Por outro lado, o grupo de células que evidenciaram uma redução e/ou silenciamento da actividade espontânea após estriquina, nestas 16 apresentaram uma diminuição pelos 2 min, em outras a diminuição foi mais gradual, não existindo um comportamento padrão (40 células). Também neste grupo, algu-

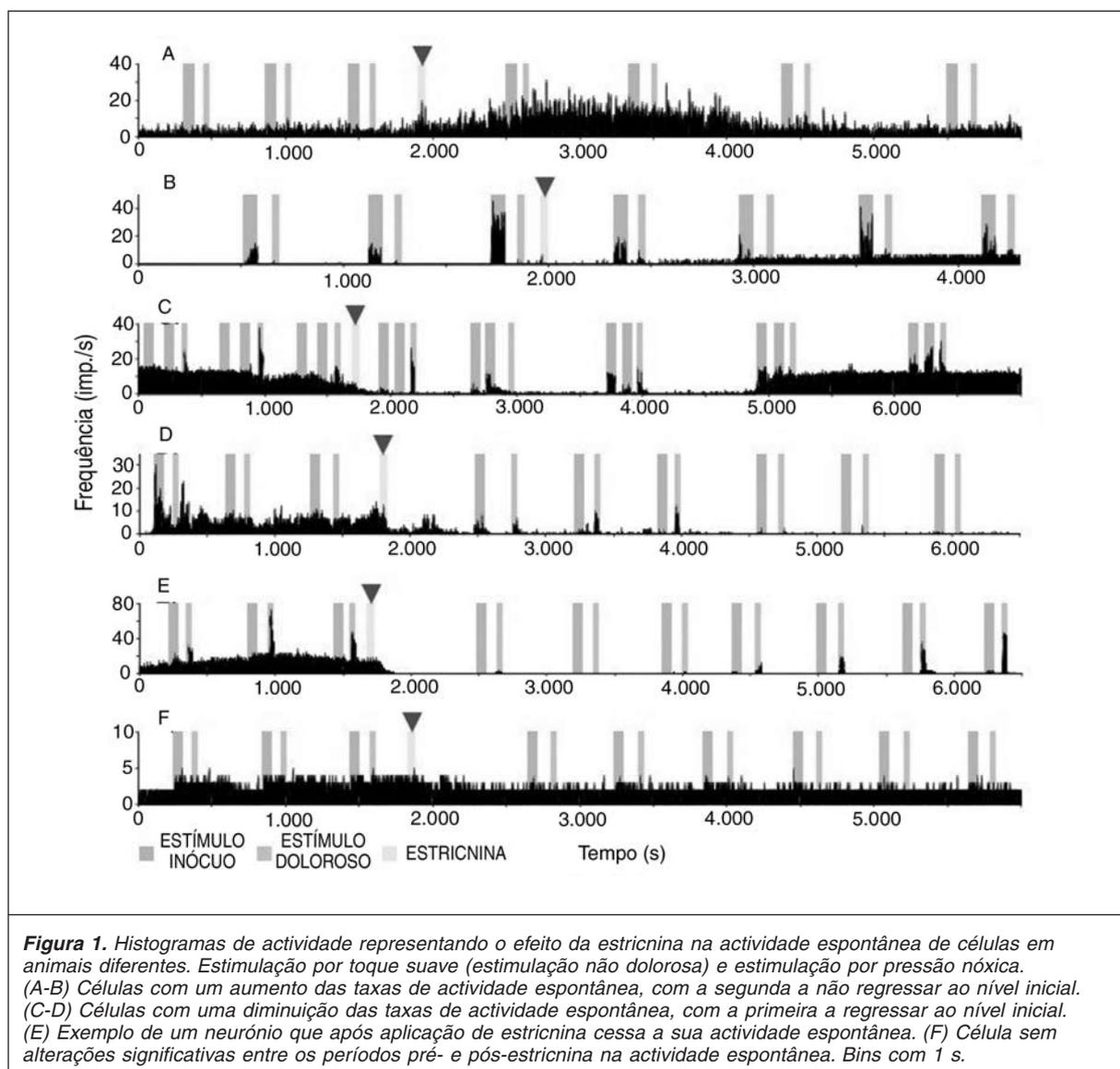


Figura 1. Histogramas de actividade representando o efeito da estricnina na actividade espontânea de células em animais diferentes. Estimulação por toque suave (estimulação não dolorosa) e estimulação por pressão nóxica. (A-B) Células com um aumento das taxas de actividade espontânea, com a segunda a não regressar ao nível inicial. (C-D) Células com uma diminuição das taxas de actividade espontânea, com a primeira a regressar ao nível inicial. (E) Exemplo de um neurónio que após aplicação de estricnina cessa a sua actividade espontânea. (F) Célula sem alterações significativas entre os períodos pré- e pós-estricnina na actividade espontânea. Bins com 1 s.

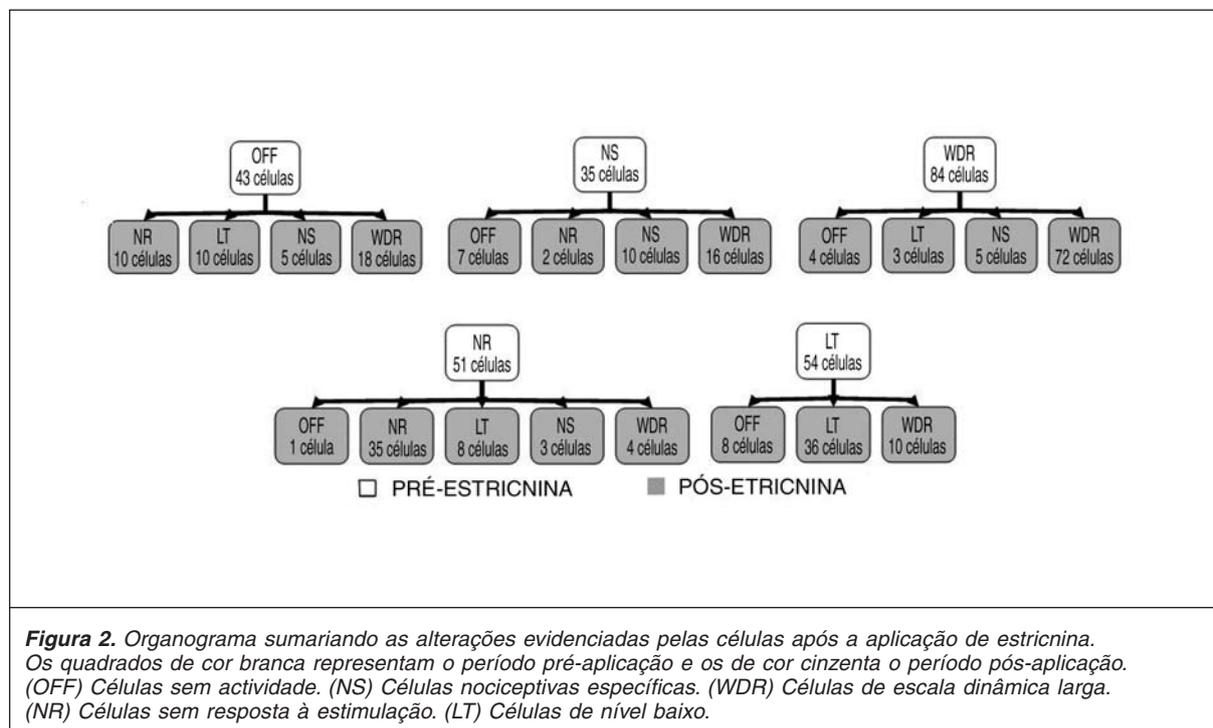
mas células (31 em 56 células) não regressaram ao nível inicial de actividade (Fig. 1D), havendo mesmo alguns neurónios (20 em 56 células) que cessaram a sua actividade espontânea (Fig. 1E). Estas células, ao contrário das anteriores, não apresentaram um período preferencial para a acção da estricnina. Através da análise do local de registo de cada célula não foi possível concluir qualquer correlação entre as alterações de actividade espontânea e a lâmina espinhal onde foram registadas.

Respostas à estimulação mecânica inócua e nóxica

A aplicação de estricnina causou um aumento da actividade espontânea e do tipo de respostas à estimulação. Através dos dados obtidos foi possível verificar a existência de um elevado número de células NS, que após estricnina modificou o seu tipo de resposta (25 células em 35). No gru-

po de células com características LT, somente 18 em 54 alteraram o seu tipo de resposta ao estímulo. O grupo de células com características WDR apresentou um pequeno número de células com alterações (somente 12 das 84 iniciais). No grupo de células com apenas actividade espontânea (NR, 51 células) 16 apresentaram alterações, entre as quais, 8 passaram a possuir características LT, 3 a NS, 4 a WDR e uma tornou-se silenciosa. Na figura 2 estão representadas algumas alterações características evidenciadas pelos neurónios a nível do tipo de resposta à estimulação, entre o período controlo (pré-aplicação) e após aplicação de estricnina.

De acordo com o tipo de resposta ao estímulo, houve um aumento do número de neurónios WDR (de 84 para 120) e ainda uma redução do número de NS (de 35 para 23), após a estricnina. Os restantes grupos característicos de células não apresentaram alterações significativas.



Os neurónios LT variaram entre 54 e 57 e os NR sofreram uma diminuição de 51 para 47. Tal como já foi referido, a aplicação de estricnina induziu um aumento da hiperexcitabilidade dos neurónios espinhais que, em alguns casos, foi traduzido por um aumento da actividade espontânea e/ou por um incremento das respostas ao estímulo aplicado. Quando analisado o período 0-60 min após estricnina nas células que apresentavam respostas ao estímulo inócua e/ou doloroso (200 células), foi possível constatar um aumento do nível de resposta da maioria das células (116 células). Nessas células, 20 aumentaram as respostas à estimulação inócua (Fig. 3B), 15 à estimulação dolorosa e 77 células a ambos tipos de estimulação. Por outro lado, 29 células revelaram uma redução do nível de resposta ao estímulo. Nesse grupo, 4 células diminuíram a resposta ao estímulo inócua (Fig. 3C), 7 ao doloroso e 18 a ambos estímulos. Cinquenta e cinco células não apresentaram qualquer alteração durante o referido período (Fig. 3D).

Tempo de latência de resposta (TLR)

Um total de 69 células que apresentaram respostas precisas à estimulação táctil foram seleccionadas para a análise do tempo de latência de resposta (TLR). Este valor corresponde ao intervalo de tempo entre a aplicação do estímulo táctil pelo estimulador robótico no campo receptivo de um neurónio e a resposta do mesmo. Os valores de TLR foram automaticamente calculados utilizando um algoritmo computacional, capaz de detectar o valor médio dos três pontos mais elevados do primeiro pico aferido através

do histograma de perievento com um *bin* de 1 ms. Com o nosso estimulador robótico, o intervalo de latência dos neurónios ficou distribuído entre 60 e 100 ms, com a maioria das células apresentando um TLR entre os 70 e 85 ms (Fig. 4.). Foram consideradas diferenças de TLR entre os períodos pré- e pós-aplicação de estricnina, quando o valor de latência se revelou ser pelo menos duas vezes superior ao erro padrão quando comparado com o período controlo (pré-aplicação de estricnina).

Do grupo de células estudado, um número significativo apresentou uma diminuição do TLR ao estímulo após estricnina (27 células em 69, 39,1%) (Fig. 4B). Este decréscimo variou entre os 0,1 e 16,3 ms, com 17 células apresentando uma diminuição até 5 ms (Fig. 4D). A diminuição mais significativa ocorreu nos neurónios com valores de latência *naive* mais elevados. Os neurónios com um aumento do TLR (12 em 69 células, 17,4%) variaram até 5 ms na maioria dos casos (9 células) (Fig. 4C). Trinta neurónios não apresentaram qualquer alteração no valor TLR após aplicação de estricnina.

Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que a aplicação de estricnina – antagonista do receptor da glicina na medula espinhal –, produz uma diminuição do tempo de latência de resposta dos neurónios espinhais somatossensitivos. O registo de 267 células comprovou também que a aplicação de estricnina é capaz de modular a actividade espontânea e as respostas das células à estimulação. Estes mecanismos

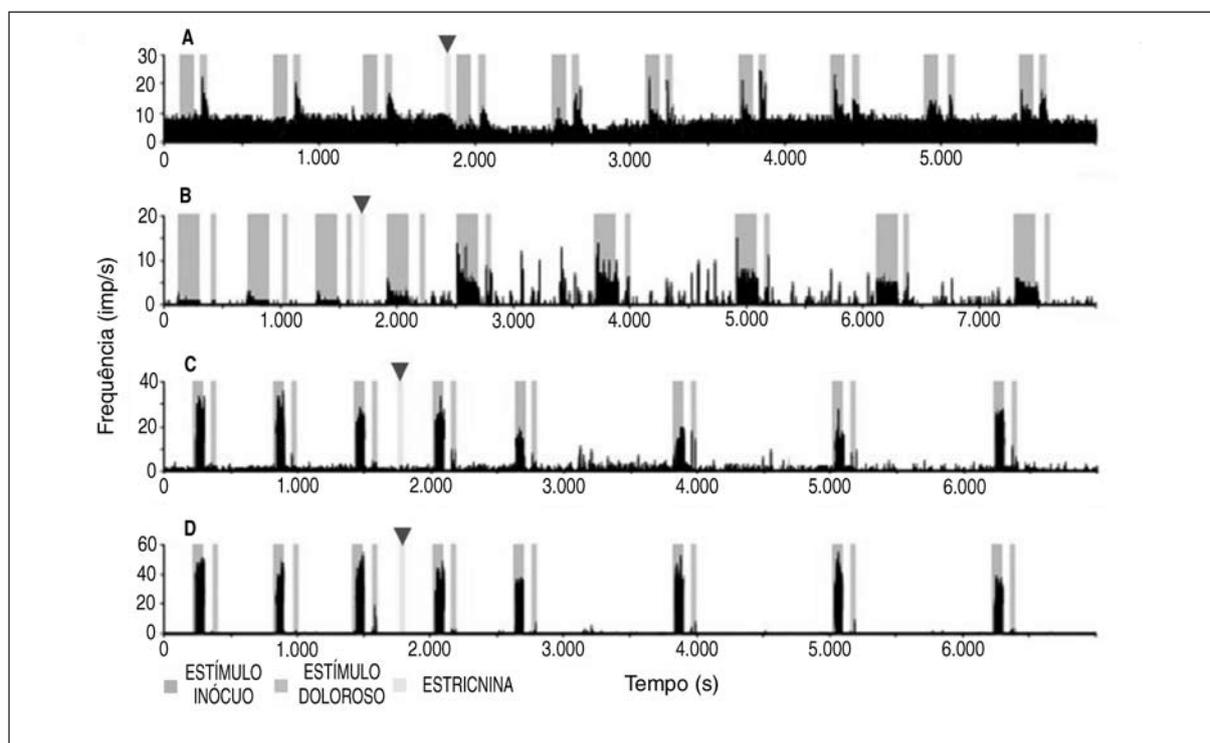


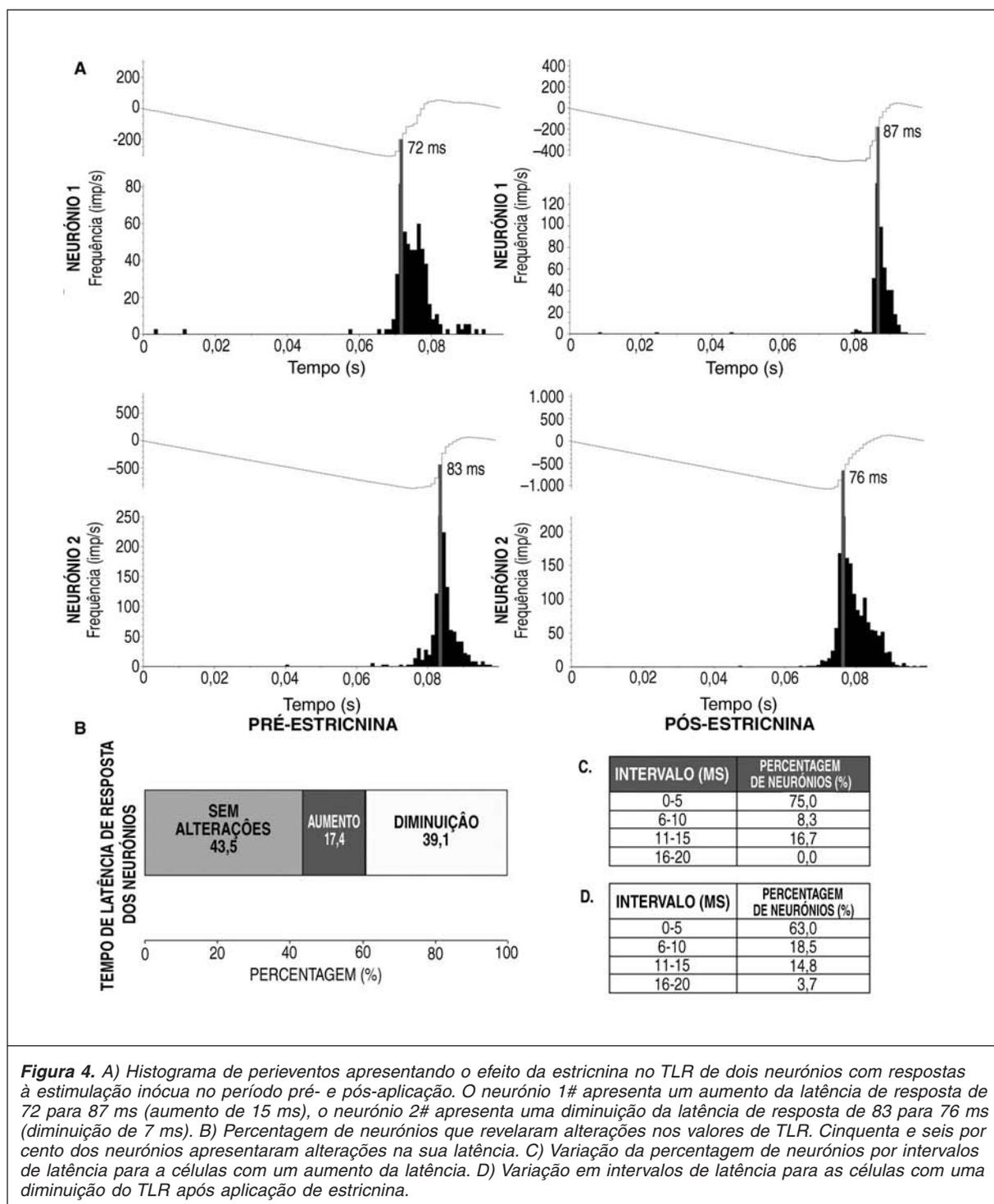
Figura 3. Histogramas de actividade representando o efeito da estriçnina na resposta neuronal. Estimulação por toque suave (estimulação não dolorosa) e estimulação por pressão nóxica. A) Célula com alterações no tipo de resposta à estimulação, pré-estriçnina respondendo somente ao estímulo nóxico e pós-estriçnina respondendo a ambos estímulos. B) Célula respondendo antes da estriçnina à estimulação táctil a uma frequência de 1-3 Hz, apresentando um aumento do nível de resposta para 5-8 Hz pós-estriçnina. C) Neurónio que revela uma diminuição do nível da sua resposta à estimulação táctil após aplicação de estriçnina (de 30-35 Hz para 15-25 Hz) retomando o nível inicial após 60 min. D) Célula sem alterações significativas entre os períodos pré- e pós-estriçnina nos níveis de resposta à estimulação. Bins com 1 s.

de modulação levaram ao aparecimento de um número significativo de neurónios com um aumento das respostas aos estímulos inócuos e/ou nóxicos, um aumento da sua actividade espontânea, ou por alterações do seu padrão de actividade.

A análise da actividade espontânea permitiu constatar a existência de um aumento do nível basal de actividade após a administração de estriçnina. Trabalhos anteriores mostraram um aumento da excitabilidade espinhal aquando da remoção da inibição espinhal tónica, induzida por estriçnina (Seltzer, et al., 1991; Sivilotti e Woolf, 1994; Dickenson, et al., 1997). Outros trabalhos mostraram que a activação espinhal dos receptores glicinérgicos ou GABAérgicos desencadeia uma inibição das respostas dos neurónios do tracto espinhotalâmico (STT) aos estímulos nóxicos periféricos (Lin, et al., 1994, 1996). Por outro lado, o modelo inverso de bloqueamento dos receptores glicinérgicos e GABAérgicos resulta num aumento da actividade de fundo e das respostas à estimulação periférica. Esta informação sugere que a libertação de glicina e GABA pode funcionar como um modelador das funções sensoriais espinhais. Outros investigadores correlacionam o aumento da actividade espontânea

com mecanismos de sensibilização com origem central induzidos pelo processamento de *inputs* inócuos e nóxicos (Sivilotti e Woolf, 1994; Lin, et al., 1994, 1996; Peng, et al., 1996; Sherman, et al., 1997).

Através da classificação dos neurónios de acordo com a sua resposta à estimulação no período controlo e período após estriçnina foi possível constatar um elevado número de células NS que alteraram o seu tipo de resposta para WDR. Estudos desenvolvidos por Sherman, et al. demonstraram que células NS do tálamo medial passam a responder aos estímulos tácteis após aplicação de estriçnina a nível medular (Sherman, et al., 1997). Estes resultados comprovam o possível envolvimento das vias nociceptivas ascendentes e das estruturas talâmicas na expressão de doenças de cariz doloroso. Funcionando também como uma justificação para o facto de *inputs* inócuos na medula espinhal, poderem promover estados de dor associada a mecanismos de origem central, nos quais o tálamo medial pode estar envolvido nomeadamente no processo mediado pela estriçnina. Outro facto importante foi o de apenas um pequeno número de células com características LT e WDR ter modificado o seu padrão de resposta. Na



classificação global das respostas das células nos dois períodos (pré- e pós-estriçnina) é também de assinalar o facto de o número de células LT e NR não se ter alterado significativamente, enquanto o número de células WDR revelou um importante acréscimo e o número de NS uma redução.

A análise do período de 60 min após a aplicação de estriçnina mostrou a existência de alterações a nível da amplitude das respostas das

células à estimulação. No grupo mais significativo de células (116 em 200) esta alteração foi no sentido do aumento do nível de resposta para o mesmo estímulo. Este facto pode estar associado a uma sensitização da medula espinal induzida pela redução da inibição dos interneurónios da via glicinérgica pela estriçnina. Por outro lado, esta sensitização poderá estar aco- plada ao desenvolvimento de alodinia e hiperalgia secundária, por redução da sensibilização

dos receptores da glicina associado a um *unmasking* de *inputs* aferentes inibitórios.

A alteração do nível de resposta à estimulação pode também estar ligada a mecanismos descendentes de origem central. Neste caso, os *inputs* aferentes inócuos da medula espinhal poderão estar envolvidos na produção de dor associada a mecanismos centrais. Existem dois mecanismos que podem potenciar a sensibilização central: um aumento da excitabilidade produzida por transmissores ou neuromoduladores excitatórios ou uma diminuição na inibição. Dados publicados na literatura comprovam a capacidade da aplicação de estricnina poder promover uma modulação de *inputs* sensoriais inócuos espinhais (Sherman, et al., 1996, 1997), sendo este efeito iniciado a nível dos aferentes primários não nociceptivos (Sherman, et al., 1996, 1997; Baba, et al., 1999).

Existem diversos estudos sobre alodinia abordando os mecanismos envolvidos no processamento de estímulos inócuos que podem ser percebidos como dolorosos. Estes trabalhos analisam comportamentos anormais derivados da libertação da inibição através da aplicação de antagonistas selectivos da glicina e GABA (Yaksh, 1989; Sherman e Loomis, 1994; Sivilotti e Woolf, 1994; Woolf e Doubell, 1994). Neste paradigma sensorial foi considerada a hipótese de que a resposta das fibras aferentes do tipo A, que normalmente transportam sinais periféricos não dolorosos, sejam facilitadas pelo desaparecimento de inibição tónica sobre as sinapses dos aferentes primários, ou pela co-activação de receptores de NMDA (Woolf e King, 1989; Woolf e Doubell, 1994).

O mecanismo de alteração do tempo de latência de resposta das células à estimulação inócuo pode estar associado a um efeito modulatório da estricnina, que num número significativo de células estudadas levou a uma diminuição do tempo de resposta ao estímulo. Os presentes resultados sugerem que o aumento da excitabilidade a partir da libertação das conexões silenciosas pode influenciar a diminuição dos valores de TLR nos neurónios espinhais e que o aumento dos níveis de actividade sublimiar de aferentes primários pode contribuir para o desenvolvimento de estados de dor-alodinia.

Agradecimentos

Este estudo foi suportado pelos projectos FCT (POCTI/NSE/38995/2001) e EU (IST-2001-34892).

Bibliografia

- Baba H, Doubell TP, Woolf CJ. Peripheral inflammation facilitates A β fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* 1999;19:859-67.
- Bagust J, Green A, Kerkut G. Strychnine sensitive inhibition in the dorsal horn of mammalian spinal cord. *Brain Research* 1981;217:425-9.
- Beitz A, Larson A. Inhibition of intrathecally administered picrotoxin- and bicuculline-induced convulsions in mice pipercolic acid or GABA. *Eur J Pharmacol* 1985;114:181-7.
- Chung JM, Surmeir DJ, Lee KH, et al. Classification of primate spinothalamic and somatosensory thalamic neurons based on cluster analysis. *J Neurophysiology* 1986;56:308-27.
- Coderre T, Melzack R. The contribution of excitatory aminoacids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *Journal of Neuroscience* 1992;12:3665-70.
- Cronin JN, Bradbury EJ, Lidieth M. Laminar distribution of GABA(A)- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity. *Pain* 2004;112:156-63.
- Dickenson AH, Chapman V, Green GM. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen Pharmacol* 1997;28:633-8.
- Lin Q, Peng YB, Willis W. Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. *J Neurophysiology* 1996;76(2):1005-14.
- Lin Q, Peng Y, Willis D. Glycine and GABA_A antagonists reduce the inhibition of primate spinothalamic tract neurons produced by stimulation in periaqueductal gray. *Brain Research* 1994;654:286-302.
- McGaraughty S, Henry J. The effects of strychnine, bicuculline, and ketamine on immersion-inhibited dorsal horn convergent neurons in intact and spinalized rats. *Brain Research* 1998;784:63-70.
- Peng YB, Lin Q, Willis WD. Effects of GABA and glycine receptor antagonists on the activity and PAG-induced inhibition of rat dorsal horn neurons. *Brain Research* 1996;736:189-201.
- Pol A, Gorcs T. Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *Journal of Neuroscience* 1988;8:472-92.
- Seltzer Z, Cohn S, Ginzburg R, Beilin BZ. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain* 1991;45:69-75.
- Sherman SE, Luo L, Dostrovsky JO. Spinal strychnine alters response properties of nociceptive-specific neurons in rat medial thalamus. *J Neurophysiology* 1997;78:628-37.
- Sherman S, Loomis CW. Morphine insensitive allodynia is produced by intrathecal strychnine in the lightly anesthetized rat. *Pain* 1994;56:17-29.
- Sherman S, Loomis CW. Strychnine-sensitive modulation is selective for non-noxious somatosensory input in the spinal cord of the rat. *Pain* 1996;66:321-30.
- Sivilotti L, Woolf C. The contribution of GABA_A and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiology* 1994;72:169-79.
- Sotgiu M, Biella G. NMDA and strychnine diversely modulate spinal dorsal horn noxious responsiveness in normal rats: potential significance to sensory disorders in neuropathic pain. *Somatosensory & Motor Research* 2002;19(1):18-23.
- Todd A, Sullivan A. Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 1990;296:496-505.
- Woolf CJ, Doubell T. The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low-threshold A beta-fibre inputs. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:525-34.
- Woolf CJ, King AE. Subthreshold components of the cutaneous mechanoreceptors fields of dorsal horn neurons in the rat lumbar spinal cord. *J Neurophysiology* 1989;62:907-16.
- Yaksh T. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 1989;37:111-23.

Artigo original

Caracterização do Novo Composto Iodoresiniferatoxina (IRTX): Efeitos no Receptor Vanilóide

Ana Charrua^{1,2}, António Avelino^{1,2}, Célia D. Cruz^{1,2}, Francisco Cruz^{2,3}

Resumo

O receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) tem um papel importante no controlo da micção em situações patológicas. A necessidade de aprofundar o conhecimento sobre o seu funcionamento levou à criação de antagonistas. A capsazepina, o antagonista do TRPV1 mais utilizado, é inespecífico nalgumas condições experimentais. Para ultrapassar este problema, foi sintetizado um novo antagonista do TRPV1, a iodoresiniferatoxina (IRTX). Este antagonista, uma forma iodada do ligando ultrapotente resiniferatoxina (RTX), mostrou em estudos *in vivo* ter características de agonista. Tomando estas discrepâncias em consideração, estudámos os efeitos da IRTX no reflexo miccional, e se estes são mediados através do TRPV1. Para tal, efectuámos análises funcionais da bexiga. A IRTX aumentou a frequência urinária, um efeito que revelou ser mediado pelo TRPV1. Este composto também demonstrou ter a capacidade de dessensibilizar o receptor.

Palavras-chave: Iodoresiniferatoxina. Receptor vanilóide. Capsaicina. Capsazepina. Bexiga.

Introdução

O receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) é activado por substâncias vanilóides como a capsaicina e a resiniferatoxina (Sternier, et al., 1999), temperaturas acima de 43 °C (Caterina, et al., 1997) e por endocannabinóides como a anandamida (Smart, et al., 2000).

A importância do TRPV1 na regulação da micção e o papel que desempenha na dor inflamatória são cada vez mais evidentes (para revisão ver Szallasi, 2002), o que justifica a necessidade de se desenvolver estratégias farmacológicas que envolvem a síntese de antagonistas específicos para estudar o receptor e manipular a sua actividade.

A capsazepina (CPZ), o antagonista do TRPV1 mais utilizado, tem capacidade de inibir respostas mediadas pela capsaicina (Bevan, et al., 1992). Contudo, estudos efectuados *in vivo* demonstraram que este composto é pouco selectivo (Di Marzo, et al., 2000), justificando a necessidade de se encontrarem novos antagonistas do TRPV1.

Em 2001, Wahl, et al. sintetizaram uma forma iodada da resiniferatoxina (RTX), a iodoresiniferatoxina (IRTX), que possui grande afinidade para o TRPV1, e apresentou acção analgésica (Wahl, et al., 2001). Estudos electrofisiológicos demonstraram que a IRTX antagoniza correntes iónicas induzidas pela aplicação de capsaicina, ácido e temperaturas elevadas, de um modo mais potente que a CPZ (Seabrook, et al., 2002). Outros estudos de electrofisiologia demonstraram que a IRTX também tem capacidade de inibir a libertação de glutamato induzida pela anandamida (Marinelli, et al., 2003). Apesar de se comportar como um antagonista do TRPV1, a IRTX possui algumas características de agonista deste receptor, semelhantes às observadas na molécula da capsaicina, se injectada intraplantarmente em ratos (Seabrook, et al., 2002).

Baseando-nos nestes resultados, e dado que a bexiga do rato possui uma elevada densidade de fibras aferentes primárias que expressam o receptor vanilóide (Avelino, et al., 2002) propusemo-nos esclarecer o efeito da aplicação tópica da IRTX na frequência miccional.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados ratos fêmea da estirpe Wistar (250-300 g) provenientes da colónia do IBMC

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

²IBMC, Porto, Portugal

³Serviço de Urologia, Hospital de São João, Porto, Portugal

(Porto, Portugal), tendo-se efectuado todos os esforços para minimizar a dor, o sofrimento e o número de animais utilizados. Para tal, foram respeitadas todas as directivas éticas para a investigação da dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983) e os métodos aplicados estão de acordo com a Directiva da Comunidade Europeia de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC). Todas as manipulações animais não terminais foram efectuadas sob anestesia com isoflurano (4% para indução e 2% para manutenção), enquanto que as análises cistométricas foram efectuadas sob anestesia com uretano (1,2 mg/kg s.c.).

Químicos

A capsaicina (CAP), resiniferatoxina (RTX) e o uretano foram adquiridos à Sigma (Portugal). A capzazepina (CPZ) e a iodoresiniferatoxina (IRTX) foram adquiridas à Tocris (UK). O anticorpo anti-CGRP feito em coelho foi comprado à Amersham (Portugal). O Kit Vectastain ABC Elite foi comprado à Vector (UK). O isoflurano foi fornecido pela Abbott (Portugal).

As soluções experimentais de CAP e de RTX foram obtidas por diluição de soluções stock de 10 mM e 10 μ M, respectivamente, em 1% de etanol em soro fisiológico (solução veículo). As soluções experimentais de CPZ e a IRTX foram obtidas por diluição da solução stock de 10 mM e 1 mM, respectivamente, em soro fisiológico.

Análise cistométrica

A bexiga foi exposta através de uma incisão abdominal e uma agulha de calibre 21 foi inserida na cúpula da bexiga. A temperatura corporal foi mantida a 36-37 °C e controlada continuamente por um termómetro rectal. A pressão intravesical foi monitorizada por um transdutor de pressão (*Gould Instruments*) e a sua variação registada num computador, enquanto que solução salina foi infundida a 6 ml/h, mantendo a uretra aberta.

Efeito da IRTX no reflexo miccional

Para estudar o efeito da IRTX na contracção vesical, efectuaram-se análises cistométricas ($n = 5$). Após um período de estabilização de 30 min, soro fisiológico e soluções de IRTX de 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M foram aplicadas topicamente na bexiga, consecutivamente, a intervalos de 10 min.

Para estudar se o efeito da IRTX, na frequência urinária, é mediado pelo TRPV1 foi efectuada análise cistométrica ($n = 5$ animais/grupo experimental). Após um período de 30 min para estabilização, num dos grupos foram aplicados, topicamente na bexiga, soro fisiológico e solução de IRTX 50 nM, a intervalos de 10 min. Noutro grupo, aplicaram-se, do mesmo modo, soro fisiológico e 50 μ M CPZ + 50 nM IRTX.

Para se comparar o efeito de IRTX e CAP nas contracções vesicais, formou-se outro grupo ex-

perimental ($n = 5$). Após um período de 30 min para estabilização, em todas as análises, o veículo das soluções em estudo foi aplicado topicamente, previamente à aplicação de cada uma das referidas soluções. Todas as aplicações ocorreram num intervalo de 10 min. Assim, no primeiro grupo aplicou-se solução de CAP 1 μ M, no segundo CAP 1 μ M + CPZ 50 μ M, no terceiro CAP 1 μ M + IRTX 10 nM e no quarto grupo CAP 1 μ M + IRTX 10 μ M.

Para se comparar o efeito da dessensibilização do TRPV1 induzida por RTX e IRTX, noutros dois grupos experimentais ($n = 5$ animais/grupo experimental), foram aplicadas, respectivamente, soluções de IRTX 10 μ M e RTX 10 nM, por via intravesical, durante 30 min. Para eliminar quaisquer remanescentes de IRTX ou RTX, a bexiga foi lavada com soro fisiológico. Vinte e quatro horas depois deste tratamento, efectuaram-se análises cistométricas, onde soluções de CAP 1 μ M foram aplicadas topicamente enquanto que a variação da actividade reflexa da bexiga era monitorizada e registada.

Para se verificar qual o efeito do tratamento por IRTX no conteúdo em neurotransmissores, em dois grupos de fêmeas Wistar adultas, instilou-se soro fisiológico ($n = 2$) e IRTX 10 μ M ($n = 2$), durante 30 min, respectivamente. Vinte e quatro horas após este procedimento, os animais foram sacrificados por decapitação e as bexigas colhidas e fixadas em 4% paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato, pH 7,4. Após seis horas de fixação, as bexigas foram colocadas em sacarose a 30% em tampão fosfatos 0,1 M, durante 24 h, seguidamente foram cortadas a 20 μ m num micrótomo de congelação. Um em cada três cortes não consecutivos foi armazenado a -20 °C. Quando todas as experiências foram concluídas, todos os cortes foram lavados com PBS 0,1 M, e incubadas no mesmo banho com anticorpo policlonal contra CGRP a 1:20.000, feito em coelho. A reacção imune foi visualizada pelo método de avidina-biotina (ABC). A presença de fibras imunocoradas foi estudada num microscópio óptico.

Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram analisadas com *software SigmaStat 2.03* (SPSS Inc, EUA), usando o teste *one-way ANOVA* seguida pelo teste *post-hoc Student-Newman-Keuls* para comparações múltiplas. Valores a partir de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

Resultados

A aplicação de 10 nM IRTX não alterou o número de contracções vesicais por minuto. No entanto, a aplicação de soluções de IRTX desde 50 nM até 10 μ M fez aumentar a frequência urinária (Fig. 1A).

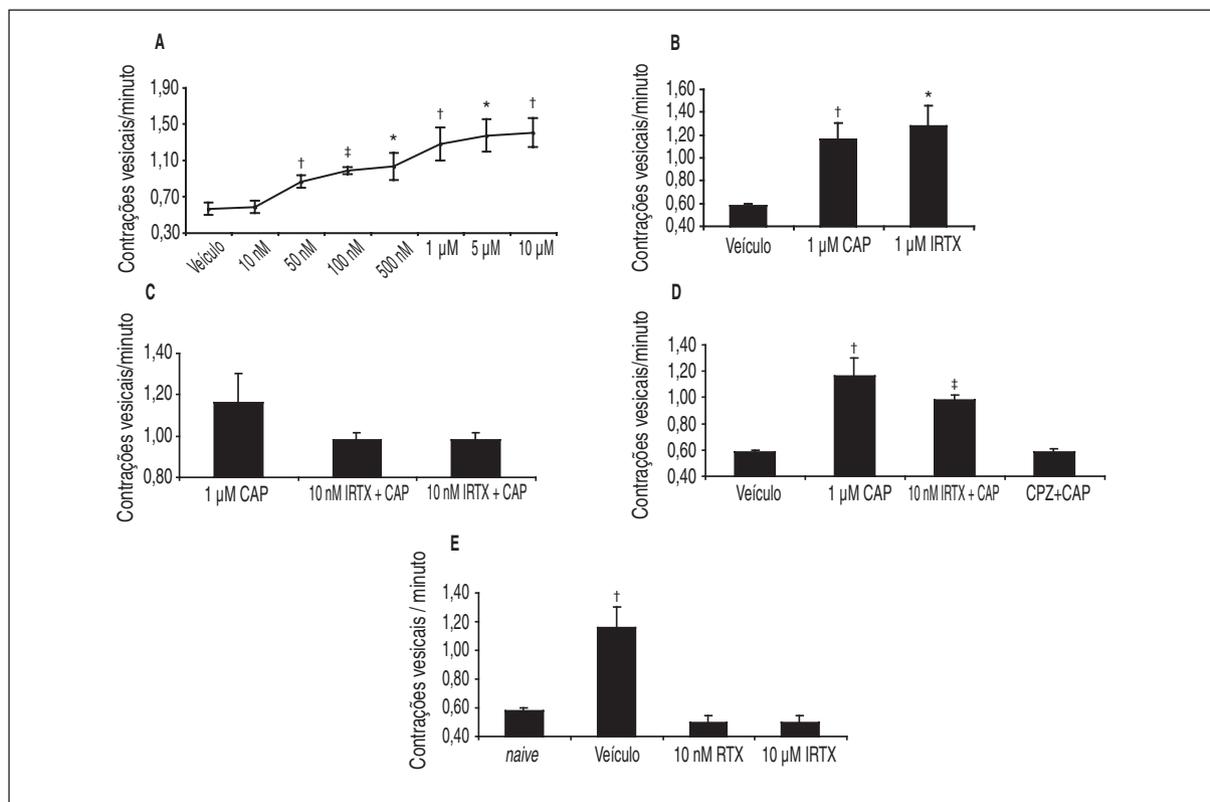


Figura 1. A) Frequência urinária após aplicação de concentrações crescentes de IRTX, (* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$). B) Frequência urinária após aplicação de 50 nM IRTX ou 50 nM IRTX + 50 μM CPZ († $p < 0,01$). C) Frequência urinária após aplicação de 1 μM CAP, 10 nM IRTX + CAP ou 10 μM IRTX + CAP ($p > 0,05$). D) Frequência urinária após aplicação de 1 μM CAP, 10 nM IRTX + CAP ou 50 μM CPZ + CAP († $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$). E) Frequência urinária após aplicação de 1 μM CAP em ratos tratados previamente com veículo, 10 nM RTX ou 10 μM IRTX († $p < 0,01$).

A aplicação tópica de 50 μM CPZ fez desaparecer o aumento da frequência urinária causada por 50 nM IRTX (Fig. 1B).

A co-aplicação tópica de CAP com 10 nM IRTX e 10 μM IRTX teve o mesmo efeito na frequência urinária do que a aplicação de apenas 1 μM de CAP (Fig. 1C). Contrariamente do que se verificou com 10 nM IRTX, 50 μM de CPZ antagonizou o efeito de 1 μM CAP (Fig. 1D).

O pré-tratamento com 10 nM RTX e 10 μM IRTX preveniu o aumento da frequência urinária induzida pela CAP (Fig. 1E).

O pré-tratamento com 10 μM IRTX reduziu o número de fibras CGRP imuno-positivas na mucosa da bexiga (Fig. 2). Tal como na zona dos ureteres (dados não mostrados), não ocorreu alteração no número destas fibras imuno-positivas na camada muscular (Fig. 3).

Discussão

O TRPV1 é um canal catiónico presente em nociceptores da bexiga, que integra estímulos nocivos (Caterina, et al., 1997; Avelino, et al., 2002). Este receptor parece estar envolvido no desenvolvimento de hiperactividade vesical (Cruz, 2004). Por esta razão, o TRPV1 tem vindo a ser

estudado como um novo e potencial alvo terapêutico para o tratamento destas desordens (Brady, et al., 2004; Dinis, et al., 2004). O uso de CAP, RTX e outros análogos mostraram a complexidade do processo de activação do TRPV1 (McIntyre, et al., 2001; Ralevic, et al., 2003). As aplicações de CAP e RTX podem dessensibilizar o TRPV1 (Maggi, et al., 1990). De facto, a reduzida pungência da RTX torna-o um agente terapêutico mais promissor do que a CAP (Szallasi, et al., 1989a,b; Szallasi, et al., 1990). Se estas duas moléculas são extensivamente utilizadas em metodologias que prevêm o estudo dos efeitos prolongados sobre o receptor, o uso de antagonistas competitivos é mais adequado para estudar respostas agudas.

Com o objectivo de superar a inexistência de antagonistas do TRPV1 usados para experiências *in vivo*, uma forma iodada da IRTX foi apresentada como molécula candidata. Wahl, et al. verificaram que a acção do IRTX no TRPV1 era dependente da temperatura, tendo um nível máximo de especificidade aos 37 °C (Wahl, et al., 2001).

A aplicação tópica de soluções de IRTX, em concentrações crescentes, induz um aumento no número de contracções da bexiga numa for-

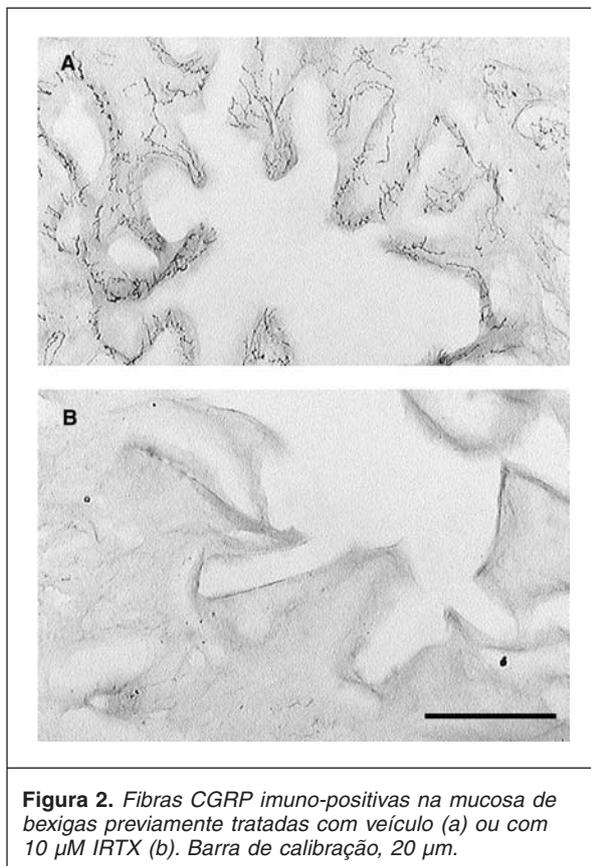


Figura 2. Fibras CGRP imuno-positivas na mucosa de bexigas previamente tratadas com veículo (a) ou com 10 μ M IRTX (b). Barra de calibração, 20 μ m.

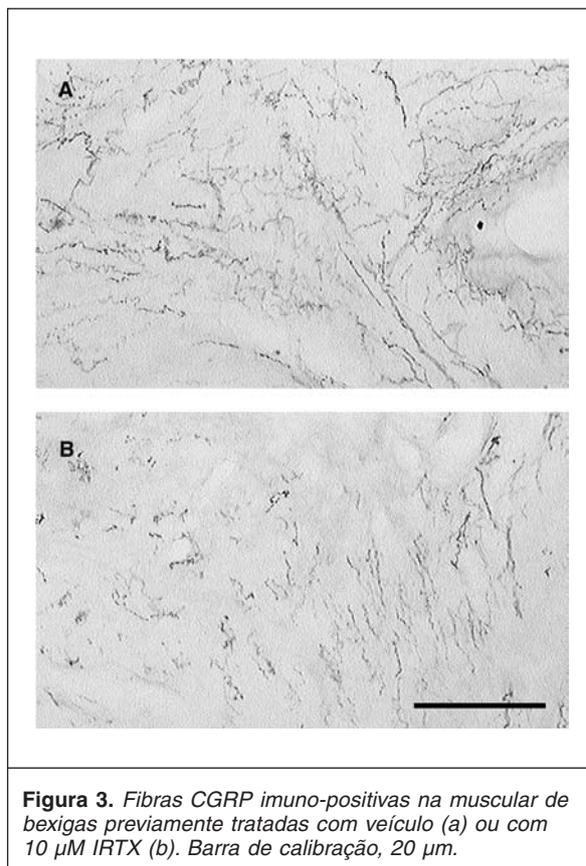


Figura 3. Fibras CGRP imuno-positivas na muscular de bexigas previamente tratadas com veículo (a) ou com 10 μ M IRTX (b). Barra de calibração, 20 μ m.

ma dependente da dose, atingindo-se um efeito máximo a partir dos 100 nM. Estes resultados não só demonstram que a IRTX promove a contracção vesical, como também satura a sua molécula alvo. Dado que as contracções vesicais mediadas por IRTX são inibidas pela CPZ pode-se concluir que as alterações no reflexo miccional causadas pela IRTX são mediadas pelo TRPV1. Como a acção da IRTX foi imediata poder-se-á concluir que a difusão deste composto através da serosa até às terminações nervosas faz-se de maneira rápida.

A RTX dessensibiliza funcionalmente as fibras que expressam o TRPV1, interferindo com o transporte axonal (Szallasi, et al., 1995) e o conteúdo em neurotransmissores (Avelino, et al., 2000). Dado que a IRTX mostrou características de agonista do TRPV1, estudámos a possibilidade de este composto dessensibilizar o receptor. Tal como observado com a RTX, a instilação da bexiga com IRTX vinte e quatro horas antes da análise cistométrica, preveniu completamente o aumento da frequência urinária induzida pela CAP. Estes dados demonstram que a IRTX afecta as fibras sensíveis à capsaicina, o que é corroborado pela eliminação de CGRP observada após o tratamento da bexiga com esta molécula. No seu conjunto estes resultados demonstram que, nestas condições experimentais, a IRTX actua como agonista do TRPV1, com características dessensibilizantes.

Apesar de num recente trabalho publicado por Trevisani, et al. se observar que a IRTX foi capaz de ter acção antitússica, um reflexo mediado pelo TRPV1, uma possível dessensibilização do receptor não foi testada (Trevisani, et al., 2004). De facto, quando comparado com os nossos resultados, as doses de IRTX usadas nesse trabalho são muito elevadas.

Considerando que um antagonista é uma molécula que deverá actuar no receptor sem alterar as suas propriedades, isto é, deverá neutralizar o efeito de um agonista, a IRTX não apresenta esta característica nas condições experimentais do presente trabalho.

Em conclusão, estes resultados mostram a necessidade de encontrar novos fármacos que actuem como antagonistas completos do TRPV1, com o conseqüente elevado valor terapêutico.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Doutor Carlos Re-guenga os seus comentários e sugestões.

Este trabalho foi financiado pelo projecto POCTI/FEDER 32466/NSE/2000 da FCT.

Bibliografia

- Avelino A, Cruz C, Nagy I, Cruz F. Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience* 2002;109:787-98.
- Avelino A, Cruz F. Peptide immunoreactivity and ultrastructure of rat urinary bladder nerve fibers after topical desensitization by capsaicin or resiniferatoxin. *Autonomic Neuroscience* 2000;86:37-46.

- Bevan S, Hothi S, Hughes G, et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 1992; 107:544-52.
- Brady CM, Apostolidis AN, Harper M, et al. Parallel changes in bladder suburothelial vanilloid receptor TRPV1 and pan-neuronal marker PGP9.5 immunoreactivity in patients with neurogenic detrusor overactivity after intravesical resiniferatoxin treatment. *BJU International* 2004;93:770-6.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-24.
- Cruz F. Mechanisms involved in new therapies for overactive bladder. *Urology* 2004;63:65-73.
- Di Marzo V, Breivogel C, Bisogno T, et al. Neurobehavioral activity in mice of N-vanillyl-arachidonyl-amide. *Eur J Pharmacol* 2000;406:363-74.
- Dinis P, Charrua A, Avelino A, Cruz F. Intravesical resiniferatoxin decreases spinal c-fos expression and increases bladder volume to reflex micturition in rats with chronic inflamed urinary bladders. *BJU International* 2004;94:153-7.
- Maggi CA, Patacchini R, Tramontana M, Amann R, Giuliani S, Santicioli P. Similarities and differences in the action of resiniferatoxin and capsaicin on central and peripheral endings of primary sensory neurons. *Neuroscience* 1990;37:531-9.
- Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N, et al. Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat *substantia nigra* by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci* 2003;23:3136-44.
- McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, et al. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br J Pharmacol* 2001;132:1084-94.
- Ralevic V, Jerman JC, Brough SJ, Davis JB, Egerton J, Smart D. Pharmacology of vanilloids at recombinant and endogenous rat vanilloid receptors. *Biochemical Pharmacology* 2003;65:143-51.
- Seabrook GR, Sutton KG, Jarolimek W, et al. Functional properties of the high-affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxyphenylacetate ester) iodo-resiniferatoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:1052-60.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 2000;129:227-30.
- Sternner O, Szallasi A. Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development. *Trends in Pharmacological Sciences* 1999;20:459-65.
- Szallasi A, Blumberg PM. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 1989a;30:515-20.
- Szallasi A. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. *Am J Clin Pathol* 2002;118:110-21.
- Szallasi A, Blumberg PM. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sciences* 1990;47:1399-408.
- Szallasi A, Joo F, Blumberg PM. Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. *Brain Research* 1989b;503:68-72.
- Szallasi A, Nilsson S, Farkas-Szallasi T, Blumberg PM, Hokfelt T, Lundberg JM. Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Research* 1995;703:175-83.
- Trevisani M, Milan A, Gatti R, Zanasi A, et al. Antitussive activity of iodo-resiniferatoxin in guinea pigs. *Thorax* 2004;59:769-72.
- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 2001;59:9-15.
- Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX. An alternative splicing product of the murine trpv1 gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem* 2004;279:37423-30.