

Investigação Básica



Mensagem do Presidente da APED

O Receptor Vanilóide TRPV1 é Essencial para a Génese da Alodínia e da Hiperactividade Vesical na Cistite

Integração do Núcleo Reticular Dorsal do Bolbo Raquidiano na Rede Supra-espinhal de Controlo da Dor

3 Expressão do ARNm para as Subunidades do Receptor GABA_B no Tálamo de Ratos Normais e Monoartríticos 16

5 Biestabilidade da Actividade Espontânea nos Neurónios da Medula Espinhal Dorsal do Rato 28

10 Um Método Electrofisiológico para Identificação de Conexões Sinápticas entre Interneurónios Espinais 35

Volume Monotemático dedicado a
INVESTIGAÇÃO BÁSICA

Director

José Manuel Castro Lopes

Editores

Luís Aqualusa

José Manuel Castro Lopes

Teresa Vaz Patto

Sílvia Vaz Serra

Mensagem do Presidente da APED <i>José Manuel Castro Lopes</i>	3
O Receptor Vanilóide TRPV1 é Essencial para a Génese da Alodínia e da Hiperactividade Vesical na Cistite <i>Ana Charrua, Célia Duarte Cruz, Francisco Cruz e António Avelino</i>	5
Integração do Núcleo Reticular Dorsal do Bolbo Raquidiano na Rede Supra-espinal de Controlo da Dor <i>Hugo Leite-Almeida e Armando Almeida</i>	10
Expressão do ARNm para as Subunidades do Receptor GABA _B no Tálamo de Ratos Normais e Monoartríticos <i>Joana Ferreira-Gomes, Fani L. Neto e José M. Castro-Lopes</i>	16
Biestabilidade da Actividade Espontânea nos Neurónios da Medula Espinhal Dorsal do Rato <i>Clara Monteiro, Deolinda Lima e Vasco Galhardo</i>	28
Um Método Electrofisiológico para Identificação de Conexões Sinápticas entre Interneurónios Espiniais <i>Sónia F.A. Santos e Boris V. Safronov</i>	35

Ilustração da capa de Armanda Passos



NORMAS DE PUBLICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



© 2006 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.: 599AP062



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.

Mensagem do Presidente da APED

José Manuel Castro Lopes

Na sequência do *Global Year of Pain in Children* promovido pela *International Association for the Study of Pain* (IASP), a APED decidiu centrar as comemorações do 8.º Dia Nacional de Luta Contra a Dor no tema «A dor na criança».

As principais actividades relacionaram-se com o concurso de desenhos infantis organizado pela APED com o patrocínio da Janssen-Cilag. Refira-se que esta iniciativa foi muito elogiada pelo presidente da IASP, Prof. Troels Jensen, e pelo presidente do *Special Interest Group on Pain in Childhood* da IASP, Prof. Allen Finley, de tal modo que os desenhos classificados nos três primeiros lugares foram colocados no sítio da IASP na internet (www.iasp-pain.org/GD2005KDrawings.html), e o desenho classificado em primeiro lugar foi colocado na página de abertura do sítio daquele grupo na internet (www.childpain.org). Os desenhos classificados nos três primeiros lugares estão também patentes no renovado sítio da APED na internet (www.aped-dor.org). Além disso, alguns dos principais desenhos submetidos a concurso foram expostos em diversos hospitais do país no Dia Nacional de Luta Contra a Dor, e realizou-se uma cerimónia de atribuição dos prémios aos três primeiros classificados. A cerimónia foi presidida pela Dr.ª Maria Cavaco Silva, reproduzindo-se em seguida o discurso que o presidente da APED proferiu na ocasião.

«Na qualidade de presidente da Associação Portuguesa para o Estudo da Dor agradeço a vossa presença nesta cerimónia que assinala o 8.º Dia Nacional de Luta Contra a Dor e, simultaneamente, encerra o concurso de desenhos infantis que a APED promoveu no âmbito do ano internacional dedicado à dor na criança, com o generoso patrocínio da Janssen-Cilag.

Nunca é demais recordar que Portugal foi pioneiro na Europa, quicá no mundo, ao criar em 1999 um Dia Nacional dedicado exclusivamente à dor. Como qualquer outro dos dias nacionais, o objectivo principal é chamar a atenção da população em geral, mas também dos profissionais de saúde e das entidades competentes, para o verdadeiro problema de saúde pública que a dor representa, nas suas múltiplas vertentes.

A dor aguda, que resulta por exemplo de um traumatismo, uma queimadura, uma úlcera gástrica ou uma cólica renal, tem uma importância fundamental para a preservação da integridade física do indivíduo e mesmo para a sua sobrevi-

da. Por isso não é possível nem desejável eliminar totalmente a dor. No entanto, cumprida a sua função de sinal de alarme, deve ser combatida com todas as armas terapêuticas que temos hoje ao nosso dispôr, por forma a reduzir a morbilidade e o sofrimento que lhe estão associados, e que estão tão bem patentes nos desenhos que recebemos de crianças internadas em hospitais de todo o país. Foram cerca de 130 desenhos que ilustram de forma muito significativa o quanto ainda está por fazer neste âmbito. O alívio da dor deve ser reconhecido como um direito humano e um objectivo fundamental na melhoria da prestação de cuidados de saúde à população em geral e às crianças em particular. Numa altura em que tanto se fala na humanização dos cuidados de saúde, é fundamental criar as condições para que a dor seja devidamente identificada, avaliada e tratada atempadamente.

Foi nesse sentido que propusemos a criação da norma que instituiu a dor como quinto sinal vital, que viria a ser aprovada faz hoje precisamente 3 anos, e que mais uma vez pôs Portugal na primeira linha no combate à dor. É fundamental que esta norma seja cumprida na íntegra pelos profissionais de saúde, e a APED tem vindo a promover diversos cursos, sob a coordenação da Prof.ª Ananda Fernandes, que visam precisamente dar formação sobre a avaliação da dor. De facto, não basta produzir documentos bem intencionados, é necessário ir para o terreno e modificar hábitos e mentalidades enraizadas em conceitos inaceitáveis no século XXI, que levam a que a dor seja frequentemente subestimada, escondida ou até negada, tanto pelos doentes como pelos profissionais de saúde.

No mesmo sentido, é imperativo que se cumpram os objectivos do Plano Nacional de Luta Contra a Dor, que, curiosamente, entrou em vigor em 2001 pela mão do senhor ministro da Saúde, Dr. Correia de Campos. Muito foi feito desde então, em particular no âmbito da dor crónica, mas existem diversos obstáculos, de natureza organizativa, financeira e de escassez de recursos humanos, que ainda não foi possível ultrapassar, e que representam uma profunda frustração para quem está empenhado em promover aquele plano.

Perguntava-me ontem uma jornalista quantos portugueses sofrem de dor crónica e quais os custos que isso acarreta para a sociedade. Infelizmente ainda não temos dados fidedignos, mas está neste momento em curso um estudo,

realizado por investigadores da Faculdade de Medicina do Porto, que irá responder a essas questões em breve. Enquanto não dispomos desses dados, tudo o que podemos fazer é extrapolar a partir de estudos realizados noutros países europeus, e que apontam para que existam em Portugal cerca de 1 milhão de pessoas a sofrer de dor crónica. Sabemos também que a dor é a primeira causa de consulta dos médicos de família e podemos estimar que o custo para a sociedade das lombalgias, as vulgares dores de costas, que diga-se representam a forma mais comum de dor crónica, deverá rondar os 2.000 milhões de euros ou 400 milhões de contos na moeda antiga.

Estamos, pois, perante um grave problema de saúde pública, com repercussões socioeconómicas comparáveis às das doenças cardiovas-

culares ou do cancro, embora com uma enorme diferença: é que a dor, apesar do sofrimento que acarreta, por vezes quase insuportável, raramente mata. Mas se são poucos os que morrem de dor, muitos são os que morrem com dor e mais ainda os que com ela convivem diariamente, e para modificar esta situação necessitamos da ajuda de todos.

Termino, agradecendo penhoradamente a presença da Ex.^{ma} Sr.^a Dr.^a Maria Cavaco Silva. Estou certo que acabamos de ganhar uma valiosa aliada nesta luta sem tréguas a bem dos doentes do nosso país.»

PS. Conforme acima referido, o sítio da APED na internet foi renovado. Gostaríamos de receber comentários e sugestões dos sócios da APED, bem como notícias que pretendam divulgar.

O Receptor Vanilóide TRPV1 é Essencial para a Génese da Alodínia e da Hiperactividade Vesical na Cistite

Ana Charrua^{1,2}, Célia Duarte Cruz^{1,2}, Francisco Cruz^{2,3} e António Avelino^{1,2}

Resumo

Objectivo: Avaliar o papel do TRPV1 na génese da informação nóxica e na hiperactividade vesical associadas à cistite.

Materiais e métodos: Estudou-se a expressão espinal de *c-fos* induzida pela distensão inócua da bexiga (10 cm de água), em ratinhos normais (TRPV1 +/+) e *knock-out* para o receptor vanilóide (TRPV1 -/-) após inflamação vesical com lipopolissacarídeo (LPS) ou aplicação de veículo. Foi também estudada a actividade reflexa da bexiga destes animais, sob anestesia.

Resultados: O grau de inflamação obtido foi idêntico em animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/-. A distensão inócua da bexiga dos animais TRPV1 +/+ não-inflamados induziu a expressão de *c-fos* em 4 ± 2 células por segmento espinhal. A distensão inócua das bexigas inflamadas com LPS aumentou a expressão do gene para 34 ± 5 células ($p < 0,001$). O número de células que expressavam a proteína em animais TRPV1 -/- não-inflamados ou inflamados foi semelhante (2 ± 1 e 2 ± 1 , respectivamente) ($p < 0,05$). A infusão de soro fisiológico na bexiga de animais TRPV1 +/+ não-inflamados ou inflamados induziu $0,46 \pm 0,14$ e $1,13 \pm 0,12$, contracções por minuto, respectivamente ($p < 0,001$). Nos animais TRPV1 -/- não-inflamados e inflamados, a frequência urinária foi semelhante ($0,47 \pm 0,08$ e $0,61 \pm 0,10$, respectivamente) ($p < 0,05$).

Conclusão: Estes resultados demonstram que o TRPV1 é essencial para a génese da informação nóxica e para o desenvolvimento de hiperactividade vesical associados à cistite.

Palavras-chave: TRPV1. Cistite. TRPV1 KO. Inflamação.

Abstract

Purpose: To evaluate the role of TRPV1 for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity associated with cystitis.

Material and methods: Spinal *c-fos* expression triggered by innocuous bladder distension (10 cm of water) was studied in sham-inflamed and lipopolysaccharide (LPS)-inflamed TRPV1 +/+ and TRPV1 -/- mice. Bladder reflex activity was studied, under urethane anaesthesia, in sham-inflamed or LPS-inflamed TRPV1 +/+ and TRPV1 -/- mice.

Results: Inflammatory changes in the bladder of TRPV1 +/+ and TRPV1 -/- mice were identical. Bladder distension of sham-inflamed TRPV1 +/+ induced 4 ± 2 Fos-cells per section. Bladder distension after LPSinflammation increased Fos-cells to 34 ± 5 ($p < 0.001$). The number of Fos-cells after bladder distension of sham or LPS-inflamed TRPV1 -/- mice was similar (2 ± 1 and 2 ± 1 , respectively $p > 0.05$). During saline infusion of sham-inflamed bladders of TRPV1 +/+ mice saline 0.46 ± 0.14 contraction/minute were registered. In LPS-inflamed TRPV1 +/+ mice that frequency was increased to 1.13 ± 0.12 ($p < 0.001$). In sham or LPS-inflamed TRPV1 -/- mice, bladder frequency was similar (0.47 ± 0.08 and 0.61 ± 0.10 , respectively, $p > 0.05$).

Conclusions: Our data demonstrate that TRPV1 is essential for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity associated with cystitis.

Key words: TRPV1. Cystite. TRPV1 KO. Inflammation.

¹Instituto de Histologia e Embriologia
Faculdade de Medicina

²IBMC, Universidade do Porto

³Departamento de Urologia
Hospital de São João
Porto, Portugal

Introdução

O TRPV1 é um canal iónico não-selectivo sensível à capsaicina, ao calor nóxico e ao pH baixo. O limiar de activação pelo calor foi inicialmente estabelecido perto dos 43 °C¹. Contudo, foi demonstrado que o TRPV1 poderia ser activado a temperaturas corporais se o pH for inferior a 6¹. Mais ainda, o TRPV1 mostrou ser essencial para o desenvolvimento da hiperalgesia térmica induzida pelo processo inflamatório^{1,2}.

O TRPV1 é expresso abundantemente no tracto urinário inferior, em fibras sensitivas que penetram a camada muscular e a mucosa^{3,4} e em células uroteliais⁵. Estudos em animais dessensibilizados pelos agonistas do TRPV1 capsaicina ou resiniferatoxina (RTX) mostraram que as fibras que expressam o receptor eram importantes para a hiperactividade vesical, para o comportamento doloroso e para a sobreexpressão espinal da proteína Fos durante a cistite^{6,7}. Apesar do facto da capsaicina e do RTX se ligarem especificamente ao TRPV1¹ e induzirem a sua depleção^{3,8}, esses estudos não demonstraram em definitivo o papel do TRPV1 na cistite. Após a aplicação da capsaicina e do RTX, os nervos que expressam o TRPV1 também perdem outros receptores, como o receptor purinérgico subtipo P2X3⁹ e sofrem depleção total de neuropeptídeos como a SP e a CGRP¹⁰.

O efeito da inibição do TRPV1 com o antagonista específico capsazepina (CPZ) na dor originada pelas bexigas inflamadas nunca foi avaliado. Contudo, num estudo recente, a CPZ diminuiu a actividade reflexogénica da bexiga de ratos cronicamente inflamados, mas não teve qualquer efeito em animais normais¹¹. Apesar deste resultado sugerir o envolvimento do TRPV1 na cistite, a diminuição foi ligeira, um facto que poderá indicar ou que a CPZ tem uma fraca potência¹² ou que o TRPV1 apresenta um papel marginal. Para clarificar este assunto, no presente estudo, usaram-se animais transgénicos nos quais o gene TRPV1 foi inativado (animais TRPV1 *-/-*) para determinar a contribuição do receptor na geração de informação nóxica proveniente da bexiga e para o desenvolvimento da hiperactividade vesical associadas à cistite. Resultados preliminares foram apresentados sobre a forma de resumo¹³.

Materiais e métodos

Ratinhos fêmeas TRPV1 *-/-* e os seus respectivos controlos (TRPV1 *+/+*) foram obtidos na *Jackson Laboratory*, EUA. Todas as manipulações animais não-terminais foram efectuadas sob anestesia com isoflurano (5% para indução, 1,5% para manutenção). Para procedimentos terminais utilizou-se hidrato de cloral a 3,5% (0,1 ml/10 g de peso corporal, intraperitoneal). As cistometrias foram efectuadas sob anestesia com uretano (1,2 g/kg, subcutâneo).

A inflamação da bexiga foi induzida em animais TRPV1 *-/-* e TRPV1 *+/+* através da aplicação intravesical de lipopolissacarídeo extraído de *E. coli*

(LPS, Sigma). Após a evacuação da urina, a bexiga foi instilada durante uma hora com 0,2 ml de soro fisiológico contendo 1 mg/ml LPS. O mesmo volume de soro foi usado para obter animais-controlo. Vinte e quatro horas após este procedimento, os animais foram reanestesiados para a elaboração dos estudos posteriores (ver em baixo).

Todos os esforços foram efectuados para minimizar o sofrimento animal e para reduzir o número de animais usados. As experiências foram efectuadas de acordo com a Directiva do Conselho Comunitário Europeu de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC).

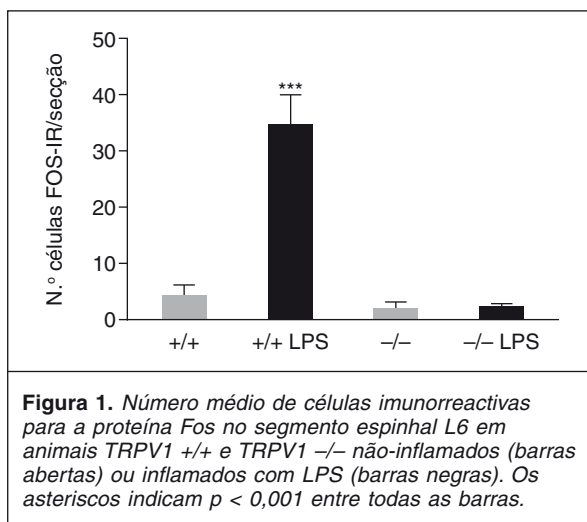
Expressão espinal da proteína Fos após a distensão da bexiga

Numa primeira experiência, quatro animais TRPV1 *+/+* e quatro TRPV1 *-/-* não inflamados foram anestesiados, as bexigas expostas através de uma incisão abdominal e uma agulha com diâmetro de 25-*gauge* inserida na cúpula da bexiga. As bexigas foram então distendidas durante 15 minutos a uma pressão constante de 10 cm de H₂O com soro fisiológico à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido em quatro animais TRPV1 *+/+* e quatro TRPV1 *-/-* inflamados com LPS.

Duas horas após o início da distensão, todos os animais foram fixados por perfusão através da aorta com 50 ml de solução de Tyrode seguida de 200 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Após a perfusão, os segmentos espinais L6 foram removidos, imersos três horas no mesmo fixador e durante 24 horas em sacarose a 30% em tampão fosfato, cortados transversalmente num micrótomo de congelação a 30 µm de espessura e armazenadas em crioprotector a -20 °C¹¹. Quando todas as experiências foram concluídas, os cortes foram lavados com PBS e incubados em anticorpo policlonal, produzido em Coelho, contra a proteína Fos (Calbiochem), diluído 1:10.000. A reacção imune foi visualizada pelo método avidina-biotina (ABC, Vector). As células imunorreactivas para a proteína Fos observadas em 10 cortes de cada animal foram contadas ao microscópio óptico, conforme descrito anteriormente¹¹.

Cistometria

Quatro animais TRPV1 *+/+* e quatro TRPV1 *-/-* não-inflamados e quatro animais TRPV1 *+/+* e quatro TRPV1 *-/-* inflamados com LPS foram usados. Os animais foram anestesiados com uretano e a temperatura corporal controlada através de um termómetro rectal e mantida a 36-37 °C com uma manta de aquecimento. As bexigas foram expostas através de uma incisão abdominal e uma agulha com diâmetro de 25-*gauge* inserida na cúpula da bexiga para permitir a infusão de soro fisiológico à temperatura corporal, a um fluxo de 1,8 ml por hora. A uretra foi mantida desobstruída para permitir a expulsão da urina durante as contracções da bexiga. A pressão intravesical foi medida através de um tradutor de pressão (*Gould Instru-*



ments). Os registos foram sempre iniciados após um período de estabilização de 30 minutos.

Avaliação histológica da bexiga

No final das experiências, as bexigas de animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- foram colhidas e fixadas por imersão em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante 24 horas. Após a inclusão em parafina, efectuaram-se cortes de 7 μ m que foram corados pela hematoxilina-eosina.

Apresentação dos dados

Os resultados são apresentados como o número médio de células imunorreactivas para a proteína Fos por corte de medula espinhal \pm desvio-padrão (DP) e o número médio de contracções da bexiga por minuto \pm DP. As diferenças das médias foram comparadas através de análise de variâncias a um factor (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas *post-hoc* Bonferroni usando o software *Sigma-Stat 2.03*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Resultados de microscopia óptica

As bexigas dos animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- inflamados com LPS mostraram um grau semelhante de inflamação. O urotélio encontrava-se intacto e a lâmina própria apresentou fraco edema e pouca infiltração inflamatória. As bexigas de animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- instiladas com soro fisiológico apresentavam-se normais.

Expressão espinhal de c-fos após distensão da bexiga

A distensão da bexiga de animais TRPV1 +/+ não-inflamados à pressão inócua de 10 cm de H₂O induziu uma ligeira expressão bilateral de c-fos, restringida à matéria cinzenta intermediolateral (ILG) e à comissura dorsal (DC). O número médio de células imunorreactivas para a proteína Fos nes-

tes animais foi de 4 ± 2 (Fig. 1). Pelo contrário, a distensão de bexigas inflamadas em animais TRPV1 +/+ causou um forte aumento do número de células que expressam a proteína Fos, para 34 ± 5 ($p < 0,001$) (Fig. 1). O aumento ocorreu bilateralmente na lâmina I, ILG e DC. A distensão das bexigas não-inflamadas de animais TRPV1 -/- induziu uma ligeira expressão bilateral de proteína Fos, tanto na ILG, como na DC. O número médio de células que expressavam a proteína Fos nestes animais foi de 2 ± 1 (Fig. 1). A distensão das bexigas inflamadas em animais TRPV1 -/- não alterou o número de células que expressam a proteína Fos (2 ± 1 ; $p < 0,05$) (Fig. 1).

Cistometria

A frequência das contracções reflexas de animais TRPV1 +/+ não-inflamados foi de $0,47 \pm 0,10$ por minuto (Figs. 2 A e 3). Em animais TRPV1 +/+ inflamados, observou-se um forte aumento da frequência das contracções reflexas, $1,13 \pm 0,12$ por minuto ($p < 0,001$) (Figs. 2 B e 3). A frequência das contracções em animais TRPV1 -/- controlo foi de $0,47 \pm 0,08$ por minuto (Figs. 2 C e 3). Nos animais TRPV1 -/- inflamados com LPS, a frequência de contracções reflexas não se alterou de forma significativa ($0,61 \pm 0,10$ contracções por minuto, $p < 0,05$) (Figs. 2 D e 3).

Discussão

Clinicamente, a cistite é caracterizada por dor abdominal baixa durante o enchimento fisiológico da bexiga e pelo aumento da frequência urinária. Na cistite experimental, a resposta dolorosa ao enchimento da bexiga pode ser detectada através de comportamento associado à dor^{6,11} e pela expressão na medula espinhal do proto-oncogene c-fos^{6,7}. Mais ainda, a cistometria mostra um aumento da actividade reflexogénica tanto em animais inflamados acordados¹⁴ como em animais inflamados anestesiados⁷. Este fenómeno foi claramente observado nos nossos animais TRPV1 +/+ inflamados. Estes, em contraste com os TRPV1 +/+ não-inflamados, mostraram uma expressão de c-fos intensa nos neurónios do segmento espinhal L6, quando a bexiga foi distendida à pressão fisiológica de 10 cm H₂O, mostrando um aumento da informação nóxica gerada pela inflamação vesical. Adicionalmente, a inflamação aumentou de forma significativa a frequência das contracções reflexas da bexiga nos animais TRPV1 +/+.

As características histológicas da cistite induzida pelo LPS eram semelhantes nos animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/-. No entanto, a inflamação não aumentou o número de neurónios que expressam a proteína Fos no segmento espinhal L6 em animais TRPV1 -/-. O mesmo é verdadeiro para a actividade reflexa da bexiga, já que a inflamação não aumentou a frequência das contracções nos animais TRPV1 -/-. Deste modo, os nossos dados indicam que o TRPV1 desempenha um papel essencial para a gênese da informação nóxica da

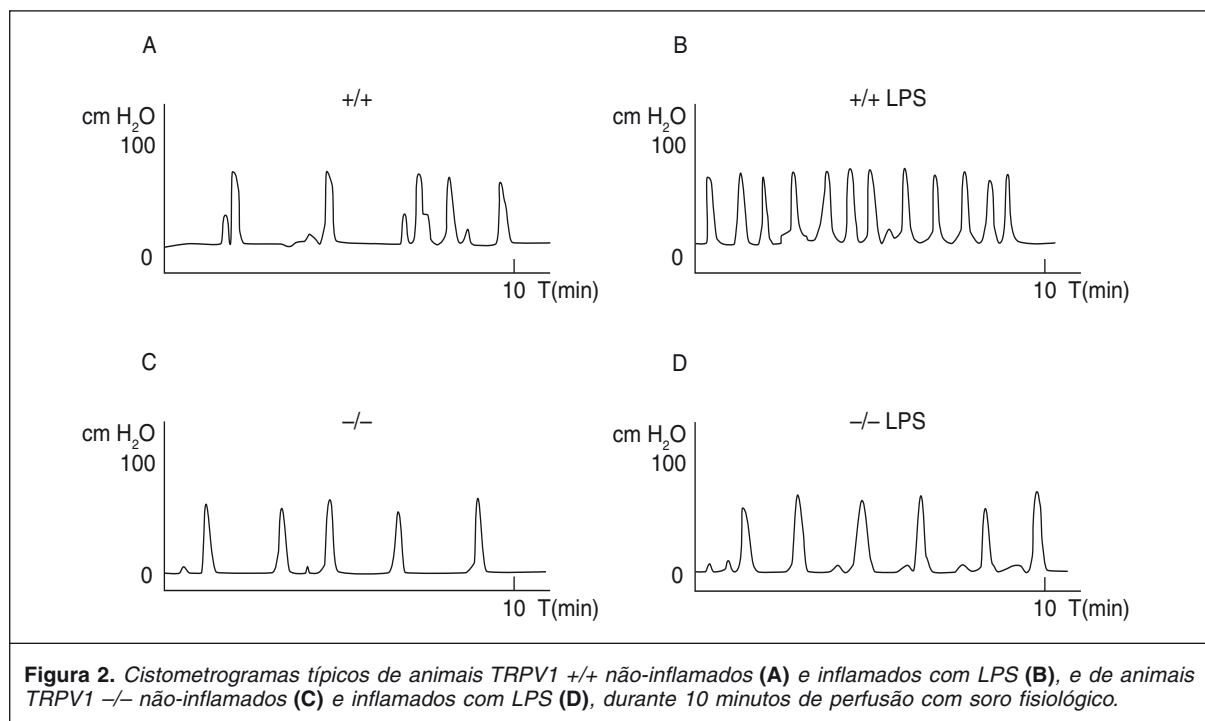


Figura 2. Cistometrogramas típicos de animais TRPV1 +/+ não-inflamados (A) e inflamados com LPS (B), e de animais TRPV1 -/- não-inflamados (C) e inflamados com LPS (D), durante 10 minutos de perfusão com soro fisiológico.

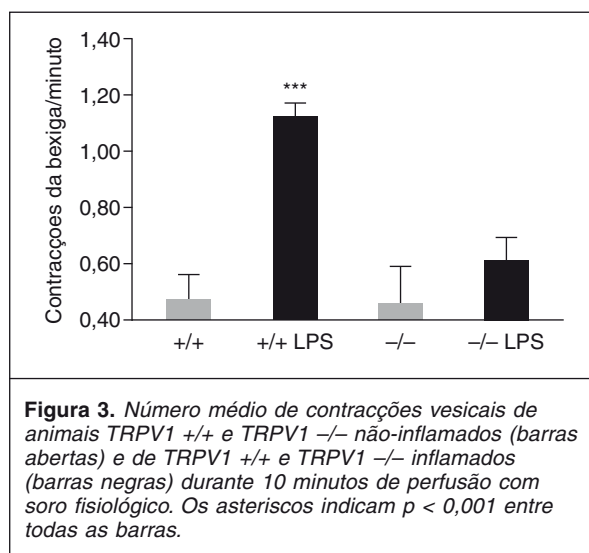


Figura 3. Número médio de contrações vesicais de animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- não-inflamados (barras abertas) e de TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- inflamados (barras negras) durante 10 minutos de perfusão com soro fisiológico. Os asteriscos indicam $p < 0,001$ entre todas as barras.

bexiga e é importante para o desenvolvimento da hiperactividade vesical associada com a cistite.

A importância do TRPV1 na cistite levanta imediatamente a questão ainda não esclarecida do ou dos agonistas endógenos do TRPV1. Existem várias moléculas endógenas identificadas como sendo agonistas do TRPV1, incluindo os protões, *N*-araquidonoil-etanolamina (anandamida), *N*-araquidonoil-dopamina, *N*-oleoil-dopamina, produtos da lipoxigenase, eicosanóides e leucotrienos¹⁵. A bradicinina não se liga ao TRPV1, mas pode activar o receptor de forma indirecta, através de um mecanismo mediado pelo seu receptor B2¹⁵. Até à data, na bexiga inflamada, só a anandamida foi estudada em detalhe como um agonista endógeno do TRPV1¹¹. A

inflamação induzida pela ciclofosfamida aumenta a concentração da anandamida na bexiga de rato, de forma persistente¹¹, a sua actividade reflexogénica e a expressão espinal da proteína Fos¹¹. Mais ainda, a inflamação poderá aumentar o número de receptores TRPV1 e facilitar a sua activação. A inflamação mostrou causar um aumento da tradução do TRPV1, dependente do factor de crescimento nervoso, e do seu transporte para a periferia¹⁶. A activação das cascatas PKA-PKC mostrou remover o TRPV1 de um controlo inibitório tónico¹⁷. Adicionalmente, na bexiga do rato o TRPV1 co-localiza com receptores activados por proteases (PAR)¹⁸. A activação destes receptores ocorre durante a inflamação e contribui para a sensibilização do TRPV1.

Apesar de não ser o objectivo do presente estudo, não conseguimos encontrar diferenças entre a expressão do *c-fos* e a frequência de reflexo miccional entre animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- não-inflamados. Estes resultados diferem dos observados por Birder LA, et al.¹⁴, que verificaram um aumento da capacidade vesical e do número de contrações não-expulsivas tanto em animais TRPV1 -/- acordados como anestesiados. Até à data, são desconhecidas as razões para a diferença entre estes resultados. Contudo, deve ser realçado que a actividade reflexogénica da bexiga semelhante entre TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- está de acordo com as recentes observações efectuadas no rato¹¹. Nesta espécie, a aplicação de capsazepina em animais não-inflamados não produziu qualquer efeito na frequência da actividade vesical¹¹. Mais ainda, a ausência de um papel para o TRPV1 na actividade sensitiva de tecidos não-inflamados foi também sugerida por Davis JB, et al.².

De facto, na ausência da inflamação, animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- mostraram respostas semelhantes a estímulos térmicos nócicos.

A cistometria, um teste no qual a bexiga é distendida a uma velocidade que simula o processo fisiológico de acumulação de urina, efectua um estímulo mecânico inócuo. Dado que o TRPV1 mostrou ser essencial para a percepção de estímulos dolorosos e para a hiperactividade vesical, poderá ser especulado que, na cistite, o TRPV1 está directa ou indirectamente implicado no processo de tradução de estímulos mecânicos. Isto é surpreendente, uma vez que as propriedades clássicas do canal TRPV1 incluem sensibilidade ao pH, à temperatura e à capsaicina, mas não à pressão¹. Mais ainda, a sensibilidade mecânica da pele de animais TRPV1 +/+ e TRPV1 -/- é similar¹. Uma explicação possível para estes achados é o facto de mediadores inflamatórios activarem o TRPV1 presente em células uroteliais e causarem a libertação de ATP^{5,19}. Este neurotransmissor interage com receptores purinérgicos presentes em fibras sensitivas suburoteliais, induzindo contracções reflexogénicas e resposta dolorosa¹⁹. Nos animais TRPV1 -/-, este mecanismo estaria alterado. Contudo, um estudo recente efectuado no cólon parece apoiar a ideia de que o TRPV1 poderá estar de facto envolvido na tradução de estímulos mecânicos. Jones RC, et al.²⁰ observaram que animais TRPV1 -/- não apresentaram uma tradução nociceptiva mecânica normal devido à redução da sensibilidade aferente a estímulos de distensão colónica, e que os mediadores da inflamação contribuíam para a actividade nervosa dos aferentes primários em animais TRPV1 +/+ mas não em animais TRPV1 -/-²⁰.

As implicações clínicas de maior relevância para este estudo são o tratamento da dor e da hiperactividade associadas à síndrome de dor pélvica crónica (CPPS), que inclui a cistite intersticial. De facto, o presente estudo sugere que a inibição do TRPV1 através de um antagonista apropriado poderá providenciar uma analgesia significativa e contribuir para o controlo da elevada frequência urinária observada nestes doentes. Na ausência de um composto adequado para uso humano, a inactivação do TRPV1 tem sido exercida através do uso de compostos vanilóides exógenos, nomeadamente a resiniferatoxina (RTX) aplicada intravesicalmente¹⁰. Contudo, os efeitos clínicos são, de momento, contraditórios. Apesar do primeiro ensaio de controlo com placebo ter sugerido alguns efeitos benéficos no tratamento da dor e no controlo miccional²¹, um ensaio recente não mostrou nenhuma vantagem neste tratamento²². O nosso estudo, ao mostrar o papel crucial do TRPV1 durante a cistite, apoia inequivocamente a investigação básica e clínica nesta área, eventualmente com novos compostos que bloqueiam selectivamente a actividade do TRPV1.

Conclusões

O TRPV1 é essencial para a gênese de informação sensitiva nóxica proveniente da bexiga

inflamada e para o estabelecimento de uma elevada frequência das contracções reflexas. A sua inibição pode, por isso, ser explorada para o tratamento de sintomas do tracto urinário baixo em doentes com cistite crónica. Estudos futuros deverão ser direccionados para a identificação de compostos capazes de inibir selectivamente o TRPV1.

Bibliografia

1. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 2004;61:3.
2. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000;405:183.
3. Avelino A, Cruz C, Nagy I, Cruz F. Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience* 2002;109:787.
4. Yiangou Y, Facer P, Ford A, Brady C, Wiseman O, et al. Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU Int* 2001 Jun;87(9):774-9.
5. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, et al. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *PNAS* 2001;98:13396.
6. Vizzard MA. Alterations in spinal cord Fos protein expression induced by bladder stimulation following cystitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R1027.
7. 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 Int* 2004;94:153.
8. Brady CM, Apostolidis AN, Harper M, Yiangou Y, Beckett A, Jacques TS, 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 Int* 2004;93:770.
9. Brady CM, Apostolidis A, Yiangou Y, Baecker PA, Ford AP, Freeman A, et al. P2X3-immunoreactive nerve fibres in neurogenic detrusor overactivity and the effect of intravesical resiniferatoxin. *Eur Urol* 2004;46:247.
10. Cruz F. Vanilloid receptor and detrusor instability. *Urol* 2002;59:51.
11. Dinis P, Charrua A, Avelino A, et al. Anandamide-Evoked Activation of Vanilloid Receptor 1 Contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J Neurosci* 2004;24:11253.
12. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 1992;107:544.
13. Silva A, Charrua A, Dinis P, Cruz F. TRPV1 knockout mice do not develop bladder overactivity during acute chemical bladder inflammation. Program No. 288. 16; Society for Neuroscience, 2004.
14. Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, et al. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* 2002;5:856.
15. Nagy I, Santha P, Jancso G, Urban L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol* 2004;500:351.
16. Ji RR, Samad TA, Jin S, Schmolz R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 2002;36:57.
17. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 2001;411:957.
18. Dattilio A, Vizzard MA. Up-regulation of protease activated receptors in bladder after cyclophosphamide induced cystitis and colocalization with capsaicin receptor (VR1) in bladder nerve fibers. *J Urol* 2005;173:635.
19. Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, et al. Urinary bladder hyperreflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 2000;407:1011.
20. Jones RC, Xu L, Gebhart GF. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci* 2005;25:10981.
21. Lazzeri M, Beneforti P, Spinelli M, Zanollo A, Barbagli G, Turini D. Intravesical resiniferatoxin for the treatment of hypersensitive disorder: A randomized placebo controlled study. *J Urol* 2000; 164:676.
22. Payne CK, Mosbaugh PG, Forrest JB, Evans RJ, Whitmore KE, Antoci JP, et al. Intravesical resiniferatoxin for the treatment of interstitial cystitis: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *J Urol* 2005;173:1590.

Integração do Núcleo Reticular Dorsal do Bolbo Raquidiano na Rede Supra-espinal de Controlo da Dor

Hugo Leite-Almeida e Armando Almeida

Resumo

A rede anatómica onde um componente do sistema nervoso central (SNC) se integra é uma característica fundamental balizadora da sua função. O núcleo reticular dorsal do bolbo raquidiano (DRt) é aqui apresentado como um caso paradigmático onde o conhecimento anatómico foi essencial para a identificação da sua actividade fisiológica. O DRt está particularmente bem caracterizado nas suas ligações aferentes e eferentes com o encéfalo e medula espinhal, embora muitos dos circuitos caracterizados por métodos neuroanatómicos estejam ainda por ser validados do ponto de vista funcional. Os circuitos DRt-corno dorsal da medula espinhal (CD)-DRt e córtex límbico (Climb)-DRt-CD serão aqui revistos com exemplos onde a anatomia precedeu e, em certa medida, antecipou a função. Por outro lado, circuitos que incluem (i) a ligação recíproca entre o DRt e o sistema endógeno de controlo da dor centrado na substância periaqueductal cinzenta (PAG) e medula ventromedial rostral (RVM) e (ii) a projecção eferente do DRt para todos os núcleos de motoneurónios envolvidos no controlo da musculatura orofacial, embora anatomicamente bem caracterizados, permanecem uma incógnita do ponto de vista funcional. As novas linhas de investigação deixadas em aberto pelos trabalhos neuroanatómicos serão brevemente discutidas no final desta revisão.

Palavras-chave: Dor. Nociceção. Núcleo reticular dorsal do bolbo raquidiano. Circuitos neuronais. Traçadores retrogradados e anterógradados.

Abstract

The anatomical network where a subsystem of the central nervous system is integrated is a fundamental and influential characteristic on its activity. The medullary dorsal reticular nucleus (DRt) is presented here as a paradigmatic case where the neuroanatomical studies proved to be essential in the comprehension of its function. The DRt is well characterized in what concerns to the afferent and efferent connectivity to the encephalon. However, the physiological value of many of these neuroanatomical pathways will need to be evaluated. The circuits DRt-dorsal horn (DH)-DRt and limbic cortex-DRt-DH are examples where the neuroanatomical knowledge has preceded and even anticipated the functional role of the DRt. On the other hand, circuits as the (i) endogenous pain control system centred in the periaqueductal gray matter and rostral ventromedial medulla or (ii) the efferent projections from the DRt to all of the brainstem motoneurons committed with the orofacial motility are well characterized but little is known on their function. The new research avenues opened by the anatomical studies are briefly discussed in the final part of this review.

Key words: Pain. Nociception. Dorsal reticular nucleus of the brainstem. Neuronal circuitry. Retrograde and anterograde tracers.

Introdução

O estudo anatómico constitui uma importante ferramenta para a compreensão de qualquer sistema orgânico complexo. No caso do sistema nervoso e, em particular, do sistema nervoso central (SNC), existe uma estreita ligação entre a anatomia e a função dos subsistemas que o compõem. Esta relação anatomia-função pode ser analisada a vários níveis. Numa população de neurónios existem vários parâmetros que importa caracterizar para que se possa ter uma imagem integrada do grupo e, concomitantemente, dos aspectos funcionais do circuito onde se integram. Estes incluem a densidade neuronal, a distribuição espacial e a caracterização dos neurónios em termos da sua polaridade, orientação, quantidade e extensão da arborização dendrítica e número/distribuição de espinhas na árvore dendrítica. A um outro nível, importa conhecer como é que diferentes núcleos e/ou áreas comunicam entre si, isto é, para onde é que determinada área envia informação (eferências) e que outras zonas fazem chegar informação à primeira (aferências). O núcleo dorsal reticular (DRt) do bolbo raquidiano é aqui apresentado como um caso paradigmático onde se provou haver uma íntima ligação entre a anatomia das conexões eferentes/aferentes e a fisiologia e comportamento subjacentes à sua actividade.

Desde o final da década de 80 que tem sido acumulada informação indicativa de que o DRt está envolvido na modulação da dor (ver para revisão Villanueva L, et al., 1996; Lima D, Almeida A, 2002). A primeira indicação de que o DRt poderia estar implicado na transmissão de impulsos nociceptivos para o encéfalo foram os dados anatómicos obtidos por Lima D e Coimbra A em 1985, que mostravam em microscopia óptica células do corno dorsal da medula espinhal a projectarem para o DRt e a receberem prováveis contactos sinápticos de fibras com terminais de passagem provenientes do DRt. Os dados da conexão medula espinhal-DRt foram publicados apenas em 1990 (Lima D, 1990; Lima D, Coimbra A, 1990). No entanto, em 1988, o grupo de Le Bars D e Villanueva L demonstrou que o DRt está fortemente implicado no processamento da informação nociceptiva, já que os seus neurónios são activados principalmente por estímulos nóxicos (Villanueva L, et al., 1988) e parecem codificar a intensidade do estímulo dentro do intervalo «doloroso» (Villanueva L, et al., 1989). Os trabalhos de Bouhassira D, et al. (1992) e Almeida A, et al. (1996; 1999) demonstraram que o DRt não está implicado apenas na transmissão nociceptiva, exercendo também acções modeladoras descendentes inibidoras (Bouhassira D) ou facilitadoras (Almeida A) da transmissão nociceptiva e percepção dolorosa. A anatomia eferente e aferente do DRt encontra-se presentemente bem estabelecida e será seguidamente abordada. Esta informação anatómica permitiu fazer algumas extrapolações sobre a sua fisiologia que se revelaram

acertadas. Dois circuitos serão apresentados para ilustrar este ponto, nomeadamente:

1. O circuito fechado DRt-corno dorsal da medula espinhal (CD)-DRt.
2. O circuito córtex límbico (Climb)-DRt-CD.

Finalmente, algumas considerações teóricas serão feitas sobre circuitos que, embora estabelecidos em estudos anatómicos, não foram ainda caracterizados do ponto de vista funcional.

Conexões supra-espinhais do DRt

Toda a informação disponível sobre as relações anatómicas do DRt (Fig. 1) foi obtida usando traçadores retrógrados e anterógrados injectados no SNC do rato, quer de forma directa, ou seja, injectando o DRt propriamente dito, quer de forma indirecta, injectando os traçadores em outras áreas e verificando a presença de marcação retrógrada ou anterógrada no DRt. Os traçadores retrógrados são substâncias captadas pelos terminais axonais que projectam para a área injectada, migrando posteriormente para os pericários e dendrites. Os traçadores anterógrados, por seu turno, são captados ao nível do pericário/dendrites e migram depois para os terminais axonais. A localização e identificação destas substâncias no cérebro é feita por meio de reacções imunocitoquímicas convencionais. Como exemplo de traçadores retrógrados de grande capacidade, encontram-se a subunidade B da toxina da cólera (CTb) e o *fluorogold* (FG). Como exemplos de traçadores anterógrados, existem o *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA), o dextrano-biotinilado (BDA) e a aglutinina do germen do trigo conjugada com a peroxidase do rábano (WGA-HRP), embora neste último caso se tenha verificado a ocorrência de transporte transináptico (Köbber C, et al., 2000).

A maior parte da informação revista no presente texto foi obtida de forma directa e baseia-se primariamente no trabalho retrógrado de Almeida A, et al. (2002) e anterógrado de Leite-Almeida H, et al. (2006). Adicionalmente, sempre que necessário, serão referidos trabalhos de outros autores que, embora estudando outras áreas do SNC, acabaram por contribuir de forma indirecta para o conhecimento das relações anatómicas do DRt com o encéfalo.

Telencéfalo

A nível telencefálico, em particular no neocórtex, a comunicação com o DRt faz-se apenas no sentido descendente, como fica patente na comparação entre estudos retrógrados (Almeida A, et al., 2002) e anterógrados (Bernard JF, et al., 1990; Leite-Almeida H, et al., 2006). Em particular nos córtices motores (primários e secundários), somatosensoriais (primários e secundários) e insulares (granulares, desgranulares e agranulares) um grande número de células incorporou CTb após injeções deste traçador centradas no DRt. Pelo contrário, nenhum dos estudos anterógrados mostrou comunicação eferente do DRt para o córtex.

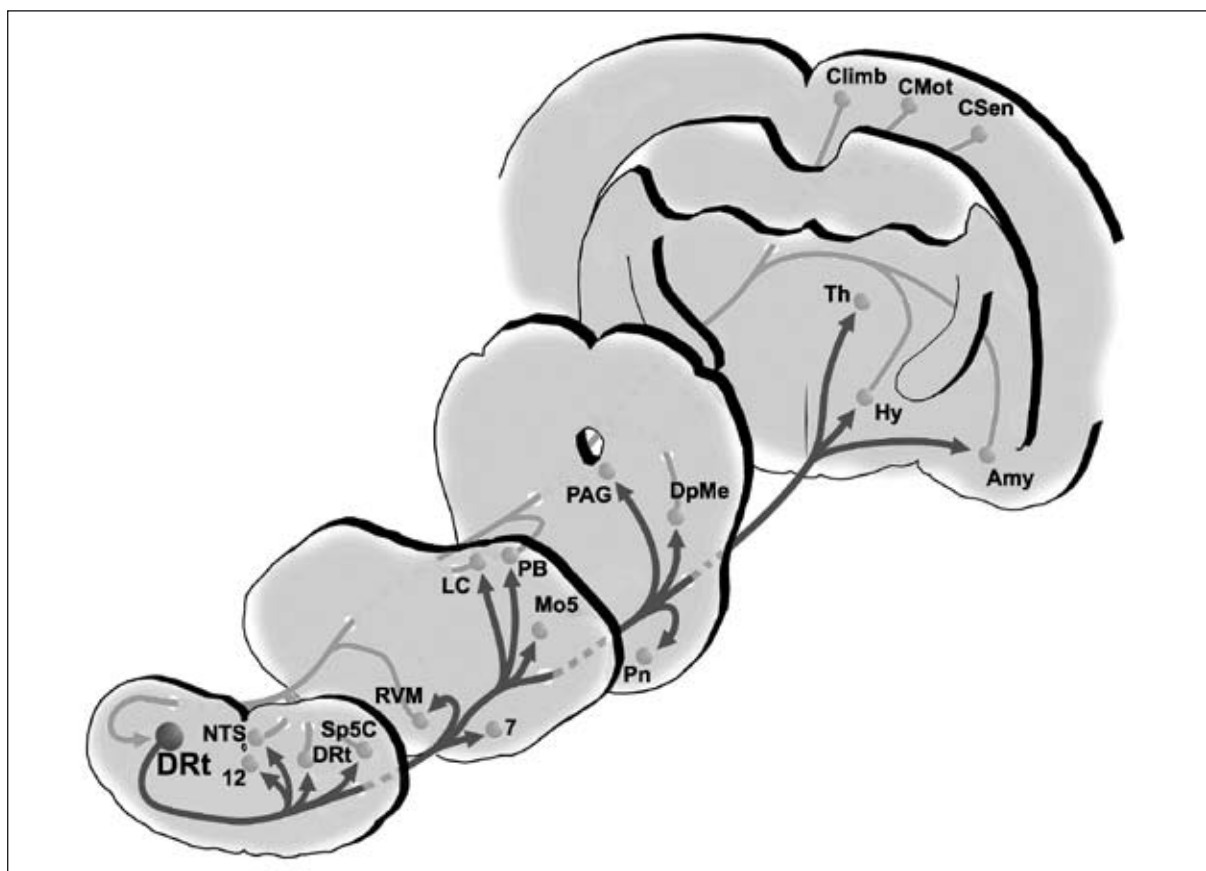


Figura 1. Representação esquemática das projeções encefálicas aferentes e eferentes do DRt. A cinza claro, na figura, encontram-se representadas as projeções aferentes para o DRt, conforme descritas por Almeida A, et al. (2002) e, a cinza escuro, as projeções eferentes do DRt segundo Leite-Almeida H, et al. (2006).

7: núcleo do nervo facial; 12: núcleo do nervo hipoglosso; Amy: amígdala; Climb: córtex límbico; CMot: córtex motor; CSen: córtex somatossensitivo; DpMe: núcleo mesencefálico profundo; DRt: núcleo reticular dorsal do bulbo raquidiano – lado ipsilateral (grande) e contralateral (pequeno); Hy: hipotálamo; LC: locus coeruleus; Mo5: núcleo motor do trigêmeo; NTS: núcleo do tracto do solitário; PAG: substância periaqueductal cinzenta; PB: núcleo parabraqueal; Pn: núcleos ponticos; RVM: bulbo rostral ventromedial; Sp5C: núcleo do nervo do trigêmeo, parte caudal; Th: tálamo.

A amígdala (Amy) é indubitavelmente uma grande fonte de aferências para o DRt como ficou patente no estudo retrógrado (Almeida A, et al., 2002). Já nos estudos anterógrados, a presença de eferências com origem no DRt, ou não foi detectada (Bernard JF, et al., 1990) ou parecia restrita a algumas áreas do núcleo (Leite-Almeida H, et al., 2006).

Diencefalo

Tálamo

Como anteriormente descrito para o neocórtex, também para o tálamo a comunicação com o DRt é unidireccional, embora neste último se faça no sentido ascendente. De facto, não há registo de injecções com traçadores retrógrados no DRt (ou anterógrados no tálamo) que resultem na marcação de neurónios no tálamo (ou fibras no DRt). Já no caso de injecções com os traçadores anterógrados BDA (Leite-Almeida H, et al., 2006) e PHA (Bernard JF, et al., 1990; Villanueva L, et al., 1998) no DRt, estas resultavam na marcação de terminais axonais num grande número de núcleos talâmicos

dos quais, quer pela quantidade de fibras quer pela consistência na marcação, se destacam os núcleos posterior (Po), parafascicular (PF), ventromedial (VM) e paracentral. Num extenso trabalho retrógrado do grupo liderado por Loewy AD (Krout KE, et al., 2002), injecções sistemáticas de CTb em várias áreas talâmicas mostraram em grande medida concordância com os estudos anterógrados.

Hipotálamo

Injecções de CTb centradas no DRt demonstraram a presença de um grande número de neurónios hipotalâmicos que projectam para o DRt, em particular nos núcleos paraventricular (PVN) e lateral (LH) (Almeida A, et al., 2002). Já no caso de injecções com traçadores anterógrados no DRt, existe discordância entre os dois trabalhos publicados em relação às eferências para o hipotálamo. No caso das injecções com PHA, os autores não detectam a presença de fibras no hipotálamo (Bernard JF, et al., 1990) embora num trabalho posterior seja clara a presença de fibras no LH nos diagramas apresentados pelos autores

(Villanueva L, et al., 1998). No trabalho com BDA é referida a presença de fibras marcadas nos núcleos PVN, LH, Posterior (PH), Arcuado (Arc), entre outros (Leite-Almeida H, et al., 2006).

Mesencéfalo

Ao nível mesencefálico, o trabalho retrógrado de referência mostra aferências para o DRt a partir de várias áreas, das quais se destacam o núcleo rubro (R), o núcleo mesencefálico profundo (DpMe) e a substância cinzenta periaqueducal (PAG) (Almeida A, et al., 2002). Adicionalmente, foi também demonstrado que estas áreas recebem projecções eferentes do DRt juntamente com outros núcleos mesencefálicos como o núcleo de Forel (F) e a substância negra (SN) (Leite-Almeida H, et al., 2006).

Ponte

As áreas noradrenérgicas da ponte, A5 e *locus coeruleus* (LC), estão bidireccionalmente ligadas com o DRt. Da mesma forma, os núcleos parabraquiais (PB) mostram também estar reciprocamente ligados com o DRt, embora no caso do estudo retrógrado a marcação de neurónios estivesse presente essencialmente em áreas mediais (Almeida A, et al., 2002), enquanto que no estudo anterógrado os terminais marcados estavam presentes quer nas áreas laterais quer mediais (Leite-Almeida H, et al., 2006). Finalmente, o núcleo motor do trigémeo (Mo5) recebe uma grande projecção do DRt que não se repete em sentido oposto (ver «Bolbo raquidiano» para restantes núcleos motores de controlo orofacial). A presença de marcação, retrógrada e anterógrada, foi detectada em menores quantidade em diversos núcleos pontinos, nomeadamente nos basilares (Pn).

Cerebelo

No cerebelo, apenas os núcleos profundos apresentam marcação após injeção de traçadores retrógrados ou anterógrados no DRt. Não existem conexões com o córtex cerebeloso (Almeida A, et al., 2002; Leite-Almeida H, et al., 2006).

Bolbo raquidiano

Por todo o encéfalo, mas muito em particular no bolbo raquidiano, ocorre uma grande sobreposição entre as projecções retrógradas e anterógradas do DRt. Assim, em estudos anterógrados e retrógrados foi possível identificar neurónios e fibras por toda a formação reticular, no núcleo do tracto do solitário (NTS), núcleo do nervo do trigémeo (Sp5C), oliva inferior (OI) e núcleos do bolbo rostral ventromedial (RVM) (Almeida A, et al., 2002; Leite-Almeida H, et al., 2006). Excepcionalmente, os núcleos do nervo hipoglosso (12) e facial (7), tal como já atrás referido para o Mo5, recebem uma quantidade elevada de eferências do DRt

mas os seus neurónios não projectam de volta para o DRt (Leite-Almeida H, et al., 2006). Este dado é coerente com a natureza essencialmente motora dos núcleos Mo5, 7 e 12, que projectam maioritariamente ou exclusivamente para os músculos mandibulares, faciais e linguais (Fat RA, Norgren R, 1997a, 1997b, 1997c).

Considerações funcionais

Nesta secção os circuitos, DRt-CD-DR e Climb-DRt-CD são descritos para ilustrar duas situações onde o estudo anatómico precedeu o estudo fisiológico (e/ou patológico) e, de certa maneira, permitiu antever a função.

DRt-CD-DRt

A primeira demonstração de ligações recíprocas entre o DRt e o CD foi feita num estudo ultra-estrutural de microscopia electrónica onde, após injeção dos traçadores CTb ou HRP no DRt, se observou na medula espinhal a presença de terminais axonais marcados* de neurónios do DRt em contacto sináptico com neurónios espinhais das lâminas superficiais do CD (Almeida A, et al., 1993). Nesse mesmo estudo, verificou-se que as sinapses entre estruturas marcadas eram do tipo assimétrico, aspecto morfológico associado a sinapses excitatórias em vários locais do SNC (Gray EG, 1969 e 1971). Assim, parecia evidente deste estudo que não só o DRt e o CD comunicavam em circuito «fechado», mas também que o sinal poderia eventualmente ser amplificado. Dez anos mais tarde, é publicado o primeiro registo *in loco* do circuito em funcionamento, por meio de técnicas electrofisiológicas (Dugast C, et al., 2003). Isolando neurónios no CD que respondiam a estímulos eléctricos nódicos aplicados no nervo ciático, verificou-se que, após a injeção de um aminoácido excitatório (glutamato) no DRt, os neurónios do CD ficavam mais excitáveis. Estava por fim comprovada a capacidade facilitadora do DRt sobre neurónios do CD que respondiam a estímulos nódicos. Entre 1993 e 2003, diferentes trabalhos de comportamento em ratos haviam já fornecido pistas sólidas nesse sentido. Assim, a lesão ou estimulação do DRt inibia ou facilitava, respectivamente, a resposta à dor em modelos de dor aguda (modelos de flexão da cauda e placa quente) (Almeida A, et al., 1996) e inflamatória (teste do formol) (Almeida A, et al., 1999).

Climb-DRt-CD

Os estudos anatómicos, retrógrados e anterógrados, aqui citados indiciam um envolvimento do DRt na componente afectiva-volitiva da dor (por oposição à componente sensorial-discriminativa) (Almeida A, et al., 2002). Por um lado, várias áreas

*Note-se que os traçadores CTb e HRP (Quadro 1) são poderosos traçadores retrógrados, amplamente usados neste tipo de estudos, embora possuam também propriedades anterógradas.

Quadro 1. Resumo dos principais estudos que de forma directa ou indirecta contribuíram para o delineamento da anatomia das conexões eferentes e aferentes do DRt

Eferências do DRt			
Estudos anterógrados	Traçador	Local de injeção	Áreas estudadas
(Bernard JF, et al., 1990)	PHA	DRt	encéfalo
(Almeida A, et al., 1993)	PHA		medula espinhal
(Villanueva L, et al., 1998)	PHA		diencéfalo
(Leite-Almeida H, et al., 2006)	BDA		encéfalo
Estudos retrógrados			
(Tavares I, Lima D, 1994)	CTb	medula espinhal	DRt
(Villanueva L, et al., 1998)	WGA-apo-HRP-Au	VM (tálamo)	
(Almeida A, et al., 2000)	CTb	medula espinhal	
(Krout KE, et al., 2002)	CTb	tálamo (diversas áreas)	
(Monconduit L, et al., 2002)*	FG	medula espinhal	
	TMR	VM (tálamo)	
Aferências ao DRt			
Estudos retrógrados	Traçador	Local de injeção	Áreas estudadas
(Almeida A, et al., 1993)	CTb/HRP	DRt	medula espinhal
(Almeida A, Lima D, 1997)	CTb		medula espinhal
(Almeida A, et al., 2002)	CTb		encéfalo
Estudos anterógrados			
(Almeida A, et al., 1995)	BDA	medula espinhal	DRt
(Raboisson P, et al., 1996)	PHA	medula espinhal	

*Injeção simultânea com dois traçadores em áreas distintas; neurónios duplamente marcados no DRt indica a simultaneidade da projecção (colaterais).

BDA: dextrano amina biotinilada; CTb: subunidade b da toxina da cólera; DRt: núcleo reticular dorsal (*dorsal reticular nucleus*); FG: *flourogold*; HRP: peroxidase do rábano (*horseradish peroxidase*); PHA: *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*; TMR: dextrano marcado com tetrametilrodamina (*tetramethylrhodamine-labelled dextran*); VM: núcleo ventromedial do tálamo; WGA-apo-HRP-Au: aglutinina do gérmen do trigo-apo-HRP (*wheat germ agglutinin-apo-HRP-gold*).

que fazem parte do sistema límbico[†], incluindo áreas corticais como o córtex do cíngulo (aqui designaremos de uma forma genérica por Climb as áreas do córtex que são actualmente consideradas de límbicas), a Amy e o hipotálamo enviam projecções para o DRt. Por outro, o DRt projecta essencialmente para áreas mais mediais do tálamo, que se consideram estar envolvidas na componente motivacional-afectiva da dor. De forma análoga ao já citado trabalho de Dugast C, et al. (2003), verificou-se que a actividade de neurónios do CD susceptíveis de serem activados por estimulação do nervo ciático, está aumentada quando o Climb é electricamente estimulado (Zhang L, et al., 2005). Os mesmo autores verificaram que o efeito facilitador da actividade do Climb era mediado via Drt, visto que lesões nesta área aboliam o efeito da estimulação do Climb. Uma vez mais, a anatomia das conexões do DRt esteve na base do estudo funcional que confirmou a hipótese já levantada pela neuroanatomia.

Outro possíveis circuitos funcionais

Apesar do manancial de informação já recolhido sobre o DRt, quer na vertente anatómica quer fun-

cional, existem ainda muitas perguntas sem resposta. Posto de outra forma, não existem ainda modelos suficientemente robustos e abrangentes que incorporem de forma coerente a vasta rede de conexões entre o DRt e o SNC por um lado e, por outro, a fisiologia subjacente a esta área. Como ficou patente nos circuitos DRt-CD-DRt e Climb-DRt-CD descritos anteriormente, não só foi possível comprovar a existência das vias descritas com recurso a traçadores neuronais, como foi ainda possível antever em grande medida o carácter funcional das mesmas. No entanto, em relação a muitas outras áreas do SCN que se verificaram receber/enviar projecções do/para o DRt, não existe ainda evidência experimental que ateste a extensão do seu envolvimento e o carácter do mesmo nos circuitos funcionais onde o DRt está integrado. Por exemplo, o DRt projecta, consistentemente, uma grande quantidade de fibras para os núcleos Mo5, 7 e 12 iniciando uma forte componente funcional que continua por demonstrar (Leite-Almeida H, et al., 2006). O já bem estudado papel do DRt no circuito endógeno de controlo da dor leva a uma primeira hipótese de envolvimento do DRt em reacções de expressão facial e vocalização que podem ser despoletadas por estímulos dolorosos. Outra hipótese passaria por admitir a presença no DRt de uma população de neurónios, que seria do ponto de vista funcional, mista. Qualquer uma destas hipóteses carece de evidência experimental.

Um segundo exemplo de ligação anatomofuncional refere-se às conexões eferentes e aferen-

[†]A designação de sistema límbico engloba um número de áreas encefálicas ligadas ao processamento emocional. Não existe actualmente um consenso generalizado quanto à validade anatómica e/ou funcional do conceito (Heimer L, Van Hoesen GW. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30:126-47.)

tes do DRt com o RVM e a PAG. Neste caso, dado o papel central destas áreas no circuito endógeno de controlo da dor, será mais fácil, pelo menos do ponto de vista teórico, pressupor um plano funcional. Como hipótese de trabalho, será facilmente aceitável encarar este circuito como uma ligação entre áreas distintas envolvidas no controlo da dor, de cujo balanço de actividade poderá resultar maior ou menor anti/pronocicepção. Faltam trabalhos electrofisiológicos que confirmem esta hipótese.

Conclusões

Olhando para a distribuição de marcação retrógrada e anterógrada com origem no DRt (Fig. 1), verifica-se que um grande número de áreas, muitas delas aparentemente não ligadas ao sistema endógeno de controlo da dor, continuam ainda sem um modelo funcional que ateste a sua ligação (e o carácter desta). É importante não descartar a hipótese de alguma da informação obtida por meio de traçadores neuronais não representar mais do que um artefacto experimental. Os dois circuitos aqui apresentados, (DRt → 7, Mo5, 12; DRt ↔ RVM, PAG), para além da quantidade de marcação retrógrada e anterógrada que de um certo modo é indicador de que não se trata de algo fortuito, foram também caracterizados por diferentes grupos de investigação, de forma reproduzível independentemente da técnica retrógrada ou anterógrada e do traçador (Quadro 1), deixando poucas dúvidas sobre o potencial funcional do circuito. No entanto, este só poderá ser determinado quando se conhecerem as consequências da manipulação dessas áreas. Isto foi conseguido de forma muito satisfatória no caso do circuito DRt-CD-DRt, onde por recurso a técnicas electrofisiológicas (Dugast C, et al., 2003) e observando o comportamento (Almeida A, et al., 1996 e 1999), se provou o carácter funcional do circuito. De forma um pouco mais incompleta, o circuito Climb-DRt-CD foi caracterizado electrofisiologicamente provando-se a funcionalidade do circuito, embora falte ainda testar *in vivo* os efeitos da sua manipulação.

Os autores defendem que o tipo de análise aqui apresentada para os circuitos DRt → 7, Mo5, 12 e DRt ↔ RVM, PAG, embora limitada pelo seu carácter especulativo, poderá ser útil no levantamento de hipóteses e consequente formulação de planos experimentais ao nível da fisiologia e comportamento. Os circuitos DRt-CD-DRt e Climb-DRt-CD foram um exemplo bem sucedido deste tipo de abordagem experimental para o estudo da dor.

Bibliografia

Almeida A, Cobos A, Tavares I, Lima D. Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Eur J Neurosci* 2002;16:81-95.

Almeida A, Lima D. Activation by cutaneous or visceral noxious stimulation of spinal neurons projecting to the medullary dorsal reticular nucleus in the rat: a c-fos study. *Eur J Neurosci* 1997;9:686-95.

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

Almeida A, Tavares I, Lima D. Projection sites of superficial or deep dorsal horn in the dorsal reticular nucleus. *Neuroreport* 1995;6:1245-8.

Almeida A, Tavares I, Lima D. Reciprocal connections between the medullary dorsal reticular nucleus and the spinal dorsal horn in the rat. *Eur J Pain* 2000;4:373-87.

Almeida A, Tavares I, Lima D, Coimbra A. Descending projections from the medullary dorsal reticular nucleus make synaptic contacts with spinal cord lamina I cells projecting to that nucleus: an electron microscopic tracer study in the rat. *Neuroscience* 1993;55:1093-106.

Almeida A, Tjolsen A, Lima D, Coimbra A, Hole K. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res Bull* 1996;39:7-15.

Bernard JF, Villanueva L, Carroue J, Le Bars D. Efferent projections from the subnucleus reticularis dorsalis (SRD): a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neurosci Lett* 1990;116:257-62.

Bouhassira D, Bing Z, Le Bars D. Effects of lesions of locus coeruleus/subcoeruleus on diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Res* 1992;571:140-4.

Dugast C, Almeida A, Lima D. The medullary dorsal reticular nucleus enhances the responsiveness of spinal nociceptive neurons to peripheral stimulation in the rat. *Eur J Neurosci* 2003;18:580-8.

Fay RA, Norgren R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei in the rat using pseudorabies virus. II. Facial muscle motor systems. *Brain Res Brain Res Rev* 1997a;25:276-90.

Fay RA, Norgren R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei using pseudorabies virus. I. Masticatory muscle motor systems. *Brain Res Brain Res Rev* 1997b;25:255-75.

Fay RA, Norgren R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei using pseudorabies virus. III. Lingual muscle motor systems. *Brain Res Brain Res Rev* 1997c;25:291-311.

Gray EG. Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review. *Prog Brain Res* 1969;31:141-55.

Gray EG. The fine structural characterization of different types of synapse. *Prog Brain Res* 1971;34:149-60.

Heimer L, Van Hoesen GW. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30:126-47.

Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 2000;62:327-51.

Krout KE, Belzer RE, Loewy AD. Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 2002;448:53-101.

Leite-Almeida H, Valle-Fernandes A, Almeida A. Brain projections from the medullary dorsal reticular nucleus: An anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Neuroscience* 2006;140:577-95.

Lima D. A spinomedullary projection terminating in the dorsal reticular nucleus of the rat. *Neuroscience* 1990;34:577-89.

Lima D, Almeida A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog Neurobiol* 2002;66:81-108.

Lima D, Coimbra A. Structural types of marginal (lamina I) neurons projecting to the dorsal reticular nucleus of the medulla oblongata. *Neuroscience* 1990;34:591-606.

Monconduit L, Desbois C, Villanueva L. The integrative role of the rat medullary subnucleus reticularis dorsalis in nociception. *Eur J Neurosci* 2002;16:937-44.

Raboisson P, Dallel R, Bernard JF, Le Bars D, Villanueva L. Organization of efferent projections from the spinal cervical enlargement to the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 1996;367:503-17.

Tavares I, Lima D. Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. *Exp Brain Res* 1994;99:455-63.

Villanueva L, Bing Z, Bouhassira D, Le Bars D. Encoding of electrical, thermal, and mechanical noxious stimuli by subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. *J Neurophysiol* 1989;61:391-402.

Villanueva L, Bouhassira D, Bing Z, Le Bars D. Convergence of heterotopic nociceptive information onto subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. *J Neurophysiol* 1988;60:980-1009.

Villanueva L, Bouhassira D, Le Bars D. The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain* 1996;67:231-40.

Villanueva L, Desbois C, Le Bars D, Bernard JF. Organization of diencephalic projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a retrograde and anterograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol* 1998;390:133-60.

Zhang L, Zhang Y, Zhao ZQ. Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. *Eur J Neurosci* 2005;22:1141-8.

Expressão do ARNm para as Subunidades do Receptor GABA_B no Tálamo de Ratos Normais e Monoartríticos

Joana Ferreira-Gomes, Fani L. Neto e José M. Castro-Lopes

Resumo

Os receptores GABA_B têm sido relacionados com fenómenos de plasticidade neuronal que ocorrem na medula espinhal durante o desenvolvimento de uma dor inflamatória crónica. No entanto, o seu papel a nível talâmico encontra-se ainda pouco elucidado. No presente estudo, avaliámos se a expressão do ARNm das subunidades 1a, 1b e 2 do receptor GABA_B (GABA_{B(1a)}}, GABA_{B(1b)}} e GABA_{B2}}) se encontra regulada no tálamo, como parte da resposta do sistema nociceptivo a um aumento crónico da informação nóxica decorrente da indução experimental de uma monoartrite (MA).

Foi efectuada uma hibridação *in situ* com sondas de oligonucleótidos marcadas radioactivamente com [³⁵S], em secções do encéfalo de ratos controlo e de ratos com 2, 4, 7 e 14 dias de MA (n = 6/grupo). A distribuição do ARNm para o GABA_{B(1a)}}, GABA_{B(1b)}} e GABA_{B2}} foi determinada bilateralmente no complexo ventrobasal (VB) e nos núcleos posterior (Po), centromediano/centrolateral (CM/CL) e reticular (Rt) do tálamo.

Foram observadas alterações significativas na expressão do ARNm das subunidades GABA_{B(1b)}} e GABA_{B2}} apenas no VB e no Po, nos diferentes tempos de MA estudados. Assim, no VB verificou-se um decréscimo contralateral da expressão do ARNm para o GABA_{B2}} aos 2 e 4 dias de MA e da expressão de GABA_{B(1b)}} aos 4, 7 e 14 dias de doença. No Po, observou-se um aumento bilateral da expressão do ARNm para o GABA_{B(1b)}} e um decréscimo ipsilateral à articulação afectada para o GABA_{B2}} aos 2 dias de inflamação.

Os resultados sugerem que a expressão de GABA_{B(1b)}} e GABA_{B2}} no VB e no Po é regulada pela chegada de informação nóxica, e que estes receptores podem contribuir para as alterações funcionais que ocorrem no tálamo em situações de dor inflamatória crónica.

Palavras-chave: GABA_{B(1a)}}, GABA_{B(1b)}}, GABA_{B2}}, Hibridação *in situ*. Dor crónica inflamatória. Nocicepção.

Abstract

Many studies have implicated GABA_B receptors in the neuronal plasticity events occurring in the spinal cord during the development of chronic inflammatory pain. However, at the thalamic level, their role is still poorly understood. In this study, we evaluated whether the mRNA expression of GABA_B receptor subunits 1a, 1b and 2 (GABA_{B(1a)}}, GABA_{B(1b)}}, and GABA_{B2}}) is regulated in the thalamus, as part of the response to chronically enhanced noxious input arising from experimental monoarthritis (MA).

In situ hybridization with [³⁵S]-labelled oligonucleotide probes was performed in brain sections of control, 2, 4, 7 and 14 days MA rats' (n = 6/group). The mRNA distribution of GABA_{B(1a)}}, GABA_{B(1b)}}, and GABA_{B2}} was determined bilaterally in the ventrobasal complex (VB), posterior (Po), centromedial/centrolateral (CM/CL) and reticular (Rt) thalamic nuclei. The amount of mRNA was expressed as times fold of background values.

GABA_{B(1b)}} and GABA_{B2}} mRNA expression were significantly altered in VB and Po, in the time points of MA studied. In the Po there was a bilateral increase in GABA_{B(1b)}} mRNA expression and an ipsilateral decrease for GABA_{B2}} at 2 days of inflammation. In the VB there was a contralateral decrease of mRNA expression for GABA_{B2}} at 2 and 4 days of MA and of GABA_{B(1b)}} at 4, 7 and 14 days of the disease.

These data suggest that the expression of GABA_{B(1b)}} and GABA_{B2}} in the VB and Po is regulated by the incoming noxious input, and that GABA_B receptors might play a role in the plasticity that occur in the thalamus during chronic inflammatory pain.

Key words: GABA_{B(1a)}}, GABA_{B(1b)}}, GABA_{B2}}, *In situ* hybridization. Chronic inflammatory pain. Nociception.

Introdução

A percepção da dor somática envolve a estimulação e activação de neurónios periféricos, designados nociceptores, que subsequentemente activam neurónios da medula espinhal que modulam e transmitem a informação nociceptiva a centros superiores do sistema nervoso central (SNC). As regiões supra-espinhais actuam como recipientes da transmissão nociceptiva ascendente e como origem de vias modulatórias descendentes¹⁻⁴. Dentre estas regiões, o tálamo desempenha um papel importante no controlo e modulação da informação sensitiva que é transmitida para o córtex cerebral⁵, participando deste modo no processamento neuronal da dor^{4,6,7}. Estudos anatómicos e electrofisiológicos sugerem que, de entre os núcleos talâmicos, os núcleos ventro-póstero-medial (VPM) e ventro-póstero-lateral (VPL), os quais são normalmente denominados em conjunto como complexo ventrobasal (VB), assim como o núcleo posterior (Po) do tálamo, são locais importantes de transmissão de impulsos nociceptivos que chegam da medula espinhal. Eles constituem o chamado «tálamo lateral» e contêm neurónios que projectam maioritariamente para o córtex cerebral somatossensitivo, sendo por isso associados à componente sensitivo-discriminativa da dor^{2,4-10}. Também importantes na nocicepção parecem ser os núcleos centromediano e centrolateral (CM/CL), que fazem parte do tálamo medial e que estão provavelmente relacionados com o componente afectivo-motivacional da dor^{2,4-6}. O núcleo reticular do tálamo (Rt) é considerado um terceiro tipo de núcleo talâmico, e tem uma localização peculiar rodeando dorsolateralmente os restantes núcleos do tálamo. Este núcleo estabelece uma fronteira entre os restantes núcleos talâmicos e o córtex, tendo uma função moduladora sobre a actividade do circuito tálamo-córtico-talâmico¹¹⁻¹³.

O tálamo é constituído por três classes principais de neurónios: neurónios de transmissão, interneurónios locais γ -amino-butírico-acidérgicos (GABAérgicos) e neurónios GABAérgicos localizados no Rt^{11,14}. Para além do ácido γ -amino-butírico (GABA), outros neurotransmissores são utilizados pelos neurónios talâmicos, tais como acetilcolina, noradrenalina, serotonina e L-glutamato (L-Glu). Estes neurotransmissores modulam a acção dos núcleos talâmicos, alguns deles contribuindo para as alterações relacionadas com sua actividade durante a nocicepção e mostrando níveis de expressão alterados em resposta a uma informação nóxica crónica¹⁵.

O GABA é o neurotransmissor inibitório mais abundante no SNC dos mamíferos, desempenhando funções importantes na regulação da actividade e plasticidade neuronais e na patogénese. A sua actividade é exercida através de três subtipos de receptores, dois ionotrópicos (GABA_A e GABA_C)^{16,17} e um metabotrópico acopla-

do a proteínas G (GABA_B). Os receptores GABA_B funcionais existem como heterodímeros de duas subunidades, GABA_{B1} e GABA_{B2}¹⁸⁻²¹. A subunidade GABA_{B1} é responsável pela ligação do ligando ao receptor GABA_B dimérico funcional²²⁻²⁴, enquanto que a subunidade GABA_{B2} parece ser responsável pelo transporte da subunidade GABA_{B1} para a superfície celular e pela ligação à proteína G e subsequente activação²⁵⁻²⁹. Foram identificadas algumas variantes da subunidade GABA_{B1}, mas nem todas são capazes de formar receptores funcionais³⁰⁻³⁵. GABA_{B(1a)}} e GABA_{B(1b)}} são duas variantes de *splicing* altamente conservadas, que diferem apenas no comprimento das suas regiões N-terminais³¹, e as combinações GABA_{B(1a)}}/GABA_{B2} e GABA_{B(1b)}}/GABA_{B2} são as mais expressas e mais bem estudadas.

Diversos estudos electrofisiológicos e farmacológicos têm implicado os receptores GABA_B em mecanismos de processamento da dor na medula espinhal^{36,37}. Contudo, o papel dos receptores GABA_B no processamento da dor crónica em núcleos de transmissão talâmicos é pouco conhecido. Por outro lado, é sabido que a dor crónica inflamatória se acompanha de alterações prolongadas na função e actividade do SNC^{38,39}. Assim, em ratos monoartríticos (MA), um modelo animal de dor crónica inflamatória induzido pela injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund (CFA) na articulação tibio-társica do rato, que se caracteriza por uma inflamação estável e prolongada (semanas a meses), com aparecimento de hiperalgesia e alodínia na articulação afectada^{40,41}, foi encontrado um aumento da actividade neuronal em diversas áreas do SNC relacionadas com mecanismos de processamento de dor, incluindo vários núcleos talâmicos⁴². Essas alterações apresentaram um padrão temporal não-linear, possivelmente reflectindo a existência de mecanismos modulatórios que facilitam e/ou inibem a transmissão da informação nociceptiva resultante da MA⁴². Subsequentemente foram observadas alterações na expressão de ARNm de vários subtipos de receptores metabotrópicos do glutamato (mGluRs) em alguns núcleos talâmicos de animais MA a tempos diferentes de inflamação⁴³. Além disso, injeções intra-talâmicas de baclofeno no VB mostraram uma diminuição significativa da pontuação do teste de nocicepção da flexão do tornozelo⁴¹ em ratos monoartríticos⁴⁴.

Dado o envolvimento do GABA na modulação da actividade dos neurónios talâmicos, neste estudo pretendeu-se averiguar, em animais monoartríticos, possíveis alterações da expressão do ARNm para as diferentes subunidades do receptor GABA_B, em quatro regiões talâmicas implicadas no processamento da informação nóxica (VB, Po, CM/CL e Rt)^{45,46}. Foram estudados tempos diferentes de evolução da MA (2, 4, 7 e 14 dias), de maneira a investigar se as alterações seguem um padrão temporal específico. Foi igualmente efectuada uma quantificação da

expressão de ARNm para o GABA_{B2} no núcleo geniculado lateral (NGL), um núcleo talâmico implicado na transmissão de estímulos visuais⁵, de modo a verificar se alterações da expressão desta subunidade do receptor ocorreriam especificamente como resposta ao aumento de estímulo nócico⁴⁶. Adicionalmente, foi quantificada a expressão de ARNm para o GABA_{B(1a)} na área do giro denteado (GD) do hipocampo, como controlo positivo da marcação da hibridação *in situ*⁴⁶.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos (IBMC, Porto, Portugal). A monoartrite foi induzida por injeção intra-articular de CFA na articulação tibio-társica esquerda de acordo com o método descrito por Butler, et al.⁴⁰. Sob a acção de uma breve anestesia com halotano, foram injectados intracapsularmente 50 µl de CFA e os animais foram sacrificados 2, 4, 7 e 14 dias após a injeção (n = 6 por grupo experimental). Um grupo de animais controlo (n = 6) foi injectado de modo semelhante com soro fisiológico e sacrificado após 2 dias. A evolução da reacção inflamatória foi monitorizada usando uma escala subjectiva, onde 0 equivale a não haverem sinais inflamatórios e 4 equivale a uma inflamação severa com repercussões sobre a actividade motora do animal⁴⁷. As experiências foram realizadas de acordo com as regras éticas para o estudo da dor experimental em animais conscientes⁴⁸, bem como com a directiva 86/609/EEC da União Europeia.

Hibridação *in situ*

Para a preparação do tecido, os ratos foram decapitados e os seus encéfalos foram rapidamente dissecados, congelados em gelo seco e armazenados a -80 °C. Foram seccionadas fatias coronais do encéfalo (14 µm de espessura) num crióstato, montadas em lâminas e rapidamente fixadas em 4% paraformaldeído a 4 °C, lavadas em 1x tampão fosfato salino (PBS), desidratadas e armazenadas em etanol 98% a 4 °C até se efectuar a hibridação *in situ*. A hibridação *in situ* radioactiva foi realizada de acordo com o método previamente descrito^{45,46,49,50}. Assim, foram utilizadas sondas sintéticas específicas de oligonucleótidos, 45-mers complementares às sequências da região 273 pb abaixo do codão de iniciação da sequência de rato do receptor GABA_{B(1a)} (*GeneBank Acession number* Y10369), 30-mers complementares às sequências da região 87 pb abaixo do codão de iniciação para o GABA_{B(1b)}⁵¹, e 45-mers complementares às sequências da região 677 pb abaixo do codão de iniciação para o GABA_{B2} (*GeneBank Acession number* AJ011318). As sondas foram marcadas radioactivamente no terminal 3'

com [α -³⁵S]-dATP (1.250 Ci/mmol; *PerkinElmer*, Boston, USA) por acção da terminal transferase (*Roche Diagnostics GmbH*, Germany) e numa razão molar de 30:1 de dATP:oligonucleótido. Para determinar a especificidade de marcação, algumas fatias controlo foram incubadas com excesso de 100 vezes de sonda não-marcada com a correspondente sonda marcada com [³⁵S]. Nessas lâminas não foi detectado nenhum sinal para além dos valores de fundo.

Análise dos dados

Os valores de expressão de ARNm foram determinados em quatro regiões talâmicas, nomeadamente no VB, Po, CM/CL e Rt, em concordância com o seu conhecido envolvimento na nocicepção⁴⁻⁷. Adicionalmente, foi quantificada a expressão de ARNm para o GABA_{B2} e GABA_{B(1a)} no NGL e na área GD do hipocampo, respectivamente. A delimitação dos núcleos foi feita de acordo com o atlas do encéfalo de rato de Paxinos e Watson⁵². Em concordância com estudos prévios⁵⁰, a razão entre a área ocupada pelos grãos de prata e a área total ocupada pelas células foi calculada em cada região nos lados ipsilateral e contralateral à pata injectada. Todas as imagens do mesmo núcleo a diferentes níveis rostro-caudais foram analisadas e foi calculada a média dos resultados para cada animal. Os valores de fundo foram determinados ao acaso nas imagens analisadas, em áreas onde não eram observados corpos celulares e onde, muito provavelmente, não ocorreu marcação específica. Estes valores foram tratados de modo semelhante aos valores dos grãos de prata obtidos sobre as áreas celulares. Subsequentemente, os valores individuais médios obtidos foram divididos pelos valores de fundo e apresentados como «número de vezes acima dos valores de fundo». Os valores médios de expressão de ARNm para cada subunidade do receptor GABA_B, para cada região talâmica estudada, foram obtidos fazendo-se a média dos valores individuais de cada animal nos diferentes grupos experimentais. Os números finais obtidos, que representam os valores de expressão do ARNm específica para cada subtipo e para cada região analisada em cada um dos grupos de animais, equivalem a uma densidade de grãos de prata e são apresentados como a média \pm erro-padrão da média do número de vezes acima dos valores do fundo a que um certo ARNm se encontra expresso. Os valores de densidade de grãos inferiores a 1,5 vezes os valores de fundo foram considerados como sendo iguais aos valores de fundo. Para comparar a expressão de ARNm em cada região talâmica dos ratos controlo, e com 2, 4, 7 e 14 dias de MA, foi efectuada uma análise de variância (ANOVA) para cada região analisada, seguida do teste *post-hoc* LSD. Foi aceite um valor de significância de 0,05.

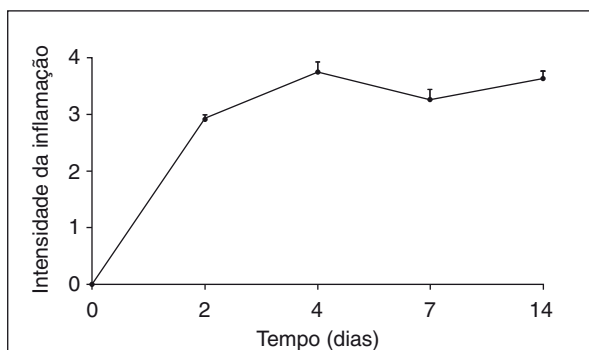


Figura 1. Avaliação da intensidade da inflamação (média ± erro-padrão da média) dos ratos monoartríticos antes da injeção de CFA (tempo 0) e aos 2, 4, 7 e 14 dias de inflamação (n = 6 por grupo experimental).

Resultados

Progressão da inflamação crónica

Os animais controlo que receberam uma injeção intra-articular de soro fisiológico não mostraram quaisquer sinais de inflamação e apresentaram um comportamento normal (pontuação de inflamação 0). Pelo contrário, a injeção de CFA causou respostas fisiopatológicas e comportamentais segundo o padrão temporal que tem sido descrito⁴². Os animais MA mostraram uma notável reacção inflamatória restrita à pata inflamada, com edema intenso, evitando movimentos aos 2 dias após a injeção do CFA (pontuação de inflamação 2 ou 3). Nos grupos com 4, 7 e 14 dias de MA, os animais apresentaram sinais mais severos de inflamação, e evidenciaram um comportamento de defesa, com flexão persistente da articulação injectada (pontuação de inflamação 3 ou 4) (Fig. 1).

Avaliação da expressão do ARNm para as subunidades GABA_{B(1a)}, GABA_{B(1b)} e GABA_{B2}

A expressão de ARNm para o GABA_{B(1a)}, GABA_{B(1b)} e GABA_{B2} foi analisada no VB, Po, CM/CL e Rt de ratos controlo e de ratos MA com 2, 4, 7 e 14 dias após injeção de CFA. Através da coloração de Nissl, verificou-se que em todos os casos a expressão de ARNm se encontrava, aparentemente, restrita às células neuronais (Fig. 2).

GABA_{B(1a)}

Não foi observada nenhuma expressão de ARNm para o GABA_{B(1a)} em toda a extensão rostro-caudal de qualquer das quatro regiões estudadas (VB, Po, CM/CL e Rt) nos animais controlo (níveis de expressão do ARNm inferiores a 1,5 vezes os valores de fundo). Esta falta de expressão de ARNm manteve-se durante todos os tempos de MA. Na região GD do hipocampo, a expressão do ARNm para o GABA_{B(1a)} foi ligeira nos animais controlo (1,8 ± 0,1; média ± erro-padrão da média).

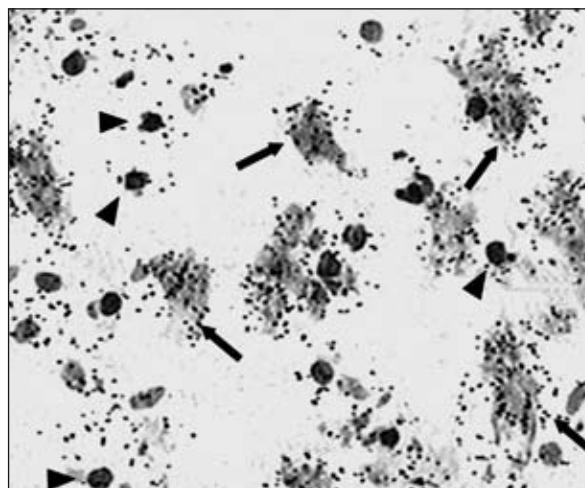


Figura 2. Microfotografia de campo claro de grande ampliação do tálamo onde se mostra a expressão celular do ARNm para o GABA_{B(1b)} em células neuronais (setas); não foi detectada expressão em células gliais (pontas de seta).

GABA_{B(1b)}

No VB, Po e CM/CL, a intensidade da marcação do ARNm para o GABA_{B(1b)} foi muito semelhante nos animais controlo, situando-se os valores entre 2,2 ± 0,2 a 2,7 ± 0,4 vezes os níveis de fundo. Nenhuma diferença foi observada por toda a extensão rostro-caudal das regiões analisadas, assim como nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os lados ipsilateral e contralateral (Fig. 3). Pelo contrário, não foi detectada nenhuma expressão no Rt dos animais controlo em toda a sua extensão rostro-caudal.

Nos ratos monoartríticos, foram observadas alterações estatisticamente significativas na expressão de ARNm para o GABA_{B(1b)} em algumas das regiões analisadas, que foram dependentes do tempo de inflamação e da região. Assim, à me-

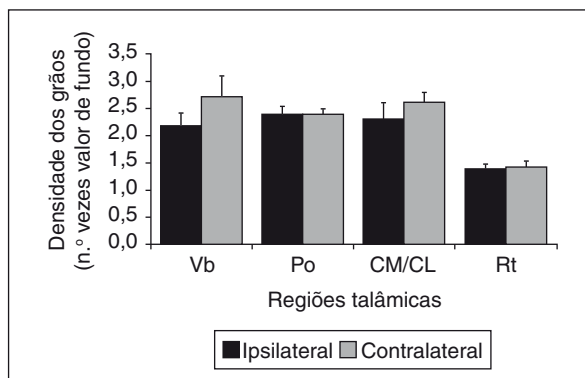
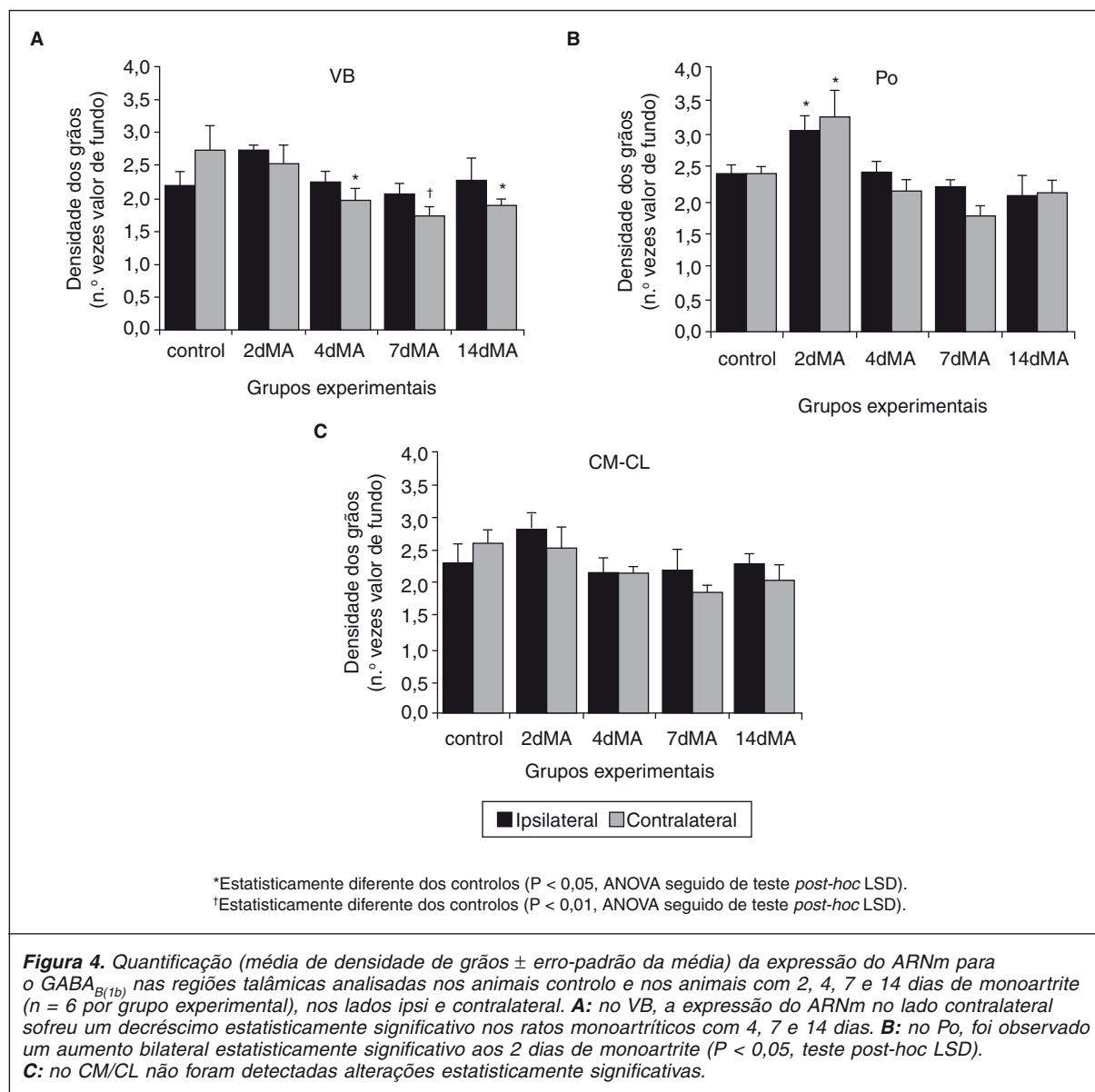


Figura 3. Quantificação (média de densidade de grãos ± erro-padrão da média) da expressão do ARNm para o GABA_{B(1b)} nas regiões talâmicas analisadas nos animais controlo (n = 6), nos lados ipsi e contralateral à articulação injectada com soro fisiológico.



didada que a doença progredia, foi observado um decréscimo nos valores de expressão do ARNm para o $GABA_{B(1b)}$ no VB quando comparados com os controlos. Estas alterações foram restritas ao lado contralateral à articulação injectada, e enquanto aos 2 dias de MA a expressão de ARNm foi semelhante à dos controlos, aos 4, 7 e 14 dias de MA foi detectado um decréscimo estatisticamente significativo de 26% ($P < 0,05$, teste *post-hoc* LSD), 37% ($P < 0,01$, teste *post-hoc* LSD) e 30% ($P < 0,05$, teste *post-hoc* LSD), respectivamente (Figs. 4 A e 5). No lado ipsilateral não se observaram alterações da expressão do ARNm para o $GABA_{B(1b)}$ em todos os tempos de inflamação estudados (Fig. 4 A).

No Po, foi observado um aumento bilateral da expressão de ARNm para o $GABA_{B(1b)}$ estatisticamente significativo aos 2 dias de MA (25 e 38% para o lado ipsilateral e contralateral, respecti-

vamente, $P < 0,05$, teste *post-hoc* LSD) (Figs. 4 B e 6). Contudo, aos 4 dias, a expressão de ARNm retomou níveis basais, tanto no lado ipsilateral como no contralateral.

No CM/CL não foram observadas quaisquer diferenças na expressão do ARNm para o $GABA_{B(1b)}$ no lado ipsilateral, apesar de se observar no lado contralateral um pequeno decréscimo, que não atingiu significância estatística e que foi mais pronunciado aos 7 dias da doença (Fig. 4 C).

Não foi encontrada nenhuma expressão de ARNm para o $GABA_{B(1b)}$ no núcleo Rt em quaisquer dos tempos de MA.

$GABA_{B2}$

A distribuição do transcripto do $GABA_{B2}$ nos animais controlo foi muito semelhante no VB, Po

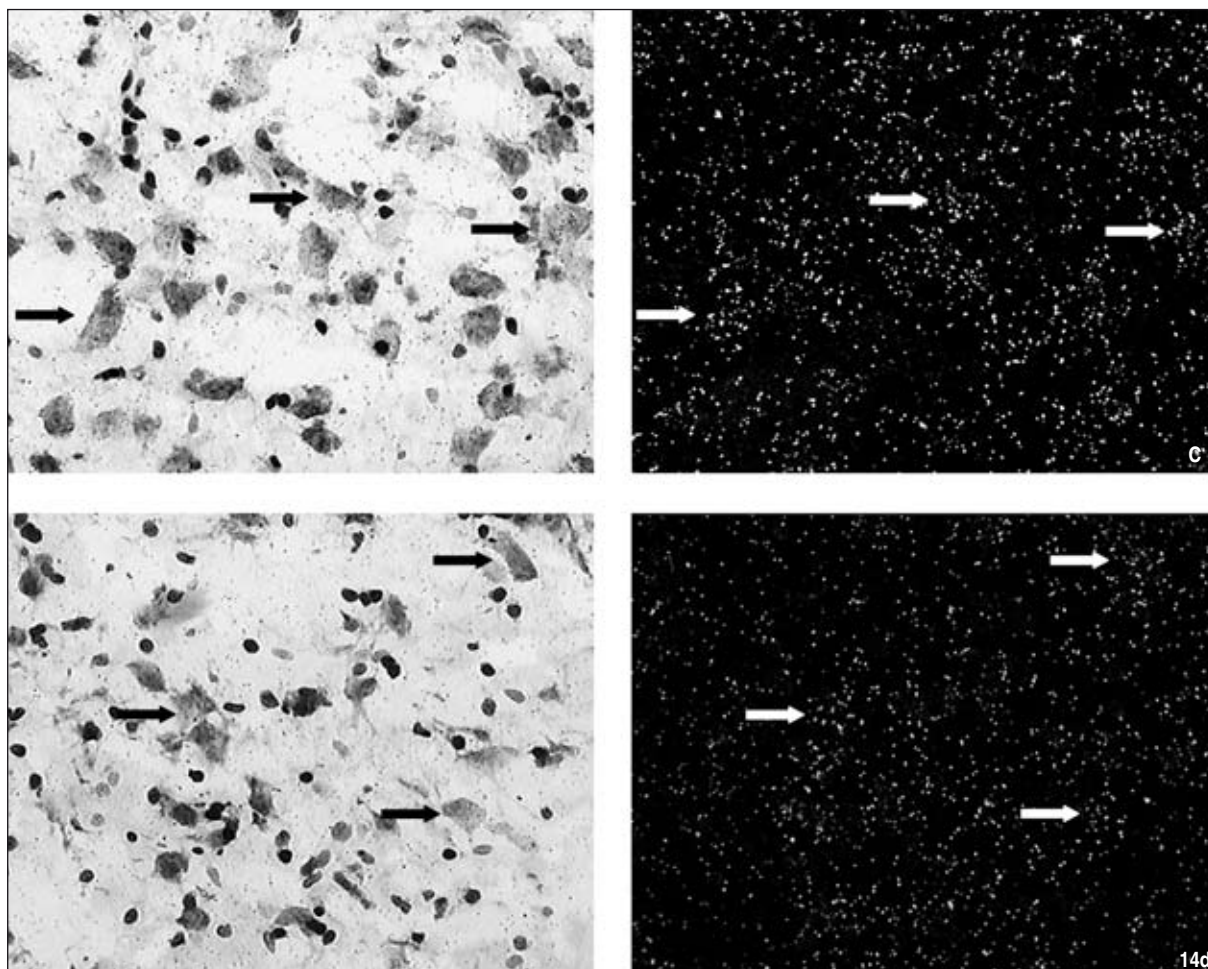


Figura 5. Imagens digitalizadas de microscopia de campo claro (coluna esquerda), e a sua correspondente em campo escuro (coluna direita), de grande ampliação do tálamo, onde se observa expressão do ARNm para o GABA_{B(1b)} no VB contralateral de animais controlo (c) e de ratos monoartríticos com 14 dias (14d). As setas apontam para neurónios que expressam GABA_{B(1b)}}.

e CM/CL, situando-se os valores entre $1,8 \pm 0,1$ a $2,3 \pm 0,1$ vezes superior aos valores de fundo. No NLG, a expressão para o GABA_{B2} foi baixa ($1,6 \pm 0,2$ vezes superior aos valores de fundo). A intensidade da marcação do ARNm observada foi semelhante em toda a extensão rostro-caudal das regiões analisadas, assim como nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os lados ipsilateral e contralateral (Fig. 7). Não foi detectado nenhum sinal específico para o transcrito do GABA_{B2} no Rt dos animais controlo.

A expressão do ARNm para o GABA_{B2} nos ratos monoartríticos apresentou alterações estatisticamente significativas em algumas das regiões talâmicas analisadas. No VB dos ratos monoartríticos observou-se, aos 2 dias de MA, um decréscimo significativo de 43% ($P < 0,01$, teste *post-hoc* LSD) restrito ao lado contralateral à articulação inflamada (Figs. 8 A e 9). Nos ratos com 4 dias de MA, ainda se observou um decréscimo de ARNm estatisticamente significativo no lado contralateral (29%, $P < 0,05$, teste

post-hoc LSD), enquanto aos 7 e 14 dias de inflamação os valores retomaram os níveis basais (Fig. 8 A). No lado ipsilateral, a expressão de ARNm para o GABA_{B2} não sofreu alterações significativas em qualquer dos tempos de doença estudados (Fig. 8 A).

No Po foi também observado uma diminuição da expressão do ARNm para o GABA_{B2} aos 2 dias da MA, estatisticamente significativa no lado ipsilateral (39%, $P < 0,01$, teste *post-hoc* LSD) (Fig. 8 B). Contudo, aos 4 dias a expressão de ARNm sofreu um ligeiro aumento, tanto no lado ipsilateral como no contralateral, retomando os valores dos controlos aos 7 e 14 dias (Fig. 8 B).

No CM/CL foi possível observar pequenas flutuações na expressão do ARNm para o GABA_{B2} que não atingiram significância estatística (Fig. 8 C).

Tal como verificado para o GABA_{B(1a)}} e para o GABA_{B(1b)}}, também não foi encontrada nenhuma expressão de ARNm para o GABA_{B2} no núcleo Rt em quaisquer dos tempos de MA analisados.

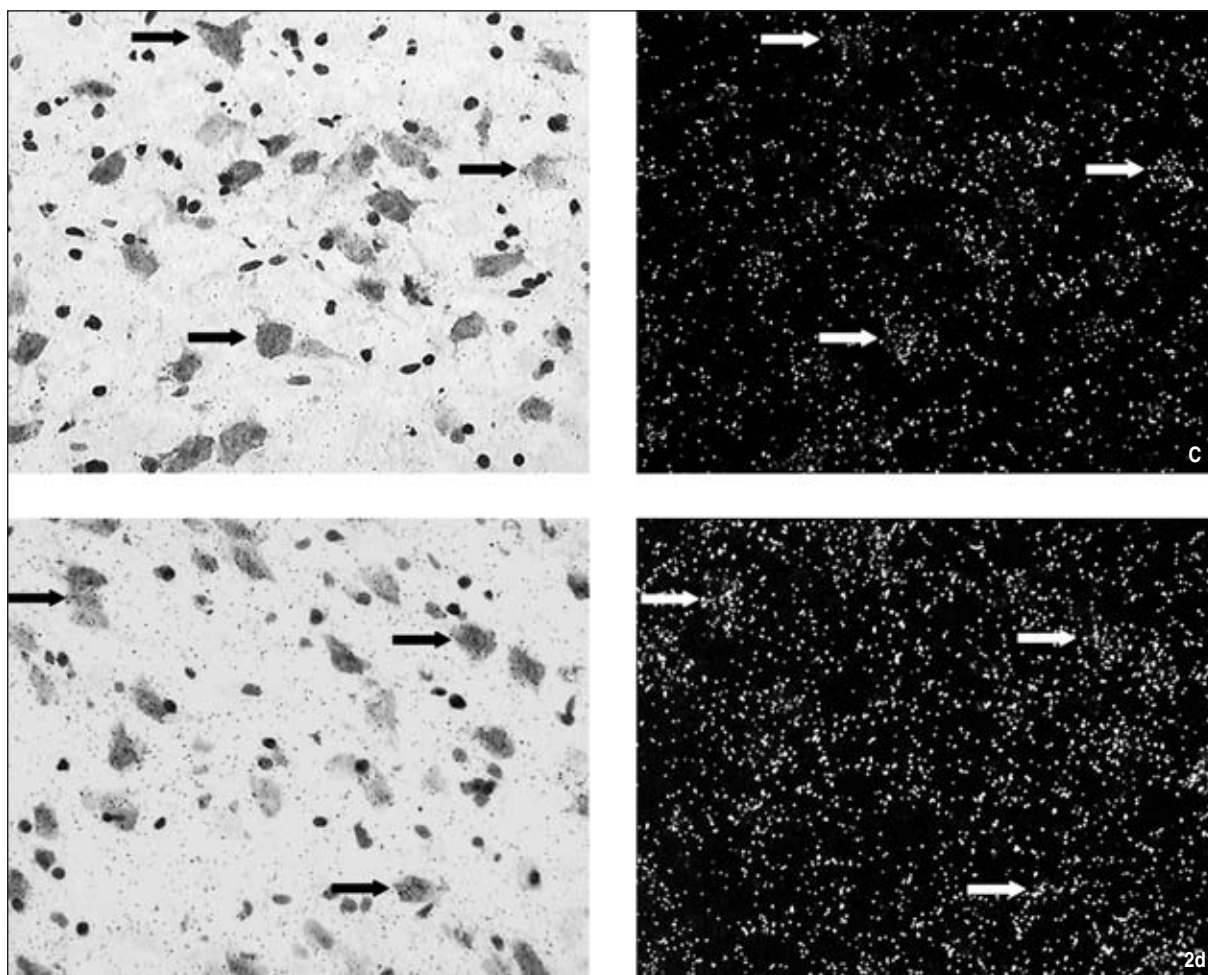


Figura 6. Imagens digitalizadas de microscopia de campo claro (coluna esquerda), e a sua correspondente em campo escuro (coluna direita), de grande ampliação do tálamo, onde se observa expressão do ARNm para o $GABA_{B(1b)}$ no Po contralateral de animais controlo (c) e de ratos monoartríticos com dois dias (2d). As setas apontam para neurónios que expressam $GABA_{B(1b)}$.

No NLG, os valores da expressão de ARNm para o $GABA_{B2}$ observados durante a monoartrite encontravam-se no intervalo dos controlos em todos os tempos de inflamação estudados, nos lados ipsi e contralateral.

Discussão

Expressão do ARNm para as subunidades $GABA_{B(1a)}$, $GABA_{B(1b)}$ e $GABA_{B2}$ em ratos normais

Neste estudo, a expressão supra-espinhal de ARNm para o $GABA_{B(1a)}$, $GABA_{B(1b)}$ e $GABA_{B2}$ foi analisada em quatro regiões talâmicas^{45,46}, escolhidas de acordo com o seu conhecido envolvimento nos mecanismos talâmicos de transmissão nociceptiva, dos quais o VB, o Po e o CM/CL recebem a maioria das projecções ascendentes provenientes da via espinho-talâmica^{2,5}. O núcleo Rt, por seu lado, funciona como um filtro modulando a transferência de toda a informação tálamo-córtico-talâmica, incluindo a do afluxo nociceptivo⁵³. É ainda de notar que estudos anteriores encontraram aumentos da actividade

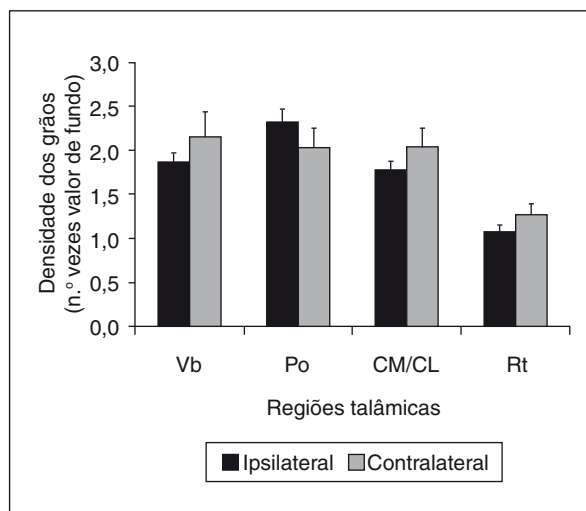
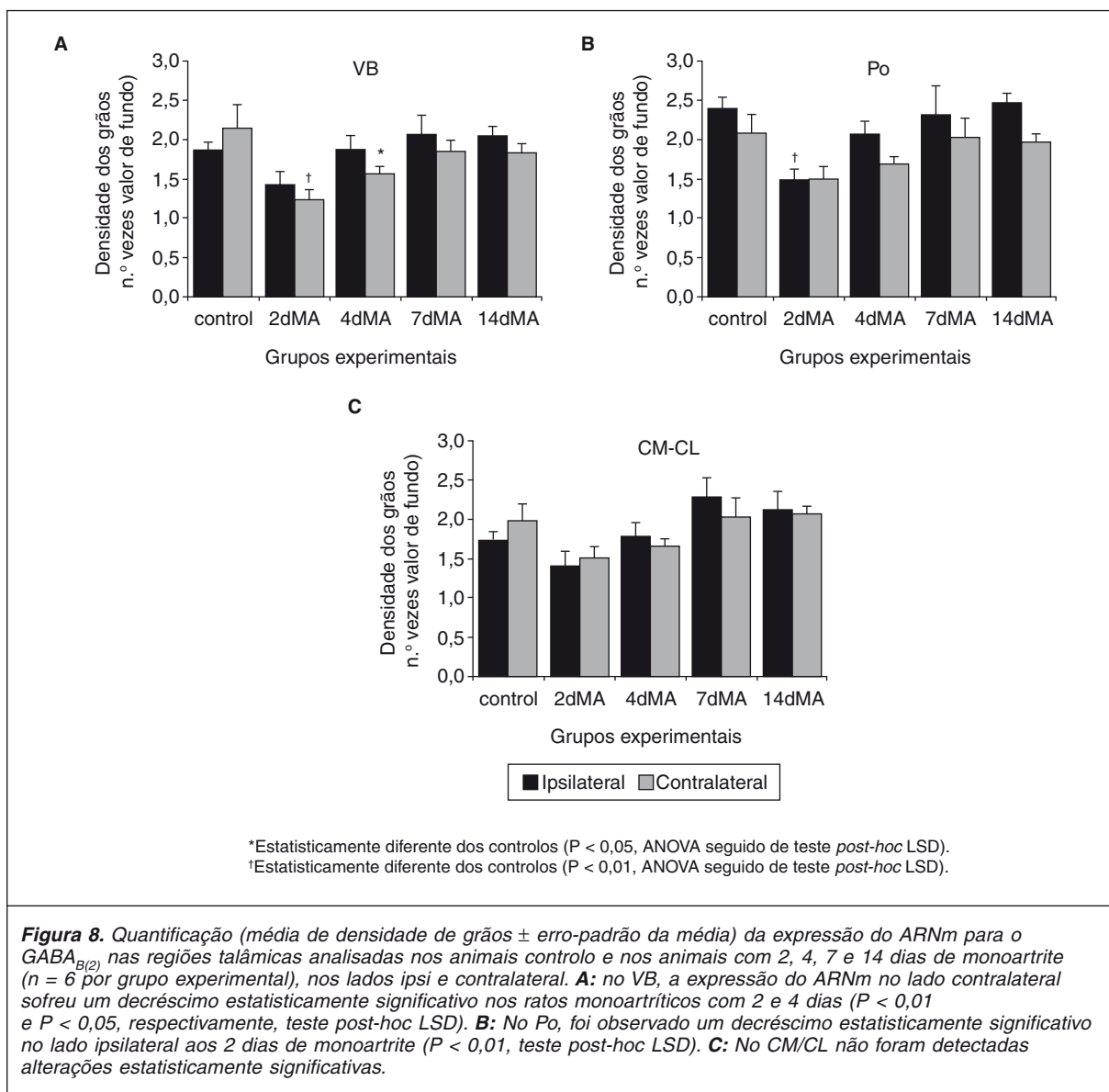


Figura 7. Quantificação (média de densidade de grãos \pm erro-padrão da média) da expressão do ARNm para o $GABA_{B(2)}$ nas regiões talâmicas analisadas nos animais controlo ($n = 6$), nos lados ipsi e contralateral à articulação injectada com soro fisiológico.



neuronal na maioria destas regiões talâmicas em ratos monoartríticos⁴².

No estudo presente foi observada uma diferença da expressão das duas isoformas da subunidade 1. Enquanto para o GABA_{B(1a)} não foi encontrado nenhuma expressão de ARNm em qualquer do núcleos talâmicos analisados (VB, Po, CM/CL e Rt), para o GABA_{B(1b)} a expressão foi moderada nas mesmas regiões, excepto no Rt. Outros autores⁵⁴ demonstraram que a expressão de ARNm para o GABA_{B(1b)} no tálamo é várias vezes superior à do GABA_{B(1a)}. Mais especificamente no VB e Po, Bischoff, et al.⁵⁵ demonstraram esta predominância da expressão de ARNm para o GABA_{B(1b)}. Os dados aqui apresentados são também concordantes com estudos prévios de imunocitoquímica que postulam que o GABA_{B(1b)} é a isoforma predominante no tálamo, córtex cerebral e cerebelo do rato adulto⁵⁶. Estudos usando auto-radiografia quantitativa para o [³H]GABA, demonstraram que

no VB, CM e Po os locais de ligação do receptor GABA_B apresentavam uma expressão moderada a elevada⁵⁷. Mais ainda, Margeta-Mitrovic, et al.⁵⁸ observaram elevada marcação imuno-histoquímica para o GABA_{B(1)} no Po, e moderada no VPM, VPL, CM e CL. No entanto, destes trabalhos não é possível concluir qual a contribuição de cada uma das isoformas, 1a ou 1b, para esta expressão observada no tálamo.

De modo a verificar se a falta de expressão de GABA_{B(1a)} encontrada neste estudo era devido a um problema metodológico, a expressão de ARNm para GABA_{B(1a)} na área do GD do hipocampo foi analisada. Nesta região foi possível observar expressão de ARNm para GABA_{B(1a)}, como já havia sido demonstrado por outros autores⁵⁹, excluindo deste modo a hipótese de problemas metodológicos.

A expressão do ARNm para o GABA_{B2} encontrada no VB e CM/CL estão de acordo com um

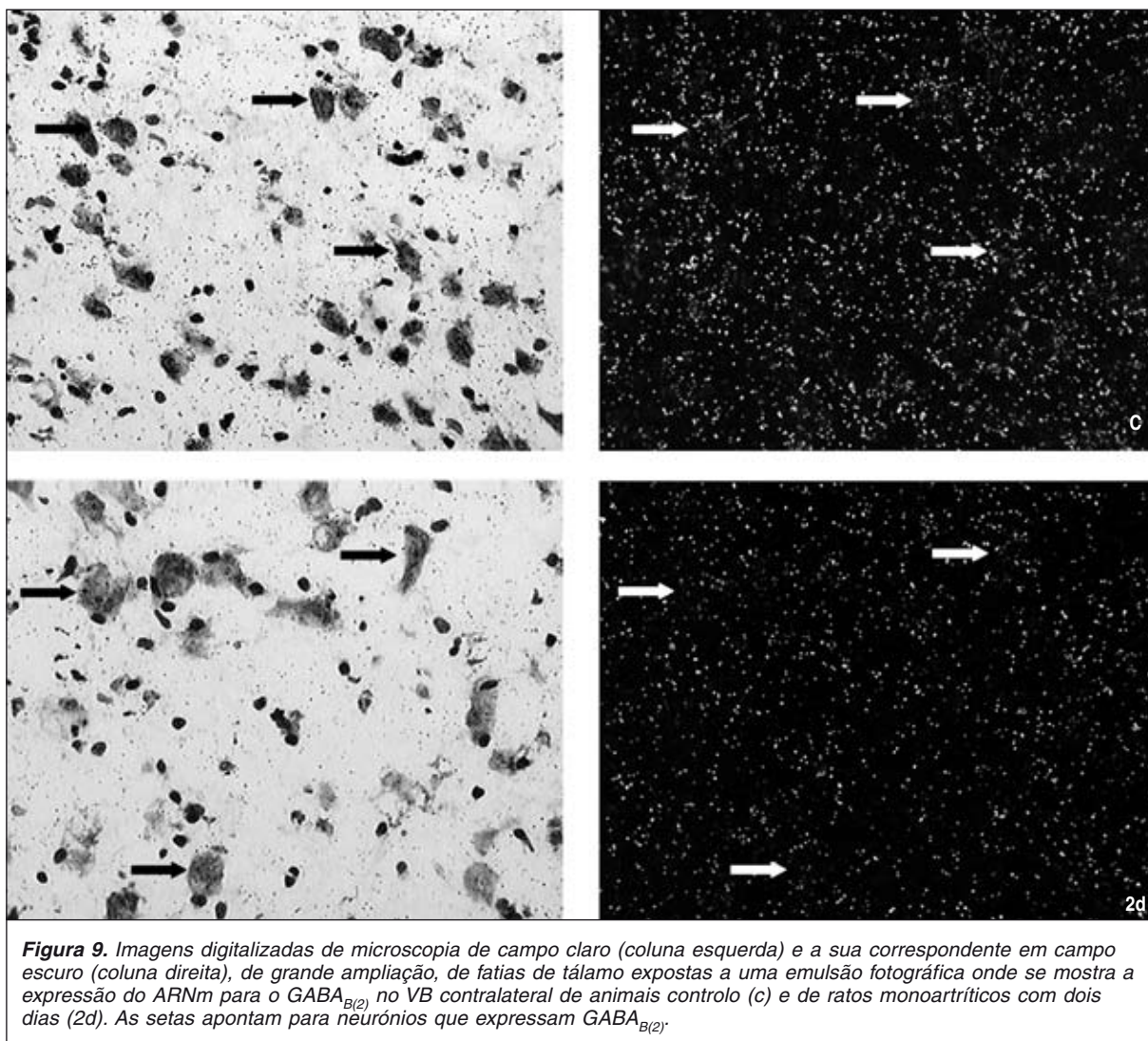


Figura 9. Imagens digitalizadas de microscopia de campo claro (coluna esquerda) e a sua correspondente em campo escuro (coluna direita), de grande ampliação, de fatias de tálamo expostas a uma emulsão fotográfica onde se mostra a expressão do ARNm para o GABA_{B(2)} no VB contralateral de animais controlo (c) e de ratos monoartríticos com dois dias (2d). As setas apontam para neurónios que expressam GABA_{B(2)}.

estudo prévio onde foi observada uma expressão moderada a elevada no VPL e CM de ratos normais⁶⁰. Nesse estudo foi ainda encontrada co-expressão de ARNm para o GABA_{B(1b)} e GABA_{B2} em várias regiões do encéfalo de rato, incluindo núcleos talâmicos⁶⁰. De facto, no nosso trabalho foram observados níveis de expressão muito semelhantes para as duas subunidades.

No nosso estudo, só foi observada expressão do ARNm para o GABA_{B(1b)} e GABA_{B2} em células neuronais, corroborando estudos de hibridação *in situ* prévios nos quais a marcação de células gliais se encontrava principalmente restrita à substância branca da medula espinal no caso do GABA_{B(1b)}⁶¹.

Curiosamente, o Rt, que é constituído por corpos celulares de neurónios de projecção GABAérgicos, não apresentou qualquer expressão de ARNm para nenhuma das subunidades estudadas. Isto está de acordo com estudos prévios onde não foi detectado nenhum sinal de hibridação *in situ* para o GABA_{B(1b)}^{55,61} ou onde se verificaram níveis baixos de imunoreactividade para o

GABA_{B(1b)} neste núcleo talâmico⁶². Igualmente foi observada baixa expressão de ARNm para o GABA_{B2} neste núcleo talâmico⁶⁰. No entanto, em relação à expressão de ARNm para o GABA_{B(1a)}, um estudo de hibridação *in situ* demonstrou uma marcação de ARNm moderada⁵⁵, e uma expressão de proteína significativa⁶² no Rt, contrariamente ao que foi por nós observado. Apesar disto, outros autores descreveram uma baixa densidade para o receptor GABA_B ou para a subunidade GABA_{B1} em estudos de ligação^{55,57}, assim como também baixos níveis de imunoreactividade para o GABA_{B1}⁵⁸ neste núcleo, o que demonstra indirectamente haver pouca expressão de qualquer uma das isoformas da subunidade 1. Diferenças observadas entre os vários estudos podem resultar da utilização de metodologias diferentes.

Expressão do ARNm para as subunidades GABA_{B(1a)}, GABA_{B(1b)} e GABA_{B2} em ratos monoartríticos

Em ratos monoartríticos, não foi observada qualquer alteração da expressão do ARNm para

o GABA_{B(1a)} em nenhum dos núcleos estudados quando comparados com os animais controlo, sugerindo assim que receptores funcionais compostos por esta isoforma não se encontram expressos nas regiões do tálamo estudadas e/ou que a sua expressão não se encontra regulada em resposta a um influxo nócico inflamatório crónico no tálamo.

Em contraste, as expressões de ARNm para o GABA_{B(1b)} e GABA_{B2} sofreram alterações nos núcleos talâmicos VB e Po. As alterações observadas apresentaram um padrão temporal específico durante a evolução da doença. No VB, o transcripto do GABA_{B(1b)} diminuiu significativamente aos 4, 7 e 14 dias de MA, no lado contralateral à pata inflamada, enquanto que o transcripto do GABA_{B2} diminuiu significativamente neste mesmo lado aos 2 e 4 dias de inflamação. Estas alterações são consistentes com o facto desta região estar implicada nos mecanismos de transmissão do componente sensitivo-discriminativo da dor, recebendo influxo ascendente através da via espinho-talâmica lateral^{2,5,6,8,10}. Noutros estudos do nosso grupo foram encontradas alterações, com um perfil temporal específico, na expressão do ARNm de vários outros receptores metabotrópicos nesta área talâmica de animais monoartríticos⁴³. Estudos de electrofisiologia em ratos artríticos sugerem que os neurónios do VB apresentam actividade aumentada após estimulação mecânica nócica ou não-nócica na articulação ou na vizinhança da área inflamada^{8,63}. Fica por elucidar em que medida a regulação negativa da expressão de ARNm para o GABA_{B(1b)} e GABA_{B2} contribui para as alterações electrofisiológicas observadas. De facto, na ausência de informação em relação ao receptor funcional no tálamo, em condições de dor inflamatória crónica, não é possível elaborar uma hipótese consistente acerca dos possíveis efeitos destas alterações na excitabilidade dos neurónios talâmicos de transmissão.

Alguns estudos sugerem que a subunidade 2 do receptor GABA_B é responsável pela activação da translocação da subunidade 1 para a superfície da membrana plasmática⁶⁴. Desta maneira, poder-se-á hipotetizar que a diminuição de GABA_{B2} nas primeiras fases da doença poderá levar à retenção da subunidade GABA_{B(1b)} no retículo endoplasmático e portanto regular negativamente a expressão de ARNm para esta subunidade a tempos mais tardios da evolução da doença, justificando-se, desta forma, o diferente perfil temporal de alterações encontradas para as duas subunidades. Estes resultados poderão também evidenciar um papel mais activo para a subunidade GABA_{B2} nas fases iniciais da resposta à doença, enquanto que a subunidade GABA_{B(1b)} terá um papel mais tardio.

No Po, foi observado um aumento significativo bilateral, na expressão de ARNm para o GABA_{B(1b)}, mas só aos 2 dias de MA. Pelo con-

trário, a este mesmo tempo da doença, foi observada uma diminuição bilateral para o GABA_{B2}, mas apenas estatisticamente significativa no lado ipsilateral. Em estudos anteriores, foram encontradas alterações significativas da actividade neuronal nesta região aos 2 dias de MA⁴², confirmando a participação deste núcleo nos mecanismos de processamento da informação dolorosa^{2,5}. Para além disso, foram também descritas alterações na expressão do ARNm para vários subtipos de receptores, nomeadamente dos mGluRs, no Po de ratos monoartríticos⁴³. Estes resultados sugerem que no Po as duas subunidades do receptor GABA_B desempenham um papel importante durante a fase inicial da MA, mas através de mecanismos reguladores diferentes. McCarron e Enna⁶⁵ já tinham sugerido anteriormente que a regulação da produção das duas subunidades parecia ser independente, pelo menos parcialmente. Estes autores descreveram que, no corno dorsal da medula espinhal do rato após 24 horas de inflamação da pata anterior, o aumento do ARNm para o GABA_{B2} era significativamente maior do que o aumento de ARNm para GABA_{B1}⁶⁵. Para além disso, uma discrepância ainda maior na expressão das duas subunidades foi observada em gânglios espinhais, onde GABA_{B1}, mas não GABA_{B2}, aumentou após injeção de formol na pata anterior⁶⁵. Noutras regiões cerebrais foi também observado que, apesar de haver uma quase ausência de GABA_{B2}, GABA_{B1} e/ou o receptor nativo, encontrava-se presente^{55,60,66,67}. Estes dados sugerem que as subunidades do receptor GABA_B poderão servir outras funções e que outras proteínas e/ou subunidades do receptor GABA_B, ainda não identificadas, poderão formar heterodímeros funcionais⁶⁵. Sabe-se que a associação do GABA_{B1} com a subunidade $\gamma 2S$ do receptor GABA_A promove a expressão na superfície celular do GABA_{B1}, na ausência de GABA_{B2}⁶⁸. Assim, poder-se-á hipotetizar que no Po, aos 2 dias de MA, GABA_{B1} está a deslocar-se para a superfície celular, com a ajuda da subunidade GABA_A $\gamma 2S$, modulando as propriedades do receptor GABA_A, como já foi sugerido⁶⁸. Foi também proposto que outras proteínas possam interagir com o GABA_B ou com a subunidade GABA_{B1}, como é o caso do mGluR1 ou mGluR4⁶⁹⁻⁷². Curiosamente, foram detectadas alterações na expressão do ARNm de ambos mGluR em núcleos talâmicos, incluindo o VB e o Po, no mesmo modelo de MA⁴³.

No NLG, núcleo implicado no processamento de estímulos visuais, não foi observada qualquer alteração na expressão de GABA_{B2} em qualquer dos tempos de evolução da doença. Deste modo, as alterações observadas no VB e no Po parecem ser especificamente relacionadas com o processamento doloroso e reflectem, muito provavelmente, mecanismos adaptativos despoletados pelo influxo nócico crónico.

Os nossos dados sugerem que a dor inflamatória crónica periférica não afecta significativamente a expressão das subunidades do GABA_B nos neurónios do CM/CL, dado que não foram encontradas alterações significativas da expressão de qualquer subunidade. Estes neurónios intralaminares do CM/CL recebem numerosas projecções de núcleos do tronco cerebral implicados na dor, principalmente de origem visceral^{5,73}, e projectam para regiões do córtex cerebral associadas com os aspectos afectivo-motivacionais da dor, tais como o córtex insular agranular rostral^{5,74}. Estes núcleos talâmicos parecem ser uma parte de um sistema integrador que modula pequenas alterações no comportamento ou atenção, em resposta a um influxo somatossensitivo ou visceral⁷³.

No Rt não se verificou qualquer expressão do ARNm para nenhuma das subunidades do GABA_B estudadas durante a inflamação, tal como foi observado em animais controlo.

As alterações descritas no presente estudo durante uma dor inflamatória crónica são parte das alterações plásticas que ocorrem na nocicepção a nível talâmico, e que parecem ser induzidas e mantidas pelo afluxo nociceptivo proveniente da periferia. Os presentes dados sugerem que a expressão de ARNm para o GABA_{B(1b)} e GABA_{B2} é regulada no VB e no Po como resposta ao influxo nócico periférico. No entanto, as alterações nos níveis de expressão de ARNm nem sempre se traduzem em alterações na proteína ou receptores funcionais, por isso mais estudos são necessários de forma a compreender melhor o papel do receptores metabotrópicos GABA_B nas alterações funcionais responsáveis pelo processamento talâmico de uma dor inflamatória crónica.

Agradecimentos

Financiado pelo Projecto n.º POCTI/1999/NSE/32375, Fundação para a Ciência e Tecnologia, participado pelo Fundo Comunitário Europeu.

Bibliografia

1. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann Rev Neurosci* 1984;7:309-38.
2. Guilbaud G, Bernard JF, Besson JM. Brain areas involved in nociception and pain. Em: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of pain*. 3.ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 113-28.
3. Stamford JA. Descending control of pain. *Br J Anaesthes* 1995;75:217-27.
4. Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 1997;14:2-31.
5. Price JL. *Thalamus*. Em: Paxinos G, editor. *The rat nervous systems*. 2.ª ed. Sydney: Academic Press; 1995. p. 629-48.
6. Besson JM, Guilbaud G, Peschanski M. *Thalamus and Pain*. Amsterdam: Elsevier Science; 1987.
7. Willis WD, Westlund KN, Carlton SM. *Pain*. Em: Paxinos G, ed. *The rat nervous system*. 2.ª ed. Sydney: Academic Press; 1995. p. 725-50.
8. Guilbaud G, Kayser V. The ventrobasal complex of the rat thalamus: its involvement in the sensory-discriminative aspects of nociception, including models of clinical pain. Em: Besson JM, Guilbaud G, Peschanski M, eds. *Thalamus and Pain*. Amsterdam: Elsevier Science; 1987. p. 185-207.
9. Peschanski M, Guilbaud G, Gautron M, Besson JM. Encoding of noxious heat messages in neurons of the ventrobasal thalamic complex of the rat. *Brain Res* 1980;197:401-13.

10. Peschanski M, Guilbaud G, Lee CL, Mantyh PW. Involvement of the rat ventrobasal thalamic complex in the sensory-discriminative aspects of pain: electrophysiological and anatomical data. Em: Macchi G, Rustioni A, Spreafico R, eds. *Somatosensory Integration in the Thalamus*. Amsterdam: Elsevier; 1983. p. 147-63.
11. McCormick D, Bal T. Sensory gating mechanisms of the thalamus. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:550-6.
12. Guillery RW, Feig SL, Lozsádi DA. Paying attention to the thalamic reticular nucleus. *Trends Neurosci* 1998;21:28-32.
13. Steriade M. Neuromodulatory systems of thalamus and neocortex. *Seminars in the Neurosci* 1995;7:361-70.
14. Houser CR, Vaughn JE, Barber RP, Roberts E. GABA neurons are the major cell type of the Nucleus Reticularis Thalami. *Brain Res* 1980;200:341-54.
15. McCormick D. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol* 1992;39:337-88.
16. Schlicker K, Boller M, Schmidt M. GABA_C receptor mediated inhibition in acutely isolated neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res Bull* 2004;63:91-7.
17. Zhang D, Pan Z, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA. Cloning of a γ -aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11756-60.
18. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, et al. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 2002;54:247-64.
19. Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, et al. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature* 1998;396:674-9.
20. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, et al. GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998;396:683-7.
21. Kuner R, Köhr G, Grünewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science* 1999;283:74-7.
22. Galvez T, Parmentier ML, Joly C, et al. Mutagenesis and modeling of the GABA_B receptor extracellular domain support a Venus Flytrap mechanism for ligand binding. *J Biol Chem* 1999;274:13362-9.
23. Galvez T, Prezeau L, Milioti G, et al. Mapping the agonist-binding site of GABAB type 1 subunit sheds light on the activation process of GABAB receptors. *J Biol Chem* 2000;275:41166-74.
24. Malitschek B, Schweizer C, Keir M, et al. The N-terminal domain of gamma-aminobutyric acid(B) receptors is sufficient to specify agonist and antagonist binding. *Mol Pharmacol* 1999;56:448-54.
25. Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, et al. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci* 2001;21:1203-10.
26. Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, et al. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 2001;20:2152-9.
27. Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 2000;27:97-106.
28. Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, et al. C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* 2001;21:1189-202.
29. Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, et al. GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J Neurosci* 2001;21:8043-52.
30. Isomoto S, Kaibara M, Sakurai-Yamashita Y, et al. Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABAB receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:10-5.
31. Kaupmann K, Huguel K, Heid J, et al. Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997;386:239-46.
32. Pfaff T, Malitschek B, Kaupmann K, et al. Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA(B)R1 receptor. *Eur J Neurosci* 1999;11:2874-82.
33. Schwarz DA, Barry G, Eliasof SD, Petroski RE, Conlon PJ, Maki RA. Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABAB(1e), a GABAB(1) splice variant encoding a truncated receptor. *J Biol Chem* 2000;275:32174-81.
34. Wei K, Eubanks JH, Francis J, Jia Z, Snead OC III. Cloning and tissue distribution of a novel isoform of the rat GABA(B)R1 receptor subunit. *Neuroreport* 2001;12:833-7.
35. Wei K, Jia Z, Wang YT, Yang J, Liu CC, Snead OC III. Cloning and characterization of a novel variant of rat GABA(B)R1 with a truncated C-terminus. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;89:103-10.
36. Dirig DM, Yaksh TL. Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J Pharmacol and Exp Therap* 1995;275:219-27.

37. 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.
38. Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci* 1992;15:96-103.
39. Cervero F, Laird JMA. From acute to chronic pain: peripheral and central mechanisms. Em: Bountra C, Munglani R, Schmidt WK, eds. *Pain: current understanding, emerging therapies, and novel approaches to drug discovery*. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 29-44.
40. 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.
41. Buttler SH, Weil-Fugazza J. The foot-bend procedure as test of nociception for chronic studies in a model of monoarthritis in the rat. *Pharmac Commun* 1994;4:327-34.
42. [Neto FL, Schadrack J, Ableitner A, et al. Supraspinal metabolic activity changes in the rat during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience* 1999;94:607-21.
43. Neto FL, Schadrack J, Platzer S, Zieglgänsberger W, Tölle TR, Castro-Lopes JM. Expression of metabotropic glutamate receptors mRNA in the thalamus and brainstem of monoarthritic rats. *Mol Brain Res* 2000;81:140-54.
44. Potes CS, Neto FL, Castro-Lopes JM. Administration of baclofen, a GABA_B agonist, in the thalamic ventrobasal complex attenuates allodynia in monoarthritic rats subjected to the ankle-bend test. *J Neurosci Res* 2006;83:515-23.
45. Ferreira-Gomes J, Neto FL, Castro-Lopes JM. Differential expression of GABA_{B(1b)}} receptor mRNA in the thalamus of normal and monoarthritic animals. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1603-11.
46. Ferreira-Gomes J, Neto FL, Castro-Lopes JM. GABA_{B(2)}} receptor subunit mRNA decreases in the thalamus of monoarthritic animals. *Brain Res Bull* (2006) (no prelo)
47. 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.
48. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-10.
49. Wisden W, Morris BJ. In situ hybridization with synthetic oligonucleotide probes. Em: Wisden W, Morris BJ, eds. *In situ hybridization protocols for the brain*. London: Academic Press; 1994. p. 9-34.
50. Neto FL, Schadrack J, Berthele A, Zieglgänsberger W, Tölle TR, Castro-Lopes JM. Differential distribution of metabotropic glutamate receptor subtype mRNAs in the thalamus of the rat. *Brain Res* 2000;854:93-105.
51. Towers S, Princivalle A, Billinton A, et al. GABA_B receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 2000;12:3201-10.
52. Paxinos G, Watson W. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1998.
53. Spreafico R, Battaglia G, De Curtis M, De Biasi S. Morphological and functional aspects of nucleus reticularis thalami (RTN) of the rat. Em: Besson JM, Guilbaud G, Peschanski M, eds. *Thalamus and Pain*. Amsterdam: Elsevier Science; 1987. p. 111-26.
54. Calver AR, Medhurst AD, Robbins MJ, et al. The expression of GABA_{B1}} and GABA_{B2}} receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience* 2000;100:155-70.
55. Bischoff S, Leonhard S, Reymann N, et al. Spatial distribution of GABA_{B1}} receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J Comp Neurol* 1999;412:1-16.
56. Möhler H, Benke D, Fritschy JM. GABA_B-receptor isoforms, molecular architecture and distribution. *Life Sci* 2001;68:2297-300.
57. Chu DCM, Albin RL, Young AB, Penney JB. Distribution and Kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 1990;34:341-57.
58. Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley, RC, Jan LY, Basbaum AI. Immunohistochemical localization of GABA_B receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1999;405:299-321.
59. Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Möhler H. GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci* 1999;11:761-8.
60. Durkin MM, Gunwaldsen CA, Borowsky B, Jones KA, Branchek TA. An in situ hybridization study of the distribution of the GABA_{B2}} protein mRNA in the rat CNS. *Mol Brain Res* 1999;71:185-200.
61. Liang F, Hatanaka Y, Saito H, Yamamori T, Hashikawa T. Differential expression of γ -aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 2000;416:475-95.
62. Princivalle AP, Pangalos MN, Bowery NG, Spreafico R. Distribution of GABA_{B(1a)}}, GABA_{B(1b)}} and GABA_{B2}} receptor protein in cerebral cortex and thalamus of adult rats. *Neuroreport* 2001;12:591-5.
63. 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.
64. Couve A, Calver AR, Fairfax B, Moss SJ, Pangalos MN. Unravelling the unusual signalling properties of the GABA_B receptor. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1527-36.
65. McCarson KE, Enna SJ. Nociceptive regulation of GABA(B) receptor gene expression in rat spinal cord. *Neuropharmacology* 1999;38:1767-73.
66. Charles KJ, Evans ML, Robbins MJ, Calver AR, Leslie RA, Pangalos MN. Comparative immunohistochemical localisation of GABAB1a, GABAB1b and GABAB2 subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. *Neuroscience* 2001;106:447-67.
67. Clark JA, Mezey E, Lam AS, Bonner TI. Distribution of the GABA(B) receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res* 2000;860:41-52.
68. Balasubramanian S, Teissere JA, Raju DV, Hall RA. Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. *J Biol Chem* 2004;279:18840-50.
69. Kubo Y, Tateyama M. Towards a view of functioning dimeric metabotropic receptors. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:289-95.
70. Sullivan R, Chateaufneuf A, Coulombe N, et al. Coexpression of full-length gamma-aminobutyric acid(B) (GABA(B)) receptors with truncated receptors and metabotropic glutamate receptor 4 supports the GABA(B) heterodimer as the functional receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:460-7.
71. Tabata T, Araishi K, Hashimoto K, et al. Ca²⁺ activity at GABAB receptors constitutively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16952-7.
72. White JH, McIlhinney RA, Wise A, et al. The GABAB receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13967-72.
73. Krout KE, Belzer RE, Lowey AD. Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 2002;448:53-101.
74. Jasmin L, Granato A, Ohara PT. Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system. A tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 2004;468:425-40.

Biestabilidade da Actividade Espontânea nos Neurónios da Medula Espinhal Dorsal do Rato

Clara Monteiro^{2,3}, Deolinda Lima^{2,3} e Vasco Galhardo^{1,3}

Resumo

Os neurónios somatossensitivos do corno dorsal da medula espinhal podem apresentar *in vitro* um estado de actividade biestável em que, na ausência de estimulação, uma taxa fixa de disparo é mantida por períodos de vários minutos. Esses períodos de disparo espontâneo aumentado poderão ter um importante papel na gênese e manutenção de estados hiperalgésicos, nos quais episódios de dor espontânea prolongada são habitualmente reportados. Neste trabalho mostramos pela primeira vez que também *in vivo* uma pequena percentagem de neurónios das lâminas profundas do corno dorsal da medula espinhal (4% na população registada) é capaz de mudar rapidamente entre dois níveis de disparo espontâneo: alta e baixa frequência. Pelo menos uma das transições entre os dois estados era induzida por estimulação do campo receptivo, tornando este caso numa situação única na qual taxas estáveis de disparo ficam *on* ou *off* com os estímulos somatossensitivos.

Palavras-chave: Estricnina. Formol. Dor. Oscilações. Registos extracelulares com multieléctrodos.

Abstract

Deep dorsal horn neurons were previously shown to present *in vitro* a bistable state of activity in which a fixed firing rate is maintained, in the absence of stimulation, over prolonged periods of time. These periods of enhanced spinal spontaneous discharge may play a role in the appearance and maintenance of hyperalgesic states, where a recurrent sustained spontaneous pain is usually reported. In this paper we show *in vivo* that a small percentage of deep spinal neurons (4% of the recorded population) are capable of rapidly shifting between low-frequency and high-frequency levels of spontaneous activity. At least one of the transitions between the two states was induced by stimulation of the receptive field, making this an interesting and unique case in which stable firing rates are switched-on or -off by somatosensory stimuli.

Key words: Strychnine. Formalin. Pain. Oscillations. Multielectrode extracellular recordings.

Introdução

A sensibilização central é uma forma de hiperactividade espinhal persistente que está associada a um aumento da percepção da dor (Baranauskas G, Nistri A, 1998; Ji RR, et al., 2003), aparecendo após uma lesão no nervo, inflamação induzida por lesão, manipulação farmacológica ou esti-

mulação repetitiva de baixa frequência de fibras C não-mielinizadas (Wall PD, Woolf CJ, 1986; Urbán L, et al., 1994; Herrero JF, et al., 2000). Diversos mecanismos de plasticidade sináptica foram já implicados no desenvolvimento da sensibilização central (Woolf CJ, Salter MW, 2000), e correlacionados tanto com a expressão de LTP (*long-term potentiation*) espinhal como de *windup* dos potenciais de acção espinhais (Mendell LM, 1966; Liu X-G, Sandkühler J, 1995). Estudos *in vitro* recentes demonstraram uma correlação clara entre o *windup* de potenciais de acção e o despoletar de potenciais-*plateau* espinhais que despolarizam o potencial de membrana do neurónio a níveis em que descargas auto-sustentadas podem ser iniciadas na ausência de estimulação (Morisset V, Nagy F, 2000). Estas descargas auto-sustentadas são mantidas inde-

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

²Laboratório de Biologia Celular e Molecular
Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

³IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular
Universidade do Porto

pendentemente da excitação sináptica contínua e permitem à célula alternar entre dois modos estáveis de disparo espontâneo. Este comportamento biestável dos níveis de actividade neuronal espontânea foi observado em diferentes populações corticais, talâmicas e espinhais (Hounsgaard J, et al., 1986; Steriade M, 1999; Egorov AV, et al., 2002; Brunel N, 2003), onde esta actividade persistente aumentada terá um papel crucial na sinalização a longo prazo de eventos de curta duração ao permitir que os neurónios alternem entre dois regimes funcionais de acordo com a carga sináptico-instantânea (Wang X-J, 2001). Esta manutenção da actividade persistente poderá depender de correntes membranares intrínsecas (Russo RE, Hounsgaard J, 1996; Morisset V, Nagy F, 1999), ser baseada na reverberação sináptica de circuitos locais recorrentes (Shu Y, et al., 2003), ou numa combinação dos dois mecanismos.

A actividade neuronal durante estados hiperalgésicos é caracterizada por episódios espontâneos de potenciais de acção em sucessão (disparo em *burst*), e pelo seu prolongamento após o período de estimulação – *action potential afterdischarges* (Guilbaud G, et al., 1992; Palecek J, et al., 1992; Sotgiu ML, et al., 1995; Morisset V, Nagy F, 2000) – pelo que as respostas espinhais auto-regenerativas terão um papel na génese e manutenção da dor crónica. No entanto, respostas auto-regenerativas biestáveis relacionadas com estímulos nociceptivos foram apenas descritas em preparações *in vitro*. Em animais intactos, a descrição de actividade espinhal pós-estimulação a níveis de disparo constantes e sem decaimento é escassa e indirecta (Cadden SW, 1993; Laird JM, Bennett GJ, 1993; Jiang MC, et al., 1995). Neste trabalho descrevemos a ocorrência, em animais intactos, de um pequeno número de células espinhais com actividade biestável modulada por estimulação somatossensitiva, e que o número dessas células aumenta em estados hiperalgésicos.

Materiais e métodos

Foram utilizados neste estudo 33 ratos adultos (300-450 g) da estirpe Sprague-Dawley (Charles-River, Barcelona). Todas as experiências foram realizadas de acordo com a Directiva da União Europeia (86/609/EEC) e as recomendações éticas da IASP para investigação com animais na área da dor (Zimmermann M, 1983).

Os animais foram anestesiados com uretano (1,5 g/kg, i.p.), e o grau de anestesia foi verificado regularmente testando os reflexos palpebrais e a retracção da pata traseira e da cauda em resposta a estímulos. A temperatura corporal foi mantida através do uso de um cobertor homeotérmico com sistema de *feedback*.

Os animais foram colocados no aparelho de estereotaxia com fixadores vertebrais e foi efectuada uma laminectomia para expor o alargamen-

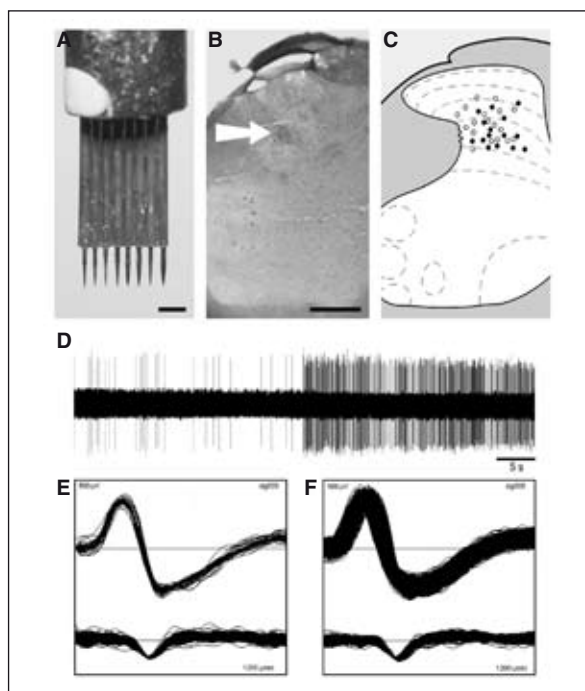


Figura 1. Detalhes técnicos do registo com multieléctrodos. **A:** fotografia da ponta de uma matriz com oito eléctrodos, usada na maioria das experiências. Escala: 500 micrometros. **B:** fotografia de uma secção de medula espinhal mostrando a lesão eléctrica (seta) usada para localizar os locais de registo. Escala: 500 micrometros. **C:** diagrama dos locais de registo nas 33 experiências. Os círculos a negro representam os locais onde os neurónios biestáveis foram registados. **D:** dados não filtrados de 60 segundos de registo mostrando a elevada razão sinal/ruído obtida com os eléctrodos usados. O registo apresentado corresponde ao período em que o neurónio está on, também mostrado na figura 2. **E-F:** separação computacional das waveform dos registos originais de multiunidades (painel D) na actividade de um único neurónio (waveform de cima) e na actividade de múltiplos neurónios não-isoláveis (waveform de baixo – não considerada para a contagem dos neurónios). O painel E mostra as waveforms obtidas nos 30 segundos antes do período ligado, enquanto que o painel F mostra as waveforms obtidas de 30 segundos dentro do período ligado, demonstrando que pertencem ao mesmo neurónio.

to lombar da medula espinhal. A dura-máter dos segmentos expostos foi removida e a superfície da medula foi coberta com soro. A actividade neuronal foi registada extracelularmente nos segmentos espinhais L2-L4 usando matrizes de eléctrodos com quatro ou oito filamentos independentes de tungsténio (3-6 MOhms), espaçados por 240 micrometros (FHC Inc., Bowdoinham, EUA – figura 1 A). Os sinais neuronais foram amplificados e digitalizados em tempo real a 40 kHz por canal (MAP16 System, Plexon Inc., Dallas, EUA) enquanto que a separação e identificação dos neurónios individuais foi feita *offline*, usando métodos computacionais baseados nos perfis dos potenciais de acção registados (*Offline Sorter*, Plexon Inc., Dallas, EUA). Foi feita apenas uma sessão de registo em cada animal.

A actividade espontânea foi registada durante 30 minutos antes de iniciar os períodos de estimulação. Os campos receptivos cutâneos da superfície glabra da pata traseira foram mapeados usando os seguintes estímulos: *tap* (toque na pata com um pincel suave ligado a um servo-motor robótico) e *pinch* (com pinça cirúrgica). Cada período de estimulação consistiu em 60 segundos de *tap* (estimulação mecânica não-nóxica; 1 Hz), 120 segundos de intervalo e 30 segundos de *pinch* (estimulação mecânica nóxica); estas estimulações foram repetidas cada 10 minutos. As respostas neuronais aos estímulos mecânicos foram usadas para classificar as células como de largo espectro dinâmico (*Wide Dynamic Range* – WDR, respondem a todos os estímulos), baixo limiar de excitação (*Low Threshold* – LT, resposta mais expressiva ao *tap* com pouca ou nenhuma resposta ao *pinch*), nociceptivas específicas (*Nociceptive Specific* – NS, neurónios com resposta mais expressiva ao *pinch* e com pouca ou nenhuma resposta ao *tap*) ou sem resposta (*Non Responsive* – NR). Em 15 animais, após cinco ciclos de estimulação, foi efectuada uma injeção subcutânea de formol diluído (50 microlitros a 5%) na parte dorsal da pata traseira para induzir um estado de dor persistente, e os neurónios foram registados por um período nunca inferior a três horas. Nos 18 animais restantes, após cinco ciclos de estimulação, foram administradas 100 nmol de estriçnina (dois microlitros) (Sigma) na superfície da medula espinhal no local da inserção do eléctrodo e as respostas à estimulação foram testadas cada 15 minutos ao longo das três horas seguintes. A solução de estriçnina foi preparada diariamente antes de cada experiência e dissolvida em líquido cefalorraquidiano artificial que continha (em mM): NaCl 115,0; KCl 5,6; CaCl₂ 2,0; MgCl₂ 1,0; glucose 11,0; NaH₂PO₄ 1,0; NaHCO₃ 25,0.

No final de cada experiência, os animais anestesiados foram eutanasiados com uma *overdose* de uretano, e o local de registo foi marcado através da passagem de corrente (1,2 mA durante 30 segundos) através de um dos filamentos de tungsténio do eléctrodo (Fig. 1 B). A porção relevante da medula espinhal foi removida e colocada em formol a 10%. Após fixação, os segmentos de medula foram armazenados em sacarose a 30%, cortados num micrótomo de congelação em secções de 100 micrometros e corados com tionina. Os locais de lesão/registo foram delimitados por comparação com diagramas padrão (Paxinos G, Watson C, 1998) (Fig. 1 C). As análises dos potenciais de acção, tais como histogramas periéstímulo, intervalos entre disparos e densidades espectrais, foram calculadas usando o programa *Neuroexplorer* (Plexon Inc., Dallas, EUA). Períodos de actividade rítmica espontânea foram detectados usando as análises de intervalos entre disparos e densidades espectrais, de acordo com estu-

dos prévios da medula espinhal (Sandkühler J, Eblen-Zajjur AA, 1994). Os resultados foram expressos com média \pm SEM.

Resultados

Os presentes resultados sobre o comportamento de populações neuronais do corno dorsal da medula espinhal do rato são baseados num total de 507 neurónios registados em 33 animais (um local de registo por animal) usando dois modelos de indução de hiperalgisia (163 neurónios em 15 sessões de registo com formol e 344 neurónios em 18 sessões de registo com estriçnina). Os neurónios foram registados a uma profundidade de 300-700 micrometros abaixo da dura-máter, pertencendo portanto às lâminas III-V (Fig. 1 C). O maior número de neurónios registados nas experiências com estriçnina (19,1 \pm 1,3 *versus* 10,9 \pm 1,1 neurónios nos registos com formol) é devido ao facto de, nas 18 sessões com estriçnina, se terem usado matrizes com oito eléctrodos de tungsténio, enquanto que em seis dos registos com formol foram usadas matrizes apenas com quatro eléctrodos.

Neste artigo descrevemos a existência de um pequeno número de neurónios espinhais que apresentam um comportamento biestável nos dois tipos de procedimento experimental. Como não se verificaram diferenças óbvias entre os registos de ambos os modelos de hiperalgisia (experiências com formol e com estriçnina), eles serão apresentados em conjunto na maioria das situações.

Vinte e um neurónios (5 em 3 registos com formol; 16 em 12 registos com estriçnina; no total 4,1% da população total de neurónios registados) apresentaram um padrão de actividade biestável caracterizado por mudanças abruptas na taxa de disparo espontâneo (exemplos na figura 2). Estes neurónios mudaram de uma taxa de disparo baixa e estável (0,27 \pm 0,07 *spikes* por segundo) para uma também estável alta taxa de disparo (9,92 \pm 1,23 *spikes* por segundo). Esta mudança imediata ocorreu quer espontaneamente, quer após uma estimulação táctil nóxica ou inócua. Ao longo deste artigo iremos chamar *on* à mudança de baixa para alta taxa de disparo e *off* à mudança oposta. Em 16 dos 21 neurónios, estas mudanças ocorreram mais do que uma vez ao longo de todo o registo, como se as células fossem capazes de operar em dois regimes fisiológicos distintos. Tanto o formol como a estriçnina são conhecidos por induzirem na medula espinhal uma actividade espontânea aumentada por períodos prolongados com aumentos ou diminuições lentas das taxas de disparo (Dickenson A, Sullivan AF, 1987; McGaraughty S, Henry JL, 1998). Deste modo, apenas considerámos como sinais de biestabilidade as alterações ocorridas entre taxas de disparo de grande regularidade (i.e. taxas de

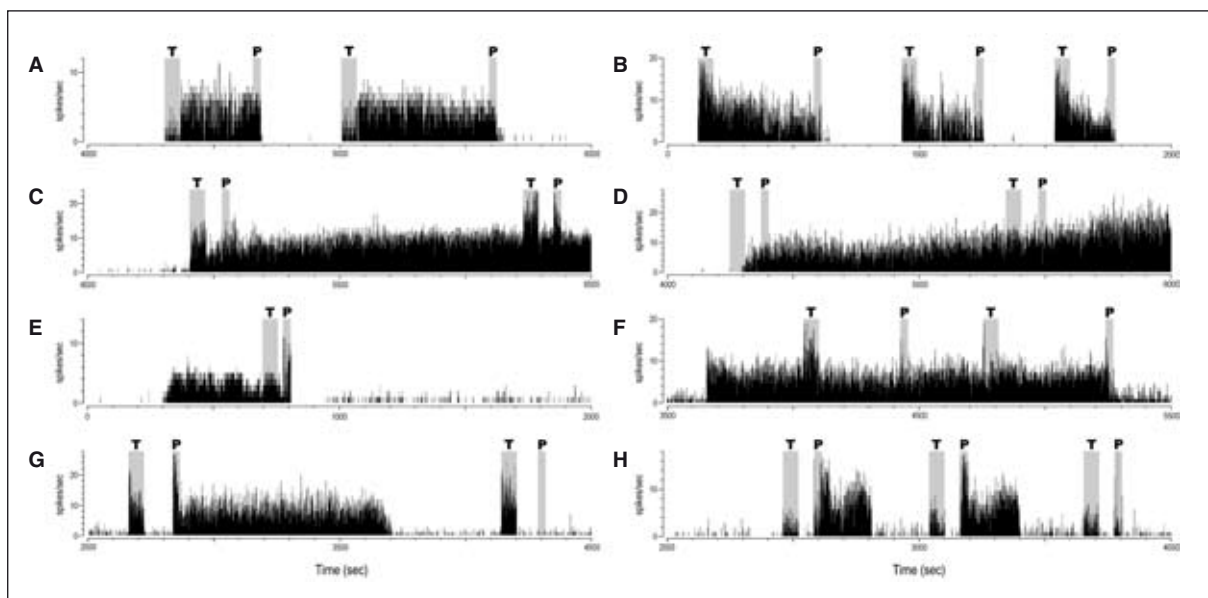


Figura 2. Padrões das alterações induzidas pelos estímulos nas taxas de disparo espontâneo em neurónios biestáveis. As áreas sombreadas marcam os períodos de estimulação cutânea: T – estimulação não-nódica (tap); P – estimulação nódica (pinch). A figura apresenta exemplos de quatro dos cinco padrões de biestabilidade observados, obtidos em diferentes sessões de registo (um exemplo do quinto padrão observado em três neurónios é apresentado na figura 3 A). Cada painel mostra a actividade de uma célula durante 2.000 segundos do tempo total de registo. **A-B:** neurónios biestáveis que ficaram on com a estimulação inócua e off com o estímulo nódico pinch (cinco neurónios). **C-D:** neurónios biestáveis que ficaram on pela estimulação inócua e não ficaram off até ao fim da experiência (cinco neurónios). **E-F:** neurónios biestáveis que ficaram on espontaneamente e off pelo estímulo nódico (quatro neurónios). **G-H:** neurónios biestáveis que ficaram on com a estimulação nódica e off espontaneamente (quatro neurónios). Os últimos três painéis mostram claramente que em alguns casos a capacidade neuronal para a biestabilidade é transitória.

disparo médias com desvios inferiores a 10% por minuto). Estas alterações biestáveis ocorreram ou abruptamente na ausência de estimulação (mudando de um disparo espontâneo estável para outro num espaço de poucos segundos – figuras 2 E-H), ou imediatamente após a cessação das estimulações (Figs. 2 A-H). Adicionalmente, uma das transições (*on* ou *off*) tinha de ser induzida por estimulação somato-sensitiva, e nenhuma célula foi considerada biestável se ambas as transições ocorriam espontaneamente.

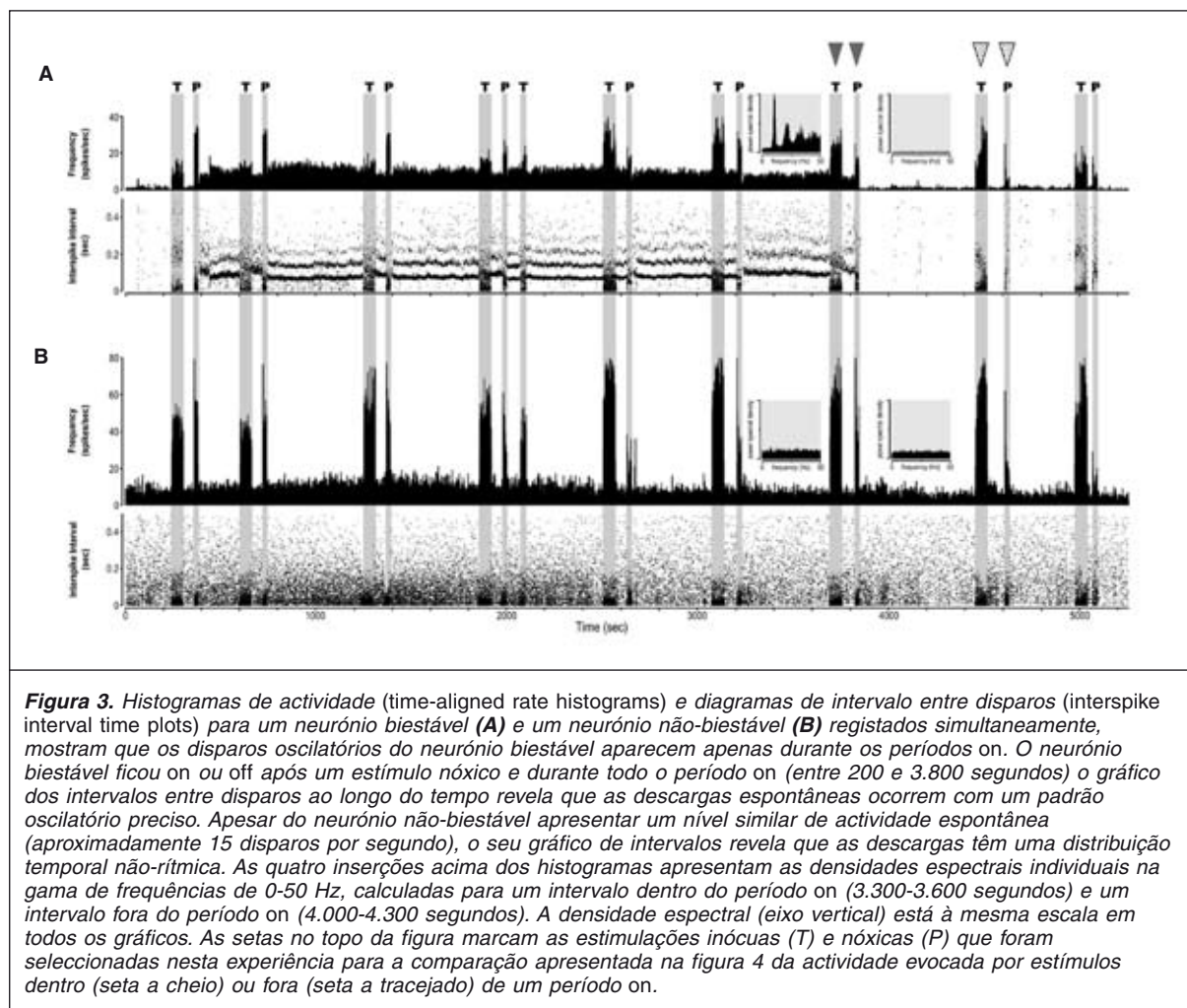
Nos 21 neurónios considerados biestáveis, o período *on* foi iniciado por estimulação cutânea em 17 neurónios e espontaneamente em quatro neurónios, e o período *off* foi induzido por estimulação em 12 neurónios e espontaneamente em quatro neurónios (nas figuras 2 e 3 apresentam-se exemplos de padrões de resposta observados). Cinco das células não ficaram *off* durante o período de registo efectuado (duração do período de disparo variou entre 20 e 110 minutos – figuras 2 C-D).

As células com comportamento *on-off* eram maioritariamente WDR (17 neurónios), sendo apenas um neurónio nociceptivo específico, enquanto que três neurónios não respondiam a estimulação da pata traseira. Os padrões biestáveis de actividade estavam já presentes em 8 dos 21 neurónios antes da indução da hiperalgesia, enquanto que nos restantes 12 neurónios

esses padrões apareceram num período entre 5-35 minutos após a administração de formol ou estricnina.

O comportamento *on-off* aqui descrito era muito distinto das descargas pós-estímulo vulgarmente observadas após uma estimulação de alto limiar (*afterdischarge*): consistia numa taxa de disparo estável e prolongada que começava e terminava abruptamente sem o decaimento lento que caracteriza as descargas pós-estímulo (Sotgiu ML, et al., 1995). Em cinco animais, mais do que um neurónio biestável foi registado simultaneamente (três neurónios numa sessão e dois neurónios em cada uma das sessões de quatro outros animais). Em todos os casos, os correlogramas cruzados dos disparos não revelaram nenhuma influência sináptica aparente entre estes neurónios vizinhos (resultados detalhados não apresentados).

No conjunto dos registos, um total de 76 neurónios mostrou uma taxa de disparo rítmica durante a actividade espontânea (14,9% do total, 23 neurónios nas experiências de formol e 53 nas de estricnina, sendo 67 neurónios não-biestáveis e 9 biestáveis), que era de $18,2 \pm 2,7$ spikes por segundo (numa gama de 5,8 a 41,2 spikes por segundo). No entanto, enquanto que nos 67 neurónios não-biestáveis a taxa de disparo rítmica estava presente durante todo o registo ou durante todo o período após a administração de formol ou estricnina, nos neurónios biestáveis foi



apenas observada durante alguns dos períodos em que o neurónio estava on (Fig. 3). A análise das densidades espectrais dos tempos de disparo mostrou que os nove neurónios biestáveis com disparo rítmico tinham um pico de frequências dominantes bastante estreito (15,8 \pm 3,9 Hz), revelando o início de uma actividade tipo marca-passo durante os períodos em que o neurónio estava on (inserções na figura 3).

Um tópico importante foi determinar se esta actividade rítmica associada com os períodos biestáveis afectou o processamento espinal, aumentando a actividade evocada pelos estímulos. Apesar do nosso protocolo de registo não nos permitir medir a fiabilidade da transmissão sináptica de estímulos periféricos, o uso de registos com multieléctrodos permitiu-nos comparar as respostas de vários neurónios registados simultaneamente. Por esse motivo, comparámos as taxas de disparo evocadas pelo estímulo de neurónios WDR biestáveis e não-biestáveis registados simultaneamente na mesma experiência (Fig. 4). Como alguns dos neurónios tinham longos períodos on (com várias estimulações executadas durante esse período),

enquanto que outros tinham breves períodos on, apenas uma comparação foi efectuada por neurónio. Optámos por usar as estimulações que imediatamente precediam ou sucediam a transição de on para off e não as estimulações que ladeavam os períodos on, dado que mais neurónios preenchiam este critério. Apesar das taxas de disparo evocadas pelo estímulo de neurónios biestáveis serem aparentemente maiores durante os períodos on, este aumento não era estatisticamente significativo ($P > 0,05$ em todos os casos, teste t) e a figura 4 mostra que este aumento foi observado de forma similar tanto em neurónios biestáveis como não-biestáveis. A análise dos intervalos entre disparos ao longo do tempo nos 21 neurónios biestáveis não revelou nenhuma evidência de aceleração de disparos durante uma estimulação sustentada. Esta marca de actividade tipo potencial-plateau foi no entanto observada em quatro neurónios que não apresentavam comportamento biestável.

Discussão

Neste artigo mostrámos que uma pequena percentagem de neurónios espinhais das lâmi-

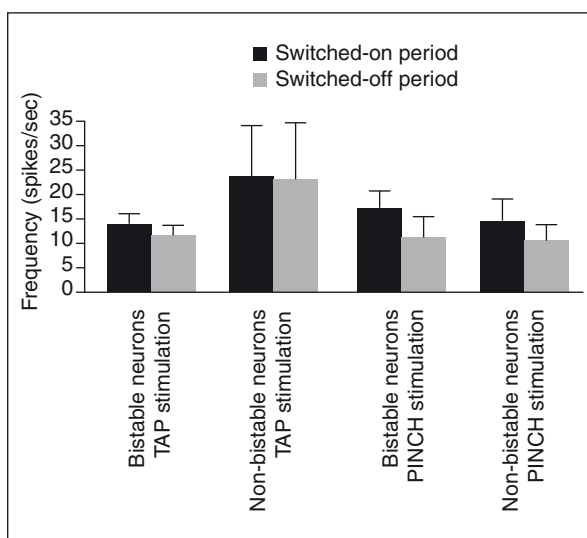


Figura 4. Taxas de disparo evocadas pela estimulação não são diferentes dentro (barras a cheio) ou fora (barras a tracejado) dos períodos on, tanto para neurónios biestáveis como para não-biestáveis. Para calcular as taxas de disparo evocadas pelos estímulos, seleccionámos a última estimulação do período on, enquanto que a primeira estimulação seguinte foi usada para a comparação do período off (ver exemplo na figura 3, setas). Como nem todos os neurónios biestáveis respondiam à estimulação cutânea dentro e fora dos seus períodos on, a selecção foi restringida a seis neurónios biestáveis que respondiam ao estímulo inócuo (grupo da primeira barra) e oito neurónios biestáveis que respondiam ao estímulo nóxico (grupo da terceira barra). Todos os neurónios não-biestáveis registados simultaneamente que também respondiam aos estímulos inócuos e/ou nóxicos foram usados como comparação (grupos da segunda e quarta barra, 14 e 20 neurónios, respectivamente). A actividade basal não foi subtraída das taxas de disparo apresentadas.

nas profundas é capaz de, *in vivo*, alternar entre níveis de actividade espontânea de alta e baixa frequência, e que os dois tipos de taxas de disparo estáveis podem ficar *on* ou *off* pela acção de estímulos somatossensitivos. Apesar de mudanças bruscas nas taxas de disparo espontâneo similares serem referidas na literatura (Cadden SW, 1993), elas nunca foram identificadas como uma característica fisiológica de uma fracção de neurónios espinhais. Acreditamos que isto é devido ao facto de estudos prévios serem baseados em registos de uma única célula. O uso de multieléctrodos permitiu-nos registar neurónios biestáveis na vizinhança de neurónios não-biestáveis (ver exemplo na figura 3), identificando deste modo este tipo de actividade como um padrão de disparo específico de cada célula, excluindo assim a possibilidade de que este efeito poderia resultar de um aumento geral do disparo espontâneo devido a causas experimentais não determinadas. Por outro lado, a multiplicidade de diferentes padrões de actividade evocados pela mesma sequência de estimulações (como ilustrado nas figuras 2 e 3) su-

gere que a expressão espinhal da biestabilidade não está ligada a um papel específico de processamento somatossensitivo.

Estudos recentes sugerem que esta actividade biestável poderá ser relacionada com a corrente iónica intrínseca identificada como potencial-*plateau* que foi descrita em detalhe para neurónios espinhais *in vitro* (Russo RE, Hounsgaard J, 1996). Potenciais-*plateau* espinhais levam a descargas auto-regenerativas que despoletam potenciais de acção rítmicos apenas terminados pela hiperpolarização do neurónio (Morisset V, Nagy F, 1996). Apesar da expressão dos potenciais-*plateau* ocorrer espontaneamente numa pequena percentagem de neurónios espinhais, a activação de receptores metabotrópicos de glutamato ou o bloqueio de receptores GABA_B aumenta a sua expressão para quase 50% dos neurónios espinhais das lâminas profundas (Morisset V, Nagy F, 1996; Derjean D, et al., 2003). Os modelos animais de hiperalgesia que usámos neste estudo (injecções de formol periférico e de estricnina intratecal) irão provavelmente induzir a expressão de potenciais-*plateau*, uma vez que a hiperalgesia espinhal induz aumento da libertação de glutamato, regulação positiva de receptores metabotrópicos de glutamato e redução dos níveis gabaérgicos (Ji RR, et al., 2003). Adicionalmente, a administração espinhal de estricnina facilita a expressão de potenciais-*plateau* num modelo *in vitro* da medula espinhal de tartaruga (Russo RE, et al., 1998). Uma demonstração conclusiva de uma ligação entre a hiperalgesia *in vivo* e os potenciais-*plateau* está ainda em falta, e apenas poderá ser realizada em registos intracelulares espinhais em animais intactos (Bentley DE, et al., 2003). Uma das características que identifica os potenciais-*plateau* é a expressão de descargas acelerativas durante a injeção intracelular de corrente despolarizante. Teoricamente, condições de excitação sináptica contínua gerada pela estimulação nociceptiva prolongada poderão também induzir descargas acelerativas, mas apenas recentemente foram demonstradas descargas acelerativas usando estimulação não eléctrica (Reali C, Russo RE, 2005). A nossa estimulação nóxica contínua, mas não o estímulo inócuo descontínuo, poderá ser adequada para induzir descargas acelerativas detectáveis em registos extracelulares. De facto, observámos um aumento da frequência de disparo desse tipo em quatro neurónios que não eram biestáveis (resultados não apresentados), mas nenhum dos neurónios biestáveis aqui descritos mostrou sinais de descargas acelerativas durante uma estimulação contínua. Este resultado deverá ser interpretado cautelosamente, uma vez que a possibilidade de demonstrar claramente a expressão ou não de potenciais-*plateau* usando registos extracelulares é muito limitada. Por outro lado, a actividade persistente poderá resultar de circuitos neuronais locais recorrentes, que constituem um mecanismo bem estudado para a geração de actividade neuronal biestável (Wang X-J, 2001).

Apesar do uso de registos extracelulares *in vivo* não nos ter permitido determinar se a biestabilidade observada era gerada por redes locais recorrentes, a nossa impossibilidade de encontrar evidências de conectividade funcional nas correlações cruzadas de sete pares de neurónios biestáveis registados simultaneamente não sugere que redes locais tenham um papel importante na biestabilidade das populações dorsais da medula espinhal.

Uma importante questão final era determinar se este padrão de actividade biestável afecta o processamento espinhal da informação somatossensitiva. Descrições de neurónios espinhais rítmicos ou *bursting* são comuns na literatura (Woolf CJ, King AE, 1989; Laird JM, Bennett GJ, 1993; Sandkühler J, Eblen-Zajjur AA, 1994; Jiang MC, et al., 1995; Asghar AU, et al., 2005), mas nesses estudos não foi efectuada uma comparação entre estados funcionais no que diz respeito à transferência de informação. Recentemente, foi demonstrado *in vitro* que a fiabilidade da transmissão sináptica entre neurónios espinhais é aumentada pela expressão de potenciais-plateau, enquanto que durante a actividade tipo *burst* a transferência de informação espinhal é diminuída (Derjean D, et al., 2003). Os nosso registos permitiram-nos comparar taxas de disparo evocadas por estímulo durante os períodos *on* e *off*, tanto para neurónios bistáveis como para não-biestáveis. Esta comparação não revelou qualquer diferença entre neurónios biestáveis e não-biestáveis (Fig. 4), apesar de sugerir que, para ambos os tipos de neurónios, as taxas de disparo perante o estímulo nódico são consistentemente mais elevadas durante os períodos *on*. Especulamos que este aumento global nas taxas de disparo espinhais resulta de uma aferência sináptica aumentada localmente pelas descargas espontâneas auto-regenerativas da pequena população de neurónios biestáveis. A validação desta sugestão irá depender de estudos detalhados sobre a conectividade sináptica dos neurónios espinhais biestáveis.

Agradecimentos

FCT (POCTI/NSE/38995/2001), EU (IST-2001-34892) e Fundação Bial.

Bibliografia

Asghar AU, Cilia La Corte PF, LeBeau FE, et al. Oscillatory activity within rat substantia gelatinosa in vitro: a role for chemical and electrical neurotransmission. *J Physiol* 2005;162:183-98.

Baranauskas G, Nistri A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 1998;54:349-65.

Bentley DE, Derbyshire SWG, Youell PD, Jones AKP. Caudal cingulate cortex involvement in pain processing: a inter-individual laser evoked potential source localisation study using realistic head models. *Pain* 2003;102:265-71.

Brunel N. Dynamics and plasticity of stimulus-selective persistent activity in cortical network models. *Cereb Cortex* 2003;13:1151-61.

Cadden SW. The ability of inhibitory controls to 'switch-off' activity in dorsal horn convergent neurones in the rat. *Brain Res* 1993;628:65-71.

Derjean D, Bertrand S, LeMasson G, Landry M, Morisset V, Nagy F. Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nature Neurosci* 2003;6:274-81.

Dickenson A, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987;30:349-60.

Egorov AV, Hamam BN, Fransén E, Hasselmo ME, Alonso AA. Graded persistent activity in entorhinal cortex neurones. *Nature* 2002;420:173-8.

Guilbaud G, Benoist JM, Levante A, Gautron M, Willer JC. Primary somatosensory cortex in rats with pain-related behaviours due to a peripheral mononeuropathy after moderate ligation of one sciatic nerve: neuronal responsiveness to somatic stimulation. *Exp Brain Res* 1992;92:227-45.

Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 2000;61:169-203.

Hounsgaard J, Hultborn H, Kiehn O. Transmitter-controlled properties of alpha-motoneurons causing long-lasting motor discharge to brief excitatory inputs. *Prog Brain Res* 1986;64:39-49.

Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences* 2003;26:696-705.

Jiang MC, Cleland CL, Gebhart GF. Intrinsic properties of deep dorsal horn neurons in the L6-S1 spinal cord of the intact rat. *J Neurophysiol* 1995;74:1819-27.

Laird JM, Bennett GJ. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 1993;69:2072-85.

Liu X-G, Sandkühler J. Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci Lett* 1995;191:43-6.

McGarraughy S, Henry JL. The effects of strychnine, bicuculline, and ketamine on 'immersion-inhibited' dorsal horn convergent neurons in intact and spinalized rats. *Brain Res* 1998;784:63-70.

Mendell LM. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol* 1966;16:316-32.

Morisset V, Nagy F. Modulation of regenerative membrane properties by stimulation of metabotropic glutamate receptors in rat deep dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 1996;76:2794-8.

Morisset V, Nagy F. Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999;19:7309-15.

Morisset V, Nagy F. Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* 2000;12:3087-95.

Paleček J, Palečková V, Dougherty PM, Carlton SM, Willis WD. Responses of spinothalamic tract cells to mechanical and thermal stimulation of skin in rats with experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 1992;67:1562-73.

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

Realí C, Russo RE. An integrated spinal cord-hindlimbs preparation for studying the role of intrinsic properties in somatosensory information processing. *J Neurosci Methods* 2005;142:317-26.

Russo RE, Hounsgaard J. Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an *in vitro* preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* 1996;493:39-54.

Russo RE, Nagy F, Hounsgaard J. Inhibitory control of plateau properties in dorsal horn neurones in the turtle spinal cord *in vitro*. *J Physiol* 1998;506:795-808.

Sandkühler J, Eblen-Zajjur AA. Identification and characterization of rhythmic nociceptive and non-nociceptive spinal dorsal horn neurons in the rat. *Neuroscience* 1994;61:991-1006.

Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA. Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 2003;423:288-93.

Sotgiu ML, Biella G, Riva L. Poststimulus afterdischarges of spinal WDR and NS units in rats with chronic nerve constriction. *NeuroReport* 1995;6:1021-4.

Steriade M. Coherent oscillations and short-term plasticity in corticothalamic networks. *Trends in Neurosciences* 1999;22:337-45.

Urbán L, Thompson SWN, Dray A. Modulation of spinal excitability: cooperation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends in Neurosciences* 1994;17:432-8.

Wall PD, Woolf CJ. The brief and the prolonged facilitatory effects of unmyelinated afferent input on the rat spinal cord are independently influenced by peripheral nerve section. *Neuroscience* 1986;17:1199-205.

Wang X-J. Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends Neurosci* 2001;24:455-63.

Woolf CJ, King AE. Subthreshold components of the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat lumbar spinal cord. *J Neurophysiol* 1989;62:907-16.

Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: 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.

Um Método Electrofisiológico para Identificação de Conexões Sinápticas entre Interneurónios Espinais

Sónia F.A. Santos e Boris V. Safronov

Resumo

A *substantia* gelatinosa (SG, lâmina II) é uma região da medula espinal onde terminam a maioria das fibras aferentes primárias responsáveis pela transmissão de estímulos dolorosos e onde se inicia o processamento nociceptivo central. É formada por vários grupos distintos de interneurónios cujas propriedades funcionais, em termos de conexões sinápticas, são pouco conhecidas. Isto deve-se ao facto de o único método de estudo de ligações fisiológicas actualmente utilizado consistir no registo simultâneo de neurónios monosinápticamente ligados sendo que, numa investigação deste tipo na SG, a probabilidade de se encontrarem neurónios conectados é muito baixa. Para além disto, são imensos os factores que dificultam a formação do contacto electrofisiológico simultâneo com as células, e apenas acidentalmente podemos escolher o par de neurónios sinápticamente ligados. Daí que estes estudos demorem anos e tenham uma produtividade que pouco ultrapassa a dezena de conexões sinápticas encontradas, não permitindo chegar a conclusões significativas.

Pelas razões expostas, durante muito tempo, o estudo fisiológico das conexões sinápticas foi um desafio para os investigadores que procuravam esclarecer os mecanismos associados ao processamento nociceptivo e, em particular, à dor crónica.

Para ultrapassar as dificuldades enumeradas, criámos um método inovador que permite a rápida e eficaz detecção de neurónios em conexão sináptica. A combinação do registo electrofisiológico em *whole-cell* com uma estimulação focal em *cell-attached*, ambas modalidades da técnica *patch-clamp*, serviram para estudar os neurotransmissores e receptores envolvidos em cada conexão sináptica e assim identificar a natureza excitatória ou inibitória de cada neurónio pré-sináptico.

Palavras-chave: *Substantia* gelatinosa. Conexões sinápticas. Electrofisiologia. *Patch-clamp*. Rato. Medula espinal.

Abstract

Substantia gelatinosa (SG, lamina II) is a spinal cord region where most primary afferent fibres responsible for the nociceptive transmission terminate and the central nociceptive processing begins. It is formed by several distinct groups of interneurons whose functional properties and synaptic connections are poorly understood, since probability of finding connected SG neurons is very low. Recording the activity of connected SG pairs of neurons is, therefore, a challenge and this knowledge is essential for better understanding the mechanisms associated to nociception and chronic pain.

Here, we describe a novel method which combines the whole-cell and the focal cell-attached-modes of the patch-clamp technique. This new methodology allows the successful finding of synaptically coupled neurons in rat spinal cord slices and identification of their inhibitory or excitatory nature.

Key words: Substantia gelatinosa. Synaptic connections. Electrophysiology. Patch-clamp. Rat. Spinal cord.

Introdução

A *substantia gelatinosa* (SG) é a região onde terminam a maioria das finas fibras C e A δ (Rethelyi M, 1977; LaMotte C, 1977; Light AR, Perl ER, 1977; Sugiura Y, et al., 1986) e, portanto, é um elemento chave no sistema de processamento nociceptivo. As diversas modalidades sensoriais na SG são codificadas pelos tipos de terminais aferentes, propriedades intrínsecas de disparo de potenciais de acção e conectividade sináptica dos seus interneurónios (Brown AG, 1981; Cervero F, 1987; Willis WD, Coggeshall RE, 1991).

Sabe-se muito pouco acerca das conexões sinápticas formadas pelos neurónios da SG com distintas propriedades de disparo de potenciais de acção. Este conhecimento é, todavia, crítico dado que a actividade de disparo neuronal e a força das sinapses estão relacionados. Com efeito, a modificação dependente de actividade da força sináptica, ou plasticidade sináptica, é uma propriedade essencial das redes neuronais (Malenka RC, Nicoll RA, 1999; Malenka RC, Bear MF, 2004; Turrigiano GG, Nelson SB, 2004; Lisman J, Spruston N, 2005) e tem um papel-chave no processamento nociceptivo e desenvolvimento da dor crónica (Woolf CJ, Salter MW, 2000; Ji RR, et al., 2003; Salter MW, 2005). Assim, o padrão de disparo de um neurónio pode determinar a eficiência das suas conexões funcionais e, em última análise, a sua contribuição para a actividade em rede. Portanto, é essencial identificar as diferentes modalidades de disparo dos interneurónios da SG assim como as suas conexões sinápticas no corno dorsal espinal, de forma a melhor compreender o modo de processamento da informação nociceptiva nesta região. Tal investigação baseia-se na identificação de pares de neurónios monossinápticamente conectados. Contudo, esta é uma tarefa difícil se se usar o modo convencional de registo da técnica *patch-clamp*, uma vez que a probabilidade de se encontrarem neurónios em conexão monossináptica nas fatias do corno dorsal superficial espinal é muito baixa (Lu e Perl, 2003). De facto, apesar de alguns estudos terem providenciado uma primeira visão da arquitectura da rede neuronal da SG e mostrado que os seus interneurónios formam circuitos excitatórios e inibitórios específicos na própria SG e na lâmina I (Lu Y, Perl ER, 2003 e 2005), o número total de registos actualmente disponíveis é ainda bastante limitado.

De forma a ultrapassar estas dificuldades, neste trabalho, criámos uma diferente forma de aproximação que combina o registo em *whole-cell* do neurónio pós-sináptico com a estimulação em *cell-attached* do neurónio pré-sináptico. Este método permite uma eficiente identificação das conexões monossinápticas dos interneurónios excitatórios e inibitórios da SG.

Metodologia

Material biológico

Os registos electrofisiológicos foram feitos a partir de fatias transversais e parassagitais de 200 ou 300 μ m preparadas a partir do alargamento lombar da medula espinal de ratos com idades compreendidas

entre as 2-7 semanas. Após a anestesia por injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (30 mg/kg⁻¹), a coluna vertebral foi rapidamente cortada e imersa numa solução artificial gelada e oxigenada de líquido cefalorraquidiano (LCR). O segmento de 5-7 mm do alargamento lombar foi extraído e dele foram obtidas as fatias posteriormente submetidas a incubação no LCR a 33 °C, durante 40-60 minutos. A SG foi identificada como uma banda translúcida de cerca de 60 μ m de espessura no corno dorsal, enquanto a camada marginal de 20 μ m foi considerada como lâmina I.

Soluções

O LCR continha (em mM): NaCl 115, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, glucose 11, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 25, glucose 11 (pH 7,4 quando borbulhado com uma mistura de 95-5% O₂-CO₂). O MgCl₂ foi excluído do LCR usado nos registos para evitar o possível bloqueio das correntes pós-sinápticas dependentes dos receptores NMDA, a potenciais próximos do potencial de repouso membranar. A solução da pipeta de registo continha (em mM): KCl 3, gluconato de K 150,5, MgCl₂ 1, BAPTA 1 e HEPES 10 (pH 7,3 ajustado com KOH, a [K⁺] final foi de 160,5 mM). O potencial reverso teórico para os iões de Cl⁻ (E_{Cl}) foi de -81 mV.

Registo electrofisiológico

As pipetas de registo foram puxadas a partir de tubos de borossilicato e polidas pelo calor para atingirem a resistência final de 3-5 M Ω (pipetas de estimulação intracelular) ou 13-27 M Ω (pipetas de estimulação extracelular). A técnica de *patch-clamp* de duplo eléctrodo foi usada em todas as experiências. O circuito de seguimento de voltagem do amplificador foi aplicado nos registos em corrente-controlada. A frequência de digitização foi sempre de 10 kHz. Todos os potenciais foram compensados directamente antes da formação do *gigaseal* (contacto de elevada resistência entre a célula e a pipeta de registo, na gama dos G Ω). Os potenciais de junção de líquidos foram calculados e corrigidos em todas as experiências. A resistência em série, determinada no modo de registo em corrente-controlada, a partir da alteração de voltagem instantânea produzida pela injeção de um passo de corrente, não excedeu os 14 M Ω .

Resultados e discussão

Para testar a eficiência da técnica que aqui se apresenta, foram previamente levadas a cabo experiências em que a utilização simultânea de dois eléctrodos em corrente-controlada permitiu registar a actividade intracelular do neurónio estimulado por uma pipeta extracelular (Fig. 1) (n = 12).

A medida que a pipeta de estimulação extracelular se aproximava da célula, podiam registar-se os artefactos de estimulação no modo de registo *whole-cell*, mas a despolarização membranar era muito pequena. Quando a pipeta extracelular era colocada em contacto directo com a célula, de forma a estimulá-la através de um pulso de corrente de 100 nA (máxima amplitude de corrente que é possível gerar no amplificador) durante 1 ms a uma frequência de 1 Hz, os artefactos de

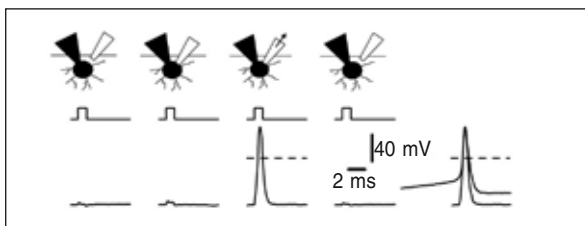


Figura 1. Estimulação focal em cell-attached. Em experiências-controlo um neurônio é estimulado extracelularmente, enquanto se regista intracelularmente a sua actividade. A estimulação é feita por injeção de 100 nA de corrente durante 1 ms a uma frequência de 1 Hz. O simples toque da célula por parte da pipeta não origina qualquer potencial, sendo visíveis apenas os artefactos de estimulação. A aplicação de uma leve pressão negativa é suficiente para que seja gerado um potencial de acção (seta). Os traços mais à direita correspondem aos registos extra e intracelulares sobrepostos.

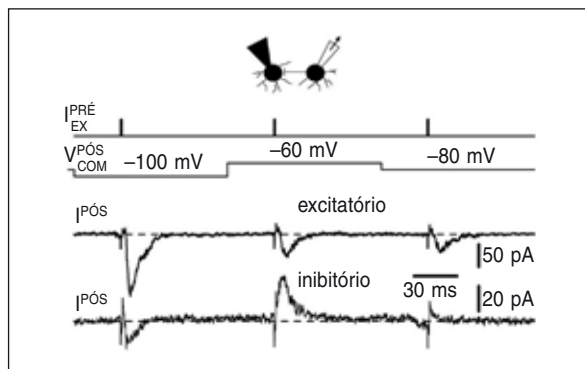


Figura 2. Procedimento experimental usado para a identificação dos neurónios excitatórios e inibitórios. As correntes pós-sinápticas ($I^{PÓS}$) foram registadas no neurónio pós-sináptico em voltagem-controlada a -100 , -60 e -80 mV (cada potencial aplicado durante 100 ms, $V_{Com, PÓS}$) enquanto o neurónio pré-sináptico é focalmente estimulado a intervalos de 100 ms ($I_{EX, PRÉ}$).

estimulação aumentavam mas a despolarização membranar era ainda insuficiente para excitar o neurônio. Apenas a aplicação de uma leve pressão negativa no eléctrodo de estimulação mostrou ser eficaz na geração de um potencial de acção, para cada pulso de estimulação. Se o contacto entre a célula e a pipeta deixasse de existir, então aquela não mais respondia com picos de potenciais de acção à aplicação de corrente extracelular. Uma única pipeta de estimulação pôde ser usada para estimular vários neurónios. A forma dos picos de potenciais de acção assim activados foi semelhante àquela normalmente observada no primeiro pico de um registo do padrão de disparo de potenciais de acção por injeção directa de corrente intracelular (picos sobrepostos na figura 1).

A utilização deste método permitiu o registo de picos de potenciais de acção em todos os grupos celulares, concluindo-se que esta técnica de estimulação é fiável e, pela primeira vez, é possível estimular específica e extracelularmente um único neurónio.

A identificação dos neurónios sinápticamente ligados e a classificação das células como excitatórias ou inibitórias foi feita segundo o protocolo experimental representado na figura 2.

Enquanto o neurónio pós-sináptico localizado nas lâminas I-III foi mantido a -80 mV, a segunda pipeta de registo (extracelular) foi posta em contacto com o potencial neurónio pré-sináptico, presumivelmente localizado na SG. Em seguida, aplicou-se pré-sinápticamente uma ligeira pressão negativa enquanto um comando vóltico alterou o potencial membranar do neurónio pós-sináptico para -100 mV e -60 mV (cada um com a duração de 100 ms), retornando posteriormente a -80 mV. No neurónio pré-sináptico injectaram-se extracelularmente 100 nA de corrente, 30 ms após cada mudança vóltica pós-sináptica, de forma a assegurar que as respostas pós-sinápticas não eram meros artefactos causados pela alteração de potenciais. No caso dos neurónios estarem em conexão sináptica, as respectivas respostas eram registadas no neurónio pós-sináptico a três diferentes potenciais (-100 , -60 e -80 mV) a uma frequência de 10 Hz (100 ms de in-

tervalo entre estimulações). Os registos mostrados em todas as figuras contêm apenas os artefactos de estimulação e as correntes pós-sinápticas.

A actividade do neurónio pós-sináptico foi registada em corrente-controlada, modo através do qual se observaram os potenciais excitatórios e inibitórios. Consideraram-se neurónios excitatórios aqueles em que a estimulação da célula pré-sináptica evocou a geração de correntes *inward* (com entrada de cargas positivas) a -100 , -60 e -80 mV. Por sua vez, foram considerados neurónios inibitórios aqueles em que a estimulação pré-sináptica evocou a geração de correntes pós-sinápticas *inward* a -100 mV, *outward* (saída de cargas positivas, ou entrada de cargas negativas) a -60 mV e negligenciáveis a -80 mV (dado que este é um potencial próximo do $E_{Cl} = -81$ mV).

Em oito casos, as conexões excitatórias foram ainda identificadas com base nos potenciais pós-sinápticos registados no modo de corrente-controlada (Fig. 3).

Para os dois tipos de conexões sinápticas, foram apenas estudadas as respostas monossinápticas, ou seja, com uma baixa percentagem de falhas para as três estimulações a diferentes potenciais e com uma latência constante, por oposição às respostas polissinápticas com latências variáveis e falhas frequentes (falhas não mostradas) (Fig. 4).

A classificação das respostas sinápticas foi ainda confirmada por testes farmacológicos específicos para a determinação dos receptores envolvidos: as correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) foram bloqueadas pelo antagonista de receptores para o glutamato, CNQX (10 μ M, $n = 16$) (Fig. 5), enquanto as correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) foram bloqueadas pelo antagonista dos receptores glicinérgicos, estriquinina (1 μ M, $n = 6$) (Fig. 6).

Segundo estes resultados, os transdutores da transmissão rápida das sinapses excitatórias deverão ser os receptores AMPA e/ou quinato, uma vez que as correntes pós-sinápticas são completamente bloqueadas pelo CNQX. Os receptores quinato têm sido implicados na transmissão sináptica associada com a informação afe-

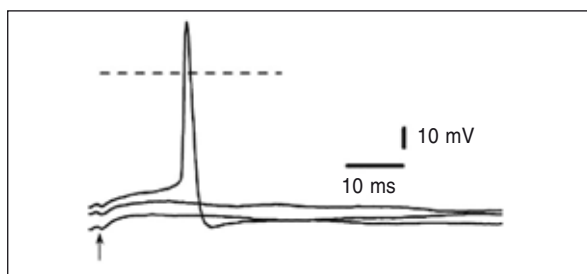


Figura 3. Resposta pós-sináptica excitatória. Os traços em corrente-controlada mostram potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) a diferentes potenciais de membrana. O momento de estimulação extracelular do neurónio pré-sináptico está assinalado por uma seta. Note-se que é necessária uma substancial despolarização membranar do neurónio pós-sináptico para que os PEPS atinjam o limiar para a geração de um potencial de acção.

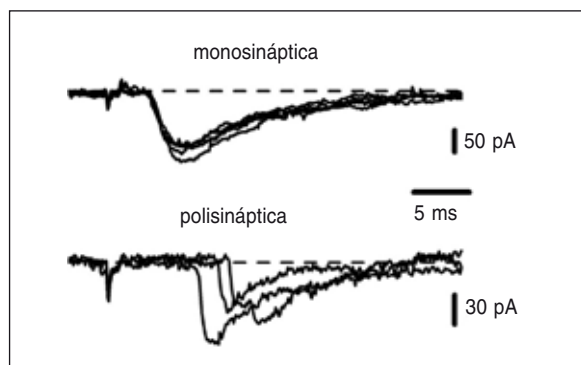


Figura 4. Comparação das respostas mono e polissinápticas. A conexão monossináptica, cinco pulsos consecutivos a -100 mV com intervalos de 1,5 s. A conexão polissináptica, três pulsos não consecutivos a -100 mV (falhas não mostradas).

rente via fibras A δ e C para a SG (Youn DH, Randic M, 2004) e na modulação da libertação de neurotransmissor (Engelman HS, MacDermott AB, 2004). Nas nossas condições experimentais de estimulação de baixa intensidade, a activação dos receptores sinápticos do quinato é, no entanto, improvável, uma vez que aqueles requerem uma estimulação de alta intensidade para serem activados (Frerking M, et al., 1998; Lee CJ, et al., 2004), para além de que as correntes sinápticas mediadas pelos receptores do quinato são lentas em cinética (Frerking M, et al., 1998; Cossart R, et al., 2002). Assim, os nossos resultados são consistentes com o envolvimento dos receptores AMPA e com as observações de outros grupos que mostram que este tipo de receptores de glutamato são altamente expressos nas sinapses do corno dorsal superficial (Tachibana M, et al., 1994; Tolle Tr, et al., 1995; Petralia Rs, et al., 1997) e modulam a plasticidade sináptica espinal e a dor inflamatória (Hartmann B, et al., 2004).

Em relação aos neurónios inibitórios, é mostrado que estes libertam glicina actuando nos receptores sensíveis à estriquinina. Isto está de acordo com as observações de que as mini-CIPS espontâneas nos neurónios da lâmina I são quase exclusivamente mediadas pelos receptores de glicina sensíveis à estriquinina (Chéry N, De Koninck Y, 1999). Para além disto, a

média da constante temporal de decaimento das CIPS (5 ms) aqui obtida está em concordância com a das CIPS mediadas pelo receptor da glicina nos neurónios das lâminas I-II (Chéry N, De Koninck Y, 1999).

Em cinco experiências-controlo, após a identificação da conexão sináptica, foram estabelecidos dois contactos intracelulares simultâneos com os neurónios pré e pós-sinápticos de forma a confirmar a especificidade do método de estimulação extracelular descrito (Fig. 7).

Nestes casos, o registo pós-sináptico era mantido, enquanto a pipeta extracelular era substituída por outra destinada a registar a actividade pré-sináptica no mesmo modo de registo da célula pós-sináptica. Em todas as cinco conexões, o potencial de acção gerado no neurónio pré-sináptico por injeção directa de corrente foi seguido pela respectiva corrente pós-sináptica. Os atrasos temporais e a cinética das correntes pós-sinápticas assim registadas foram indistinguíveis daqueles observados, aquando da utilização do método de estimulação extracelular.

Estas considerações atestam, pois, a especificidade e fiabilidade deste método que se revela útil no estudo da organização dos circuitos neuronais na SG, importante para esclarecer os mecanismos do processamento nociceptivo.

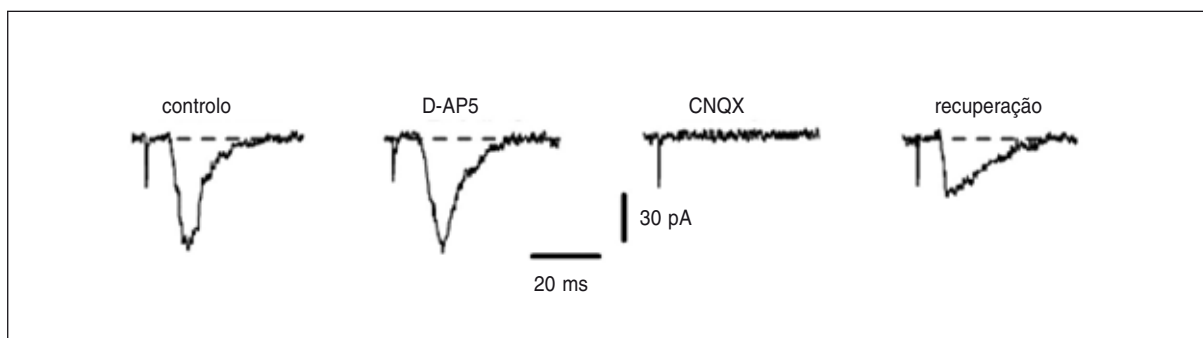
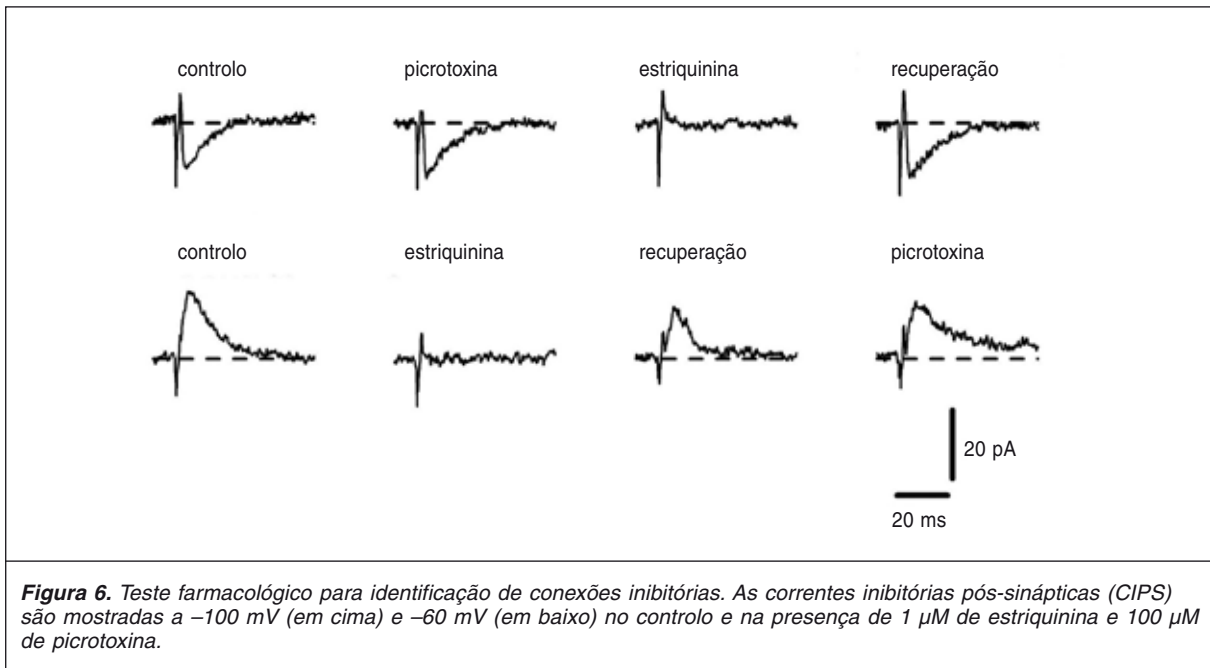


Figura 5. Teste farmacológico para identificação de conexões excitatórias. As correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) são mostradas no controlo e na presença de $50 \mu\text{M}$ de D-AP5 e $10 \mu\text{M}$ de CNQX.



Apoios

Este projecto foi financiado pela FCT.

Bibliografia

- Brown AG. Organization in the Spinal Cord. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg; 1981.
- Cervero F. Dorsal horn neurones and their sensory inputs. Em: Spinal Afferent Processing. Yaksh TL, ed. Plenum Press: New York; 1987. p. 197-216.
- Chéry N, De Koninck Y. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA_A receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. J Neurosci 1999;19:7342-55.
- Cossart R, Epsztein J, Tyzio R, et al. Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. Neuron 2002;35:147-59.
- Engelman HS, MacDermott AB. Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. Nat Rev Neurosci 2004;5:135-45.

- Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA. Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. Nat Neurosci 1998;1:479-86.
- Hartmann B, Ahmadi S, Heppenstall PA, et al. The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. Neuron 2004;44:637-50.
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? Trends Neurosci 2003;26:696-705.
- LaMotte C. Distribution of the tract of lissauer and the dorsal root fibers in the primate spinal cord. J Comp Neurol 1977;172:529-61.
- Light AR, Perl ER. Differential termination of large-diameter and small-diameter primary afferent fibers in the spinal dorsal gray matter as indicated by labeling with horse-radish peroxidase. Neurosci Lett 1977;6:59-63.
- Lee CJ, Labrakakis C, Joseph DJ, Macdermott AB. Functional similarities and differences of AMPA and kainate receptors expressed by cultured rat sensory neurons. Neuroscience 2004;129:35-48.
- Lisman J, Spruston N. Postsynaptic depolarization requirements for LTP and LTD: a critique of spike timing-dependent plasticity. Nat Neurosci 2005;8:839-41.
- Lu Y, Perl ER. A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. J Neurosci 2003;23:8752-8.
- Lu Y, Perl ER. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). J Neurosci 2005;25:3900-7.
- Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress? Science 1999;285:1870-4.
- Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron 2004;44:5-21.
- Petralia RS, Wang YX, Mayat E, Wenthold RJ. Glutamate receptor subunit 2-selective antibody shows a differential distribution of calcium-impermeable AMPA receptors among populations of neurons. J Comp Neurol 1997;385:456-76.
- Rethelyi M. Preterminal and terminal axon arborizations in the substantia gelatinosa of cat's spinal cord. J Comp Neurol 1977;172:511-21.
- Salter MW. Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. Curr Top Med Chem 2005;5:557-67.
- Sugiura Y, Lee CL, Perl ER. Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. Science 1986;234:358-61.
- Tachibana M, Wenthold RJ, Morioka H, Petralia RS. Light and electron microscopic immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat spinal cord. J Comp Neurol 1994;344:431-54.
- Tolle TR, Berthele A, Zieglansberger W, Seeburg PH, Wisden W. Flip and Flop variants of AMPA receptors in the rat lumbar spinal cord. Eur J Neurosci 1995;7:1414-9.
- Turrigiano GG, Nelson SB. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. Nat Rev Neurosci 2004;5:97-107.
- Willis WD, Coggeshall RE. Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. Plenum Press: New York; 1991.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science 2000;288:1765-9.
- Youn DH, Randic M. Modulation of excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa of mice deficient in the kainate receptor GluR5 and/or GluR6 subunit. J Physiol 2004;555:683-98.

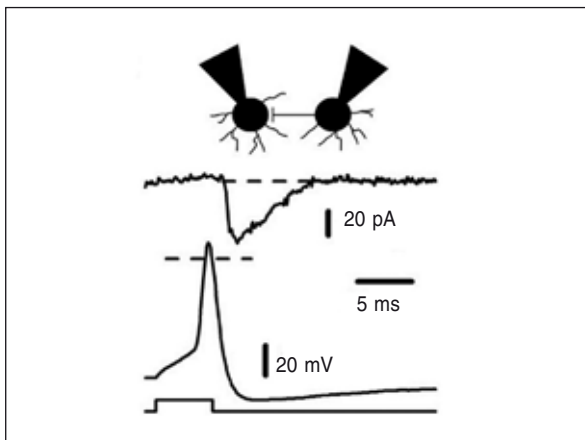


Figura 7. Registos intracelulares simultâneos em whole-cell de dois neurónios em conexão sináptica. Um potencial de acção activado pela injeção directa de corrente (100 pA, 5 ms) no neurónio pré-sináptico evoca uma curta latência e uma corrente inward no neurónio pós-sináptico mantido a -80 mV.