

Investigação



Mensagem do Presidente da APED	3
Analgesia Preventiva, ao Teste do Formol, por Terapia <i>Laser</i> em Ratinhos	5
Analgesia e Electroestimulação Cutânea	9
Hipertensão e Hipoalgesia: Papel do Bolbo Raquidiano Ventrolateral Caudal e do Sistema GABAérgico Espinhal	13
A Neuropatia Diabética está Associada a Alterações nas Respostas Nociceptivas dos Neurónios Espinhais: um Estudo no Rato Injectado com Estreptozotocina	22
Expressão do ARNm para o Receptor Opióide δ (DOR) Durante a Evolução da Monoartrite: Iterações Observadas no Núcleo Reticular do Tálamo e em Núcleos do Bolbo Raquidiano do Tronco Cerebral	32

Volume Monotemático dedicado a
INVESTIGAÇÃO

Director

José Manuel Castro Lopes

Editores

Luís Agualusa

José Manuel Castro Lopes

Teresa Vaz Patto

Sílvia Vaz Serra

Mensagem do Presidente da APED José Manuel Castro Lopes	3
Analgesia Preventiva, ao Teste do Formol, por Terapia Laser em Ratinhos Daniel Humberto Pozza, Marília Gerhardt de Oliveira, João Batista de Macêdo Sobrinho e Nelson Ribeiro Neto	5
Analgesia e Electroestimulação Cutânea Ana Teresa Gaspar e Filipe Antunes	9
Hipertensão e Hipoalgesia: Papel do Bolbo Raquidiano Ventrolateral Caudal e do Sistema GABAérgico Espinhal Dora Pinho, Manuela Morato, Teresa Sousa, José Marques Lopes, Isaura Tavares e António Albino-Teixeira	13
A Neuropatia Diabética está Associada a Alterações nas Respostas Nociceptivas dos Neurónios Espinhais: um Estudo no Rato Injectado com Estreptozotocina C. Morgado e Isaura Tavares	22
Expressão do ARNm para o Receptor Opióide δ (DOR) Durante a Evolução da Monoartrite: Alterações Observadas no Núcleo Reticular do Tálamo e em Núcleos do Bolbo Raquidiano do Tronco Cerebral Fani Lourença Neto, Raquel Carvalhosa, Joana Ferreira-Gomes, Carlos Reguenga e José Manuel Castro-Lopes	32

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.



© 2007 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.: 736AP062



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

Apesar de ter cessado funções como presidente da APED há algum tempo, o atraso «crónico» da publicação da nossa revista faz com que esta página ainda seja da minha autoria (pela última vez e com a concordância do novo presidente da APED), aproveitando esta oportunidade para fazer um balanço dos dois mandatos que acabei de cumprir.

Quando o principal responsável pela criação da APED, e até então seu presidente, Dr. Nestor Rodrigues, me «empurrou carinhosamente» para a candidatura à presidência da APED, estava bem ciente do enorme desafio que isso representava. Como não me canso de dizer, sou um mero cientista básico, com muito pouca experiência clínica, enquanto a esmagadora maioria dos associados da APED exercem actividade clínica (médicos, enfermeiros e psicólogos), e os principais objectivos da APED relacionam-se com a actividade assistencial. Foi pois necessário rodear-me de pessoas com diferentes experiências, sensibilidades e formas de encarar os problemas, que constituíram uma equipa coesa, renovada a meio do percurso. Tudo aquilo que a APED foi e fez nestes últimos seis anos resultou de um verdadeiro trabalho de equipa, cabendo-me a mim, por força das circunstâncias, o papel de coordenador e porta-voz das decisões colegiais. Quero pois iniciar este balanço final manifestando a minha profunda gratidão a todos os elementos dessa equipa fantástica!

É sempre muito difícil ser juiz em causa própria, pelo que a melhor forma de efectuar uma auto-avaliação das actividades da APED nos últimos seis anos será através da comparação daquilo que nos propusemos fazer quando fomos eleitos, com aquilo que realmente fizemos. Assim, no plano de acção que apresentámos constava:

- «Proceder à revisão dos estatutos da Associação de modo a adequá-los à legislação em vigor e regulamentar a eleição dos seus corpos administrativos».

A revisão foi efectuada e aprovada em Assembleia Geral. Infelizmente, só recentemente tivemos conhecimento que é necessário proceder ao registo notarial da alteração, o que irá ser efectuada pela actual direcção.

- «Solicitar a concessão do estatuto de Associação Científica sem fins lucrativos e proceder ao registo da sigla e do logótipo». Este foi um objectivo sucessivamente adiado, talvez devido a alguma «aversão» pelas

burocracias, mas que será finalmente concretizado pela actual direcção.

- «Prosseguir a política de angariação de novos sócios para que a APED possa congregar um número cada vez maior de pessoas de diversas áreas empenhadas na investigação, ensino e assistência no âmbito da dor».

O número de sócios tem vindo a aumentar, apesar de recentemente se ter procedido ao cancelamento dos sócios que não pagavam cotas regularmente há vários anos, na sequência de uma decisão aprovada em Assembleia Geral.

- «Dar maior visibilidade à APED, nomeadamente através da presença de cartazes e panfletos em todos os eventos relacionados com a dor e áreas afins, e da divulgação na comunicação social dos eventos realizados pela APED».

Foi possível projectar o nome da APED a nível nacional, sobretudo pelo impacto nos órgãos de comunicação social dos eventos organizados no Dia Nacional de Luta Contra a Dor e no Dia Mundial e Semana Europeia Contra a Dor.

- «Criar uma página na internet com informação sobre a APED e ligação a outras entidades nacionais e internacionais relacionadas com a dor».

Este objectivo foi plenamente atingido, com o generoso patrocínio da Grunenthal. Ver em www.aped-dor.org.

- «Manter a publicação regular da revista Dor».

A publicação da revista manteve-se, com o indispensável patrocínio de várias empresas farmacêuticas (que actualmente incluem apenas a Janssen-Cilag, Grunenthal e Pfizer), mas a sua regularidade não foi a desejada, muito particularmente após a saída do seu anterior director-executivo, Dr. José Manuel Caseiro. Há pouca tradição no nosso meio de escrever artigos científicos ou de revisão e é muito difícil «obrigar» pessoas, muitas vezes sobreocupadas, a cumprir os prazos de entrega a que se comprometeram. Este é um problema que não tem solução fácil, mas espero que a nova direcção da APED o consiga ultrapassar de uma forma muito mais eficaz que a direcção cessante.

- «Realizar anualmente a cerimónia comemorativa do Dia Nacional de Luta Contra a Dor (14 de Junho)».

Todos os anos foram promovidos eventos para assinalar o Dia Nacional de Luta Contra a Dor, alguns com maior impacto mediático (como as Corridas Contra a Dor ou os Concursos de Desenhos Infantis), outros de carácter mais educacional/científico.

- «Promover ou apoiar reuniões científicas nacionais organizadas pela APED ou pelos seus associados».

A APED organizou, sozinha ou em associação com outras associações científicas, diversas reuniões/encontros/congressos e concedeu o patrocínio científico a muitas outras. Além disso, os elementos da direcção da APED responderam sempre afirmativamente aos convites que outras associações/sociedades lhes fizeram para intervir nas reuniões por elas organizadas. De salientar ainda a candidatura que a APED apresentou à EFIC para que o Congresso Europeu de Dor *Pain in Europe VI* se realize em Lisboa em Setembro de 2009, a qual viria a ser aprovada no conselho da EFIC.

- «Apoiar a participação dos associados da APED em reuniões científicas internacionais».

Felizmente, as empresas farmacêuticas desempenham este papel de forma muito activa, pelo que esta foi uma iniciativa que a direcção da APED, face aos seus poucos recursos económicos, não levou a cabo, para além do indispensável apoio à participação nas reuniões institucionais com as suas congéneres internacionais.

- «Prosseguir o trabalho conducente à aprovação do Plano Nacional de Luta Contra a Dor e dar todo o apoio solicitado para que se promova a sua aplicação prática».

A APED respondeu a todas as solicitações da Direcção-Geral da Saúde neste âmbito, o presidente da APED aceitou coordenar a Comissão de Acompanhamento do Plano Nacional de Luta Contra a Dor. Sobre a aplicação do Plano, já me pronunciei suficientemente no número anterior da revista.

- «Apoiar a realização de um estudo epidemiológico sobre a prevalência da dor crónica em Portugal».

Esse estudo está em curso, a cargo de um grupo de investigadores da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, com o apoio da APED e o patrocínio das mesmas empresas farmacêuticas que apoiam a publicação da revista *Dor*. Além disso, deu-se início a um estudo sobre Dor Aguda Pós-Operatória, cuja fase preliminar está con-

cluída e que aguarda financiamento para se concretizar.

- «Realizar um inquérito sobre o ensino pré e pós-graduado nas instituições universitárias».

O inquérito foi realizado e os resultados foram desanimadores, conforme já tive ocasião de revelar publicamente.

- «Estudar a possibilidade de serem elaboradas e publicadas recomendações genéricas para uma boa prática clínica no âmbito da dor».

Recentemente, um grupo de peritos convidados pela APED elaborou recomendações para a prescrição de opióides na dor não-oncológica, tendo como base as recomendações internacionais já existentes. As recomendações foram aprovadas pela Comissão de Acompanhamento do Plano Nacional de Luta Contra a Dor, aguardando-se a sua publicação pela Direcção-Geral da Saúde.

- «Prosseguir o debate sobre a eventual criação de uma subespecialidade ou competência em Algologia/Medicina da Dor».

Não apenas se prosseguiu o debate como se logrou concretizar a Competência em Medicina da Dor. Sobre este assunto também já me pronunciei em anteriores edições da revista.

Claro que a actividade da direcção da APED não se esgotou em atingir estes objectivos, mas seria fastidioso estar aqui a enumerar todas as iniciativas que foram tomadas durante os últimos seis anos e que constam dos relatórios de actividades anuais (o último dos quais disponível no sítio da APED na internet). Posso apenas afirmar, sem falsa modéstia, que fomos tão longe quanto pudemos e soubemos em quase tudo aquilo a que nos propusemos, e que sinto algum orgulho pelo que lográmos alcançar, salientando e agradecendo mais uma vez a indispensável colaboração de muitos sócios da APED, para além dos elementos da direcção.

Termino desejando o maior êxito aos elementos da direcção da APED que nos sucederam, e em particular ao seu Presidente, Dr. José Romão. Porque o fiquei a conhecer bem durante os anos em que servimos conjuntamente a APED, estou certo que a associação passará por um período de grande progresso, pois será liderada por uma pessoa muito empenhada, extremamente competente e totalmente dedicada à causa de todos nós, plasmada nos estatutos da APED: promover o estudo, ensino e divulgação dos mecanismos fisiopatológicos, meios de prevenção, diagnóstico e terapêutica da dor.

Analgesia Preventiva, ao Teste do Formol, por Terapia *Laser* em Ratinhos

Daniel Humberto Pozza¹, Marília Gerhardt de Oliveira²,
João Batista de Macêdo Sobrinho³ e Nelson Ribeiro Neto³

Resumo

Esta investigação avaliou o efeito analgésico da terapia *laser* em tecidos íntegros do coxim plantar de 10 ratinhos divididos em dois grupos:

- L: irradiação com *laser* (665 nm, 30 mW, 10 J/cm², 334 s).
- C: simulação com aparelho *laser* desligado (334 s).

Após a aplicação *laser*, os ratinhos continuaram imobilizados para injeção de formol, no coxim plantar da pata irradiada. Mediu-se, durante 30 minutos, com intervalos de cinco minutos, o tempo que cada animal permaneceu com a pata estudada elevada. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas em todos os tempos avaliados, sendo melhores para o grupo *laser*.

Palavras-chave: Terapia *laser*. Medição da dor. Analgesia.

Abstract

The present research assessed the analgesic effect of the laser therapy in healthy tissues of 10 mice divided into two groups:

- L: red laser irradiation (665 nm, 30 mW, 10 J/cm², 334 s).
- C: control laser irradiation (334 s).

After laser therapy formalin solution was injected on the same paw, the animal was placed in a transparent box and observers recorded the paw rose time during 30 minutes. The results showed statistical difference and red laser presented better results in all times. (Dor. 2007;15(2):5-8)

Corresponding author: Daniel Humberto Pozza, dhpozza@med.up.pt

Key words: Laser therapy. Pain measurement. Analgesia.

Introdução

A terapia *laser* é um tratamento não-invasivo, bem aceite por pacientes, efectivo para uma grande variedade de dores agudas e crónicas, com ausência de efeitos colaterais. O mecanismo de atenuação da dor está correlacionado à alteração da concentração de prostaglandinas, encefalinas, serotonina, endorfinas e da ciclooxigenase¹⁻³.

Estudos clínicos em pacientes saudáveis com *laser* HeNe (632,8 nm e 20 s)⁴ e com o *laser* GaAlAs (830 nm, 140 mW e 6 J/cm²)⁵ verificaram um decréscimo significativo na velocidade da condução do impulso nervoso. O *laser* HeNe na densidade de energia de 7 J/cm² aumenta o potencial de acção do nervo ciático de rãs, promovendo a redução da condução do impulso nervoso⁶. Esta redução decorre das mudanças neuronais reversíveis tais como: varicosidades neuronais, diminuição do potencial de membrana e da produção de ATP mitocondrial⁷.

A terapia *laser* é um método efectivo, em curto período de tempo, na redução da dor muscular crónica. Este facto deve-se ao efeito anti-inflamatório, na redução da síntese de prostaglandinas, inibição da prostaciclina, aumento da circulação sanguínea, acção nervosa periférica e efeitos analgésicos⁸⁻¹².

O aumento no fluxo vascular após a terapia *laser* é um importante factor na redução da dor

¹Doutor em Medicina Dentária
Instituto de Histologia e Embriologia
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal

²Doutora em Medicina Dentária
Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul, Brasil

³Doutor em Medicina Dentária
Núcleo Salvador Funorte/lappem, Brasil
E-mail: dhpozza@med.up.pt

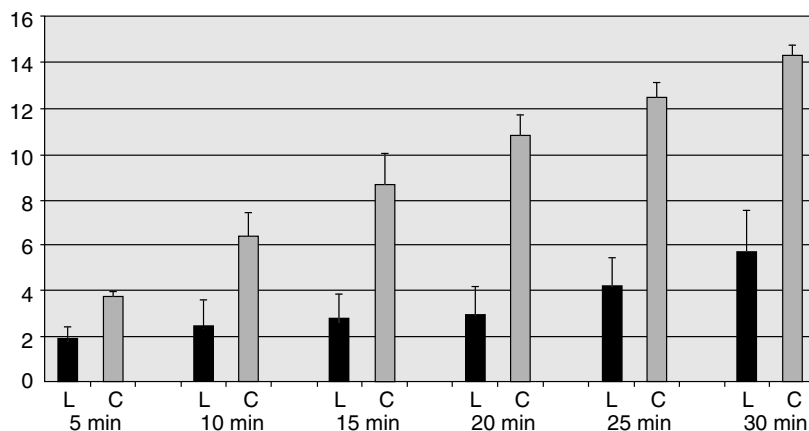


Figura 1. Representação gráfica, em barras, da distribuição das médias dos tempos, em minutos (eixo y), de acordo com o grupo e o período de estudo (eixo x). L: laser vermelho; C: controle.

devido ao aumento da oxigenação, da drenagem linfática, da actividade de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, bem como o maior metabolismo de células em défice ou danificadas^{2,13-18}.

A injeção de solução de formol, em concentrações acima de 2%, na pata de ratos produz duas fases comportamentais nociceptivas. A primeira fase, até cinco minutos, é resultado da activação de fibras aferentes periféricas promovendo a liberação de péptidos pró-inflamatórios, como bradicinina e da substância P, levando ao estímulo doloroso. Já a segunda fase, entre 15 e 30 minutos, deve-se aos mediadores da inflamação, através da liberação de histamina, serotonina, prostaglandina e bradicinina; e/ou hipersensibilização da medula espinal induzida na primeira fase¹⁹⁻²⁴.

Esta investigação objectivou verificar a acção analgésica da terapia *laser* sobre tecidos íntegros do coxim plantar de ratinhos, previamente à injeção de solução de formol a 2%.

Metodologia

O modelo animal foi o ratinho macho, suíço, com peso variando entre 37 e 41 g, clinicamente sadio. Os animais foram alimentados com dieta sólida e água *ad libidum*, sendo suspensas no dia do experimento, quando foram seleccionados aleatoriamente e divididos em dois grupos distintos, com cinco animais.

No grupo L, foi usado o *laser* diodo vermelho, com comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 mW, no modo pontual, por contacto e emissão contínua. A densidade de energia foi de 10 J/cm², com um tempo total de 334 s e diâmetro do feixe *laser* de 3 mm. A aplicação realizou-se no centro do coxim plantar dos ratinhos. No grupo C, a ponteira do *laser* foi posicionada da mesma forma que no grupo L, ou

seja, sobre o coxim plantar, e mantida pelo mesmo tempo (334 s). Porém, o aparelho esteve desligado, o que configurou, desta forma, o grupo controle.

Imediatamente após a retirada da ponteira do *laser*, foram administrados, no tecido subcutâneo, 30 µl de solução estéril de formol a 2% neste mesmo coxim. Logo após a remoção da agulha, o animal foi colocado em uma caixa de 20 cm² de assoalho, com 40 cm de altura, tendo ao fundo um espelho e vidro transparente nas laterais a fim de facilitar a visualização das patas.

Um observador e um aferidor mediram o tempo em que cada ratinho permaneceu com a pata direita elevada. Para as aferições foram usados dois cronómetros: o primeiro era acionado toda vez que o animal elevasse a pata e interrompido assim que a mesma entrasse totalmente em contacto com o assoalho espelhado da caixa. O segundo cronómetro registou 30 minutos ininterruptos, nos quais, a cada cinco minutos anotaram-se os valores parciais acumulados.

Resultados

Realizou-se o teste Mann-Whitney (*two-tailed P value*) no qual se verificou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0079$) entre os grupos *laser* e controle, para todos os períodos parciais acumulados. Para melhor visualização dos resultados, utilizaram-se as médias e os desvios-padrão para confeccionar o gráfico de barras (Fig. 1).

Discussão

A solução de formol utilizada apresentou-se diluída a 2%, pois concentrações abaixo de 2% podem não ser eficazes na indução dolorosa em ratinhos¹⁹⁻²¹. A densidade de energia de

10 J/cm² está de acordo com outros trabalhos^{25,26}. Moore, et al.²⁶ obtiveram resultados positivos com esta dosagem no crescimento celular quando utilizaram o comprimento de onda na faixa do vermelho e uma inibição de fibroblastos no comprimento de onda infravermelho. Nesta investigação utilizou-se o *laser* no comprimento de onda vermelho. Ebert e Roberts⁶ utilizaram 7 J/cm² e obtiveram bons resultados somente com o *laser* infravermelho. No entanto, realizaram a irradiação directamente sobre o tecido nervoso, não havendo interferência dos estratos celulares de estudos *in vivo* como na presente investigação. Deve-se considerar ainda a influência de outros factores tais como a espessura dos tecidos do animal, o grau de interferência óptica por pigmentos endógenos e a presença de um constante fluxo sanguíneo, dentre outros.

Quando mal conduzidas, altas densidades de energia podem provocar danos aos tecidos²⁵. Já as baixas densidades de energia podem não trazer efeitos biológicos aos tecidos irradiados, como verificaram Núñez, et al.¹⁸ ao avaliar os efeitos do *laser* HeNe na microcirculação de ratos com apenas 1 J/cm². Utilizou-se 10 J/cm² em que, a 30 mW de potência, demora um tempo aproximado de cinco minutos, sendo clinicamente viável.

Sabe-se que a terapia *laser* promove um aumento da síntese e da liberação de endorfina, bem como uma diminuição da liberação de transmissores nociceptivos, como a bradicinina e a serotonina¹⁻³. No entanto, estes mecanismos dificilmente actuaram na redução da dor deste estudo devido à única aplicação e ao curto período de avaliação, imediatamente após a aplicação do *laser* terapêutico.

Acredita-se que a redução da condução do impulso nervoso pela terapia *laser* tenha sido um dos mecanismos na redução da sensação algíca apresentada pelos ratinhos. Esta afirmativa baseou-se em estudos que constataram uma estabilização da membrana celular, regulando a transmissão do impulso nervoso. Tal regulação evita a despolarização promovendo uma elevação significativa da latência nervosa. Com uma redução na velocidade da condução do impulso nervoso, verifica-se, então, uma redução da dor^{2,4-7,14}.

Outro pilar de fundamentação da redução da dor nos animais irradiados, quando comparado com o controlo, é o efeito vascular do *laser* terapêutico. O aumento no fluxo sanguíneo promove uma maior oxigenação, aumenta a drenagem linfática, a actividade de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e o metabolismo de células em défice ou danificadas, sendo o responsável por uma redução da dor após os primeiros minutos de irradiação tecidual^{3,10-12,14,15,17}.

Diversas investigações^{1,8-12,27} utilizaram a terapia *laser* como método de tratamento quando

a dor já estava instalada. No presente estudo constatou-se que a terapia *laser* pode ser usada não somente em tecidos lesados ou em défice nutricional, mas também em tecidos íntegros. Verificou-se ainda que este tratamento pode ser usado não apenas para a dor já instalada, mas também como um método preventivo da dor.

Transpondo os resultados deste estudo para a clínica, verifica-se que é possível utilizar o *laser* como precursor de uma anestesia infiltrativa, administração de medicamentos, biopsias ou procedimentos em que se realize uma punção por agulha. Os anestésicos tópicos e as mais diversas manobras são utilizados para minimizar a sensação desconfortável sofrida pelo paciente. O *laser* terapêutico, por seus efeitos nos tecidos íntegros, pode reduzir esse desconforto.

Concluiu-se que a terapia *laser*, previamente à injeção de solução de formol a 2%, apresentou efeitos analgésicos sobre os tecidos íntegros do coxim plantar de ratinhos.

Bibliografia

- Walker J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neurosci Lett* 1983;30(43):339-44.
- Benedicenti A. *Atlante di laser-terapia*. Gênova: Langa Grafica; 1982.
- Moore K. Lasers and pain treatment. *Laser Part Clinix* 2004;72:1-6.
- Snyder-Mackler L, Bork CE. Effect of helium-neon laser irradiation on peripheral sensory nerve latency. *Phys Ther* 1988; 68(2):223-5.
- Cambier D, Blom K, Witvrouw E, Ollevier G, De Muyneck M, Vanderstraeten G. The Influence of Low Intensity Infrared laser irradiation on conduction characteristics of peripheral nerve: A randomised, controlled, double blind study on the sural nerve. *Lasers Med Sci* 2000;15:195-200.
- Ebert DW, Roberts C. In vitro frog sciatic nerve as a peripheral nerve model for studies of the mechanism of action of low energy lasers: Part one. *Laser Surg Med* 1997;21(1):32-41.
- Chow RT, David MA, Armati PJ. 830nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830nm laser. *J Periph Nerv Syst* 2007;12:28-39.
- Gur A, Karakoc M, Cevik R, Nas K, Sarac AJ, Karakoc M. Efficacy of low power laser therapy and exercise on pain and functions in chronic low back pain. *Laser Surg Med* 2003;32:233-8.
- Gur A, Cosut A, Sarac AJ, Cevik R, Nas K, Uyar A. Efficacy of different therapy regimes of low power laser in painful osteoarthritis of knee: a double-blind and randomized-controlled trial. *Laser Surg Med* 2003;33:330-8.
- Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altindag O, Sarac S. Efficacy of 904nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: a double-blind and randomized-controlled trial. *Laser Surg Med* 2004;35:229-35.
- Hakgüder A, Birtane M, Gurcan S, Kokino S, Turam FNT. Efficacy of low level laser therapy in myofascial syndrome: an algometric and thermographic evaluation. *Laser Surg Med* 2003;33:339-43.
- Ilbuldu E, Cakmak A, Disci R, Aydin R. Comparison of laser. Dry needling, and placebo laser treatments in myofascial pain syndrome. *Photomed Laser Surg* 2004;22(4):306-11.
- Miró L, Coupe M, Charras C, Jambon C, Chevalier JM. Estudio capilarescópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. *Inv Clin Laser* 1984;1(2):9-14.
- Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Laser Surg Med* 2000;27(5):427-37.
- Schaffer M, Bonel H, Sroka R, et al. Effects of 780nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-

- dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol* 2000;54:55-60.
16. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Schon HP, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvasc Res* 2002;64:240-6.
 17. Macêdo Sobrinho JB, Pinheiro ALB, Casais e Silva LL, et al. Avaliação da ação do laser não-cirúrgico sobre a microcirculação de rãs. *Braz Oral Research* 2003;17(2):58.
 18. Núñez SC, Nogueira GEC, Ribeiro MS, Garcez AS, Lage-Marques JL. He-Ne laser effects on blood microcirculation during wound healing: a method of *in vivo* study through laser Doppler flowmetry. *Laser Surg Med* 2004;35:363-8.
 19. Abbott FV, Ocvirk R, Najafee R, Franklin KBJ. Improving the efficiency of the formalin test. *Pain* 1999;83:561-9.
 20. Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 1990;40:229-38.
 21. Saddi GM, Abbott FV. The formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties. *Pain* 2000;89:53-63.
 22. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38:347-52.
 23. Soto VJ, Arguelles CF, Leefmans FJA. Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain* 2005;114:231-8.
 24. Taylor BK, Peterson MA, Roderick RE, et al. Opioid inhibition of formalin-induced changes in plasma extravasation and local blood flow in rats. *Pain* 2000;84:263-70.
 25. Hawkins D, Abrahamse H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2005;23(3):251-9.
 26. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low intensity laser irradiation stimulated cell proliferation *in vitro*. *Laser Surg Med* 2005;36:36-8.
 27. Pozza DH, Gerhardt de Oliveira M, Pinheiro ALB, Carneiro R, Souza APC, Carvalho C. Low-level laser therapy as an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. *Braz Dental Journal* 2004;15(special issue):124.

Analgesia e Electroestimulação Cutânea

Ana Teresa Gaspar¹ e Filipe Antunes²

Resumo

O tratamento da dor é uma preocupação da Medicina actual e exige uma abordagem multidisciplinar. Dentro dos recursos da Medicina Física e de Reabilitação, o TENS (*transcutaneous electrical nerve stimulation*) é actualmente uma das modalidades de electroterapia mais usadas na analgesia. A selecção criteriosa dos parâmetros de prescrição de TENS é factor fundamental para maximizar o seu potencial analgésico. A eficácia numa vasta gama de contextos dolorosos aliada a uma boa tolerabilidade e escassos efeitos adversos, tornam o TENS numa mais-valia da Medicina Física e de Reabilitação na complexa luta contra a dor.

Palavras-chave: Electroterapia. TENS.

Abstract

Pain management is one of the major concerns in Physical Medicine and Rehabilitation (PMR). Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) is actually one of the most important therapeutic keys in PMR, mainly when leading with Pain. In this article we review the prescription of TENS, regarding the different parameters of use, in order to maximize the best results possible. TENS is a tolerable and secure therapeutic key against Pain. (Dor. 2007;15(2):9-12)

Corresponding author: Filipe Antunes, antunes.filipe@netcabo.pt

Key words: Electrotherapy. TENS.

A dor é uma preocupação da Medicina actual comum a clínicos e investigadores. Particularmente a dor crónica arrasta consigo um tremendo prejuízo da qualidade de vida e encargos económicos e sociais muitas vezes difíceis de suportar pelo indivíduo, pela sua família e comunidade e, em última instância, por todos nós enquanto sociedade. O tratamento da dor quase nunca é fácil e exige uma abordagem multidisciplinar¹.

Dentro dos recursos da Medicina Física e Reabilitação, a electroterapia tem propriedades e acções sobre o organismo humano que podem ser usadas no tratamento da dor². Ao contrário de outros agentes físicos (como o frio ou o calor), que têm uma acção predominantemente local (tecidual), a electroterapia tem potencialidades de modulação sistémica da dor³.

Designa-se por analgesia eléctrica a acção analgésica produzida mediante a estimulação eléctrica do sistema nervoso periférico ou central².

A analgesia eléctrica periférica é considerada uma das modalidades terapêuticas mais inócuas no tratamento da dor².

Existem vários tipos de correntes eléctricas com potenciais efeitos analgésicos. O TENS tem gerado um interesse crescente nas últimas décadas, sendo actualmente a modalidade mais utilizada quando se equaciona o uso de electroterapia no tratamento da dor, incluindo a dor crónica⁴.

Os mecanismos exactos de actuação do TENS permanecem envoltos em alguma controvérsia, mas a sua modulação nas aferências sensitivas dolorosas parece estabelecer-se a três níveis^{2,4-7}:

- *Bloqueio medular*: as vias de condução rápida (fibras A β e A γ) veiculando estímulos sensoriais não-nociceptivos são prioritariamente conduzidas e integradas a nível medular (na substância gelatinosa de Rolando) actuando por inibição competitiva com as fibras de condução lenta transmissoras da dor (sendo esta a base da teoria de *gate control* postulada em 1965 por Melzack e Wall)^{2,4}.
- *Bloqueio supra-segmentar*: há activação dos sistemas inibitórios descendentes e consequente libertação de opióides endógenos; um efeito adicional documentado é o aumento dos níveis plasmáticos de este-

¹Interna Complementar de MFR

²Assistente Hospitalar de MFR

Hospital de São Marcos

Braga, Portugal

E-mail: medfisi@hsmbraga.min-saude.pt

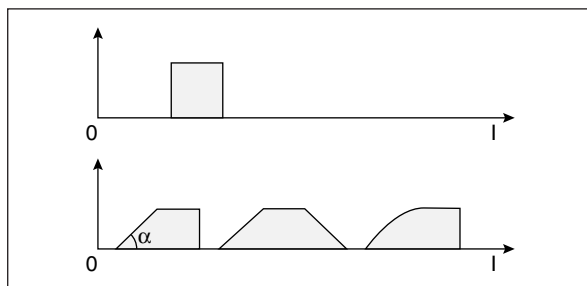


Figura 1. Num impulso rectangular (representado à esquerda), partindo de zero, a intensidade cresce rapidamente até um valor previamente definido, essa intensidade é mantida por determinado período de tempo, e depois decresce abruptamente novamente até ao valor zero. Nos impulsos não-rectangulares (representados à direita), a sucessão de eventos é semelhante mas a subida e descida da intensidade ocorre de forma progressiva, linear ou exponencial.

róides (podendo este facto explicar o interesse do TENS na aceleração de processos de cicatrização, nomeadamente no pós-operatório)⁴ e de serotonina (o que serve de fundamento aos efeitos anti-espástico e anti-emético descritos para o TENS⁴, para além da modulação da dor uma vez que se trata de um mediador inibitório)¹.

- **Bloqueio antidrómico**^{2,4,5}: a estimulação das fibras A δ e C retarda a condução do estímulo nociceptivo e a sua integração a nível medular.

O TENS pode ser uma possibilidade terapêutica na dor praticamente em todos os contextos etiológicos^{2,4,5}. A adequação das características físicas do estímulo a usar em cada caso concreto é essencial para maximizar a sua eficácia analgésica⁵.

Quanto aos parâmetros da corrente a ser prescrita há necessidade de definir:

- O tipo de corrente.
- A duração do impulso.
- A frequência de estimulação.
- A intensidade da corrente.

As correntes eléctricas podem ser classificadas consoante vários parâmetros². Quanto à sua polaridade, uma corrente é unidireccional se a polaridade se mantém constante ou, quando tal não se verifica, designa-se alterna². No TENS usam-se correntes alternas, sendo necessário definir ainda a forma da corrente. As opções incluem correntes bifásicas/monofásicas e com ondas rectangulares/não-rectangulares^{2,5}.

A designação da forma de um impulso eléctrico deriva da sua representação gráfica² (Fig. 1).

Quando em ambos os pólos, positivo e negativo, a corrente apresenta uma onda rectangular alterna, o estímulo é designado por bifásico². A onda bifásica diz-se não-prevalente (simétrica) quando a onda rectangular alterna tem o mesmo valor, não existindo assim polaridade. Se uma das componentes (negativa ou positiva)

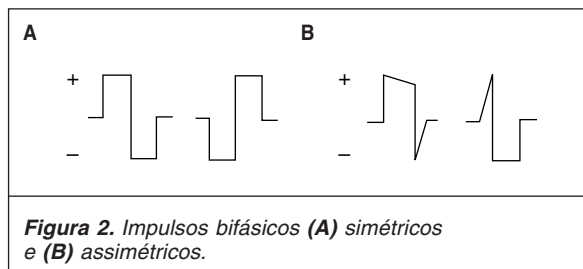


Figura 2. Impulsos bifásicos (A) simétricos e (B) assimétricos.

prevalece sobre a oposta, a onda bifásica diz-se prevalente (ou assimétrica)².

A escolha mais comum do tipo de corrente para TENS recai sobre a corrente bifásica, rectangular com onda assimétrica²⁻⁶, que pelas suas características apresenta reduzidos efeitos de polaridade, anulando praticamente os riscos inerentes ao uso de uma corrente eléctrica (nomeadamente o de queimadura). Tem efeito analgésico mais prolongado, embora com o risco de desenvolvimento de tolerância⁴⁻⁶. Contrariamente, a corrente monofásica de ondas não-rectangulares, não sendo apolar, é pior tolerada e produz alívio da dor de menor duração^{2,4}.

A duração do impulso pode variar entre 50 a 300 msec^{2,5}. Quanto maior a duração, maior é a disponibilidade de recrutamento de unidades motoras⁵. Este facto é pouco relevante quando o TENS é usado com objectivos analgésicos, mas assume importância quando o uso tem outros objectivos, nomeadamente o fortalecimento muscular. A duração de impulso mais frequentemente utilizada anda na ordem dos 100 msec^{2,4,5}.

Já a frequência de estimulação é um parâmetro de relevo na prescrição de TENS para analgesia⁷.

As frequências baixas (entre 2 e 10 Hz) têm como acção predominante a activação das vias inibitórias descendentes e a libertação de opióides endógenos^{4,5,7}. Produzem analgesia prolongada e com baixa tolerância, podendo contudo provocar contracções musculares desconfortáveis.

As frequências altas (entre 80 e 150 Hz) actuam preferencialmente por bloqueio medular com priorização das vias de condução rápida. O efeito analgésico tem início rápido, mas pode haver desenvolvimento precoce de fenómenos de tolerância e perda de eficácia analgésica^{4,5,7}.

A intensidade da corrente é outro parâmetro subjectivo utilizado na prescrição. Depende do doente, pelo que tal implica a colaboração do mesmo na aplicação de TENS. Para causar o mínimo de desconforto ao doente quando se usam frequências de corrente alta, a intensidade inicial aplicada deve ser baixa de forma a transmitir apenas sensações parestésicas confortáveis. Noutras situações, em que necessitamos de intensidades mais elevadas, vamos despertar no doente sensações claras de passagem de corrente eléctrica mais ou menos desagradáveis, ou mesmo, em condições excepcionais e de curta

duração, contracções musculares e/ou fasciculações^{2,15}.

Definidos os parâmetros da corrente, podemos considerar^{4,5}:

- TENS tipo C (*conventional*).
- TENS tipo A (*acupuncture like*).
- TENS tipo B (*burst*).

O TENS tipo C utiliza correntes de alta frequência e baixa intensidade de estímulo^{2-5,8}. Tal como anteriormente exposto, o uso de correntes de maior frequência está associada a início rápido de acção e possibilidade de acomodação rápida pelo que a sua indicação teórica é na dor aguda⁴⁻⁶. No entanto, na prática é usado na dor crónica pela sua excelente tolerabilidade. As sessões diárias podem ter duração variável (desde 30 minutos até várias horas) consoante a situação e o efeito produzido^{4,5}.

No TENS tipo A utiliza-se corrente de baixa frequência, que actua preferencialmente por activação dos sistemas inibitórios descendentes com libertação de opióides endógenos. A acomodação é difícil e a duração da analgesia valorizável^{3-5,8,9}, mas tem pior tolerabilidade porque pode provocar contracções musculares dolorosas²⁻⁶. É usado como alternativa, quando o TENS tipo C não é eficaz em patologia subaguda ou crónica⁵. O mecanismo de acção predominante explica o interesse deste tipo de TENS na dor crónica em doentes com baixos níveis endógenos de endorfinas (como ocorre após consumo prolongado de opiáceos)³.

Existe um subtipo S, em que a emissão dos impulsos eléctricos é feita em salvas de cinco a sete impulsos, que é habitualmente melhor tolerado. Tem indicação primária na dor aguda de origem traumática^{5,6}.

O TENS tipo B utiliza correntes de alta frequência. O efeito decorre principalmente da sua acção antidrómica, exigindo para tal estímulos de breve duração (30 seg) e de grande intensidade³⁻⁵. Usado na dor intensa, aguda e localizada, habitualmente é mal tolerado, havendo relatos frequentes de crises hiperálgicas após as sessões de tratamento³⁻⁵.

A resposta analgésica ao TENS é individualizada. É necessária uma prescrição adequada a cada caso e a cada indivíduo³⁻⁵.

Existem comercializados vários modelos de aparelhos de TENS mas a sua composição básica é semelhante: um estimulador (produtor de corrente eléctrica), cabos de condução e eléctrodos para aplicação na pele^{4,5}. Existem aparelhos de pequenas dimensões, que alguns doentes devidamente instruídos manipulam em situações de dor crónica no domicílio e até mesmo durante as suas actividades usuais^{10,11}. Esta possibilidade de uso mais prolongado de pequenos aparelhos portáteis representa uma mais-valia não desprezível na qualidade de vida do doente com dor crónica.

Os eléctrodos devem ser colocados em zona de pele seca e íntegra, preferencialmente sem

pêlos^{5,6}. É aconselhada a aplicação de um gel entre os eléctrodos e a pele (o que reduz a resistência cutânea à progressão do estímulo eléctrico)^{2,4-6}. A sessão deve ser iniciada com estímulo de intensidade baixo, aumentando-se progressivamente até surgir o efeito pretendido (parestésias se se está a usar TENS tipo C ou dor se se está a aplicar TENS tipo B).

Após cerca de 30 minutos, a dor deve ter-se reduzido para metade^{5,9}. Esta apreciação de carácter quantitativo é difícil mas, após este período de tempo, o doente deve referir pelo menos que sentiu algum alívio das queixas álgicas. Se tal não ocorre, devem ser revistos os parâmetros de prescrição ou o posicionamento dos eléctrodos na pele²⁻⁵.

Não existem regras fixas para a prescrição do local de aplicação dos eléctrodos. Muitas vezes é dito que esta decisão exige mais arte que ciência⁴. Certo é que o efeito analgésico que se obterá depende da localização dos eléctrodos²⁻⁶. A aplicação mais comum é em redor da zona dolorosa (um eléctrodo sobre a zona mais dolorosa e o outro distalmente) mas, dependendo da patologia e do tipo de TENS, os eléctrodos podem ser posicionados sobre o trajecto de um nervo periférico, em determinados pontos-gatilho, em pontos de acupunctura ou até contralaterais à zona dolorosa²⁻⁵.

As contra-indicações absolutas ao uso de TENS são relativamente escassas e incluem: portadores de *pacemakers on demand* (por risco de interferência com o funcionamento dos mesmos)¹², aplicação torácica em doentes com arritmias cardíacas documentadas (dado o potencial de interferência com o ritmo cardíaco)^{4,5,12}, aplicação cervical sobre a região do seio carotídeo e grandes vasos (por possibilidade de hipotensão sintomática mediada por excitabilidade vasovagal)^{4,5}, aplicação em zonas de anestesia cutânea (o que aumenta o risco de queimaduras)^{2,4,5}, o uso na criança ou no indivíduo com défice cognitivo (pela dificuldade na valorização do estímulo)^{4,5} e os três primeiros meses de gestação⁴⁻⁶ (por precaução dado o desconhecimento do potencial teratogénico). Na grávida, após o terceiro trimestre de gestação, a aplicação de TENS (fora do contexto da analgesia de parto) não está contra-indicada desde que não seja feita sobre a região abdominal ou pélvica (pelo risco de excitabilidade da musculatura uterina). Quanto aos implantes metálicos, quando se usa corrente apolar, o risco do uso de TENS é mínimo^{5,6}. Contudo, a presença de implantes de grandes dimensões é considerada uma contra-indicação relativa se a sua localização for próxima à zona de aplicação de TENS.

Os efeitos adversos decorrentes da aplicação de TENS são escassos e infrequentes, o que representa uma vantagem importante sobre outros métodos analgésicos, nomeadamente farmacológicos. Com o recurso a corrente bifásica, o risco de queimadura química é muito reduzido.

Os casos descritos na literatura estiveram associados ao uso de eléctrodos pequenos, intensidade de corrente elevada e reduzida distância entre os dois eléctrodos^{2,6}. Neste contexto importa referir que não é recomendada uma distância entre os eléctrodos inferior a 5 cm². Por vezes surge eritema local por hipersensibilidade aos constituintes dos materiais dos eléctrodos, do gel ou do adesivo. Este tipo de reacção costuma ser autolimitada^{2,4,5}.

As desvantagens atribuídas ao TENS incluem a necessidade de aplicações regulares e por vezes durante períodos longos durante o dia, o desenvolvimento de tolerância e a difícil aplicação em crianças ou adultos com défices cognitivos (pela falta de colaboração na valorização subjectiva do estímulo)⁵.

As vantagens são várias. Para além dos aspectos já focados de boa tolerabilidade (principalmente quando se usa TENS convencional), reduzidos efeitos adversos e poucas contra-indicações, é possível em muitos casos reduzir o consumo de fármacos^{5,10,11} e o facto de solicitar a participação activa do doente representa um factor importante na modulação da dor, que tem uma componente psicológica nunca desprezável.

Os muitos estudos que ao longo dos anos têm tentado demonstrar a eficácia do TENS na analgesia continuam a ser postos em causa, o que se compreende pela dificuldade (ou até mesmo impossibilidade) de desenhar estudos totalmente aleatórios e duplamente cegos¹³.

Não querendo assumir o TENS como uma panaceia para todo o tipo de dor, o que de facto não é, a verdade é que a sua eficácia inicial e a longo prazo tem sido consistentemente relatada em numerosos trabalhos realizados nas últimas

décadas numa vasta gama de contextos dolorosos^{13,14}. Também a nossa percepção na prática clínica é de que o TENS constituiu uma melhoria da Medicina Física no seu contributo para a complexa luta contra a dor.

Bibliografia

1. Wall PD, Melzack R. Textbook of pain. 4.^a ed. New York: Churchill Livingstone; 1999. p. 1341-51.
2. Toro JR. Electroterapia e electrodiagnostico. 2.^a ed. Valladolid; 1996. p. 41-5.
3. Allen RJ. Physical agents used in the management of chronic pain by physical therapists. Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America 2006 Maio;17(2):326-30.
4. Delisa J, et al. Physical Medicine & Rehabilitation. 4.^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 262-4;436-7.
5. Pinheiro JP. Medicina de Reabilitação em Traumatologia do Desporto. Lisboa: Editorial Caminho; 1998. p. 93-9.
6. Cameron MH. Physical agents in rehabilitation: from research to practice. Philadelphia: W.B. Saunders; 2003.
7. Walsh DM, Lowe AS, McCormack K, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation: effect on peripheral nerve conduction, mechanical pain threshold, and tactile threshold in humans. Arch Phys Med Rehabil 1998;79(9):1051-8.
8. Chesterton LS, Barlas P, et al. Sensory stimulation (TENS: effects of parameter manipulation on mechanical pain threshold in healthy human subjects. Pain 2002;99:253-62.
9. Chesterton LS, Foster NE, et al. Effects of TENS frequency, intensity and stimulation site parameter manipulation on pressure pain thresholds in healthy human subjects. Pain 2003;106(1-2):73-80.
10. Fishbain DA, Chabal C, Abbot A, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation treatment outcome in long term users. Clin J Pain 1996;12:201-14.
11. Ghoname ES, Craig WF, et al. The effect of stimulus frequency on the analgesic response to percutaneous electrical nerve stimulation in patients with chronic low back pain. Anesth Analg 1999 Abr; 88(4):841-6.
12. Chen D, Philip M, Philip PA, et al. Cardiac pacemaker inhibition by transcutaneous nerve stimulation. Arch Phys Med Rehabil 1990; 71:27-30.
13. Carroll D, Moore RA, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for chronic pain. 2001.
14. Johnson MI. The clinical effectiveness of TENS in pain management. Critical Reviews in Physical and Rehabilitation Medicine 2000; 12(2):131-49.
15. Jules MR, Serge HR, Steven LW. The Rehabilitation Specialist's Handbook. 2.^a edition. F.A. Davis; 1998. p. 916.

Hipertensão e Hipoalgesia: Papel do Bolbo Raquidiano Ventrolateral Caudal e do Sistema GABAérgico Espinhal

Dora Pinho^{1,4}, Manuela Morato^{1,3}, Teresa Sousa^{1,4}, José Marques Lopes^{1,4}, Isaura Tavares^{2,4} e António Albino-Teixeira^{1,4}

Resumo

A infusão contínua durante sete dias do antagonista dos receptores de adenosina 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina (DPSPX) causa, no rato, hipertensão sustentada com activação do sistema renina-angiotensina. Uma vez que a hipertensão tem sido associada a hipoalgesia em estudos clínicos e experimentais, propo-

semo-nos:

- Estudar o envolvimento da região lateral do bolbo raquidiano ventrolateral caudal (VLMIat) no processo de instalação deste modelo de hipertensão e na hipoalgesia eventualmente associada.
- Avaliar a participação do sistema GABAérgico espinhal na associação entre hipertensão e hipoalgesia.

Injectou-se estereotaxicamente soro fisiológico ou ácido quinolínico no VLMIat esquerdo de ratos Wistar machos infundidos intraperitonealmente com soro fisiológico ou DPSPX. A pressão arterial foi determinada pelo método não-invasivo de medição na cauda, a cada dois dias. Como está descrita uma correlação positiva entre a estimulação algica e a expressão de *c-fos* induzida por estímulo nócico mecânico, foi usada a quantificação por imuno-histoquímica deste marcador de activação neuronal para avaliar o envolvimento do VLMIat e a participação do sistema GABAérgico espinhal (protocolo de dupla marcação). O aumento sustentado da pressão arterial (22,1 mmHg; $p < 0,001$) observado nos ratos infundidos com DPSPX foi revertido a partir do dia 6 nos animais lesionados no VLMIat. Nos ratos tratados com DPSPX observou-se também uma diminuição da expressão da proteína Fos nas lâminas superficiais (I-II) e profundas (III-VII) do corno dorsal. Nestes ratos, verificou-se uma menor percentagem de neurónios duplamente marcados para a proteína Fos e para o receptor GABA_B no corno dorsal superficial e observou-se prevenção da diminuição da expressão da proteína Fos por lesão do VLMIat com ácido quinolínico. Os resultados deste trabalho sugerem que a integridade do VLMIat é fundamental para o desenvolvimento da hipertensão causada pelo DPSPX. Este modelo experimental de hipertensão está associado a hipoalgesia, a qual se acompanha de menor activação de neurónios nociceptivos espinhais, por inibição descendente exercida pelo VLMIat. Além disso, este estudo demonstra, pela primeira vez, que durante a hipertensão se verifica uma diminuição da expressão de receptores GABA_B em neurónios nociceptivos espinhais, provavelmente devido a alterações no sistema inibitório GABAérgico local.

Palavras-chave: Hipertensão. Hipoalgesia. 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina. *c-fos*. Bolbo raquidiano ventrolateral caudal. Sistema GABAérgico espinhal.

¹Instituto de Farmacologia e Terapêutica
Faculdade de Medicina
Universidade do Porto, Portugal

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

³Departamento de Farmacologia
Faculdade de Farmácia
Universidade do Porto, Portugal

⁴Instituto de Biologia Molecular e Celular
Universidade do Porto, Portugal
E-mail: albinote@med.up.pt

Abstract

Continuous infusion, for 7 days, of the adenosine receptor antagonist 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxanthine (DPSPX), in Rat, causes sustained hypertension with activation of the renin-angiotensin system. Since hypertension has been associated with hypoalgesia both in clinical and experimental studies, we decided to:

- Investigate the involvement of the lateralmost region of the caudal ventrolateral medulla (VLMLat) in the installation of this model of hypertension and in the hypoalgesia eventually associated.
- Evaluate the participation of the spinal GABAergic system in the association between hypertension and hypoalgesia.

Either saline or quinolinic acid were stereotaxically injected into the left VLMLat of male Wistar rats infused intraperitoneally with either saline or DPSPX. Blood pressure was determined by non-invasive tail-cuff measurements every other day. Based on the positive correlation between algic stimulation and noxious-evoked expression of the *c-fos* protooncogene in spinal cord neurons, we used this marker of nociceptive activation of spinal neurons to evaluate the involvement of the spinal GABAergic system and the caudal ventrolateral medulla (VLM). A sustained increase in blood pressure (22,1 mmHg; $p < 0,001$) observed in DPSPX-infused rats was reverted from day 6 onwards in VLMLat-lesioned animals. In DPSPX-treated rats, a decrease in *c-fos* expression was also observed both in superficial (I-II) and deep dorsal horn laminae. In these rats a lower percentage of neurons doubly labelled for *c-fos* and GABA_B receptor was observed in the superficial dorsal horn, and the decrease of *c-fos* expression upon VLMLat lesioning was prevented. These results suggest that the integrity of VLMLat is fundamental to the development of hypertension caused by DPSPX. This model of experimental hypertension is associated with hypoalgesia, which is accompanied by lower activation of spinal nociceptive neurons by descending inhibition exerted by the VLMLat. Furthermore, this work shows that a decrease in GABA_B receptors in nociceptive spinal neurons occurs during hypertension, probably due to changes in the local GABAergic inhibitory system. (Dor. 2007;15(2):13-21)

Corresponding author: António Albino-Teixeira, albinote@med.up.pt

Key words: Hypertension. Hypoalgesia. 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxanthine. *c-fos*. Caudal ventrolateral medulla. Spinal GABAergic system.

Introdução

A hipertensão tem sido associada a menor sensibilidade à dor aguda em estudos clínicos e experimentais¹⁻³. Esta associação entre hipertensão e hypoalgesia depende, nos modelos experimentais, de mecanismos supra-espinhais, dado que é atenuada pelo bloqueio da medula espinhal pelo frio⁴. Alguns centros supra-espinhais reguladores das funções nociceptiva e cardiovascular partilham a localização anatómica, podendo mediar a hypoalgesia associada à hipertensão.

O bolbo raquidiano ventrolateral caudal (CVLM) é importante na regulação cardiovascular⁵. Aumentos da pressão arterial activam neurónios do CVLM através de aferentes do núcleo do tracto solitário, com subsequente inibição da região vasopressora bolbo raquidiano ventrolateral rostral⁶ (RVLM). O CVLM inclui esta região depressora «clássica» e uma área pressora caudal⁷⁻⁹, anatomicamente muito próximas, favorecendo a sobreposição parcial de populações neuronais^{10,11}. Os neurónios do CVLM activados por aumentos da pressão arterial localizam-se na sua região mais lateral (VLMLat), uma região de formação reticular localizada entre o núcleo reticular lateral e o núcleo espinhal do trigémio, *pars caudalis*. Apesar da sua importância na regulação cardiovascular, o papel do CVLM no desenvolvimento da hipertensão só foi avaliado

em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), em estudos de curta duração, sob anestesia e numa fase de hipertensão já instalada. Nestas condições, verifica-se uma menor inibição do RVLM pelo CVLM¹²⁻¹⁴. Em condições fisiológicas, o papel do CVLM no processo de instalação da hipertensão não está caracterizado.

O CVLM é igualmente importante na regulação nociceptiva. O VLMLat participa na hypoalgesia associada à hipertensão causada por coarctação cirúrgica da artéria renal^{15,16}, o que reforça o reconhecimento do duplo papel desta região bulbar na regulação nociceptiva e cardiovascular¹⁷.

Na hypoalgesia associada à hipertensão observa-se inibição da transmissão nociceptiva espinhal. Em três modelos distintos de hipertensão – SHR¹⁸, coarctação cirúrgica da artéria renal^{15,19} e inibição da sintetase do monóxido de azoto¹⁹ – observa-se diminuição das repostas nociceptivas espinhais, quer por electrofisiologia¹⁸, quer pela detecção imuno-histoquímica da expressão de *c-fos*^{15,19}.

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é importante na modulação da dor no corno dorsal da medula espinhal²⁰. Em situações de dor crónica²¹⁻²³ há aumento da inibição GABAérgica espinhal mediada por receptores GABA_B²⁴⁻²⁶. Os mecanismos subjacentes à inibição espinhal observada na hypoalgesia associada à hipertensão não estão caracterizados, podendo o sistema GABAérgico espinhal ter um papel importante.

No rato, a infusão contínua, durante sete dias, do antagonista não-selectivo dos receptores da adenosina 1,3-dipropil-8-sulfopenilxantina (DPSPX) causa hipertensão sustentada, com:

- Elevação moderada da pressão arterial²⁷.
- Activação do sistema renina-angiotensina^{28,29}.
- Alterações marcadas na morfologia cardiovascular²⁷.
- Disfunção endotelial³⁰.
- Alterações na reactividade vascular²⁸ e na neurotransmissão simpática³¹.
- Stress oxidativo^{32,33}.

O papel do VLMLat na hipertensão causada pelo DPSPX nunca foi avaliado, nem é conhecida a resposta à dor neste modelo de hipertensão. Neste contexto, é interessante verificar que ratinhos *knockout* para o receptor A_{2A} da adenosina são hipertensos e demonstram hipoalgesia em testes comportamentais de dor³⁴.

Os objectivos deste trabalho foram estudar, na hipertensão causada pelo DPSPX:

- O papel do VLMLat no desenvolvimento da hipertensão e na eventual hipoalgesia associada.
- O papel do sistema GABAérgico espinhal.

Materiais e métodos

Usaram-se ratos Wistar, machos, mantidos em condições constantes de luz (12 h luz/12 h escuro), temperatura (22 °C) e humidade relativa (60%), com água e comida *ad libitum*. As experiências foram realizadas de acordo com as recomendações da directiva 86/609/EEC do Conselho Europeu e as orientações éticas para o estudo de dor em animais³⁵.

Os animais foram treinados para avaliação da pressão arterial pelo método não-invasivo de medição na cauda. Após a avaliação basal procedeu-se, sob anestesia, à implantação intraperitoneal de minibombas osmóticas, para infusão contínua (sete dias) de soro fisiológico (grupos NT) ou DPSPX (90 µg⁻¹kg⁻¹h⁻¹; grupos HT). Na mesma altura (estudo 1) ou 10 dias depois (estudos 2 e 3), injectou-se estereotaxicamente³⁶ 0,3 µl de soro fisiológico (grupos S) ou de ácido quinolínico (180 mM; grupos QA) no VLMLat esquerdo dos ratos, sob anestesia. No final das experiências, os animais foram anestesiados, perfundidos e fixados com paraformaldeído. O bolbo raquidiano e a medula espinhal foram dissecados, pós-fixados e criopreservados em sacarose.

Papel do VLMLat na hipertensão causada pelo DPSPX (estudo 1)

Os ratos foram aleatoriamente distribuídos por quatro grupos: NT/S, HT/S, NT/QA e HT/QA. No dia 0, procedeu-se à colocação das minibombas osmóticas e à injeção estereotáxica. A pressão arterial foi determinada antes do dia 0 e em todos os dias pares seguintes, até ao dia 12. No final, os ratos foram perfundidos e o bolbo raquidiano recolhido. A análise estatística fez-se

por ANOVA bifactorial para determinações repetidas, seguida do teste Student-Newman-Keuls.

Papel do VLMLat na hipoalgesia associada à hipertensão causada pelo DPSPX (estudo 2)

Constituíram-se três grupos experimentais: NT/S, HT/S e HT/QA. Dez dias após a implantação das minibombas, os ratos foram injectados estereotaxicamente no VLMLat. Passadas 24 h, foram anestesiados e sujeitos a estimulação nóxica mecânica da coxa¹⁵ (2 h). A pressão arterial foi determinada no dia 0 e antes da estimulação nóxica. Imediatamente após a estimulação, os ratos foram perfundidos, tendo-se recolhido o bolbo raquidiano e a medula espinhal. Secções coronais do segmento espinhal L₂ foram processadas para detecção imuno-histoquímica expressão de *c-fos* (método ABC/DAB)¹⁵. Contaram-se os núcleos imunoreactivos presentes na substância cinzenta total, superficial (lâminas I-II) e profunda (lâminas III-VII) em 10 secções aleatórias de cada rato. Os resultados foram comparados por ANOVA para determinações repetidas, seguida do teste Tukey-Kramer.

Papel do sistema GABAérgico espinhal na hipoalgesia associada à hipertensão (estudo 3)

Dez dias após a implantação das minibombas osmóticas, quatro ratos de cada grupo (NT e HT) foram submetidos a estimulação nóxica, como descrito. Após perfusão e fixação, o segmento espinhal L₂ foi processado seguindo um protocolo imuno-histoquímico de marcação dupla³⁷, incluindo uma primeira reacção contra os receptores GABA_B (revelada pelo método ABC/DAB) e uma reacção posterior contra a proteína Fos (revelada por fosfatase alcalina-estreptavidina/*Fast Blue*). Os perfis de neurónios com marcação para a proteína Fos ou para o receptor GABA_B e os marcados duplamente foram contabilizados conforme descrito. Os resultados foram comparados pelo teste *t* de Student.

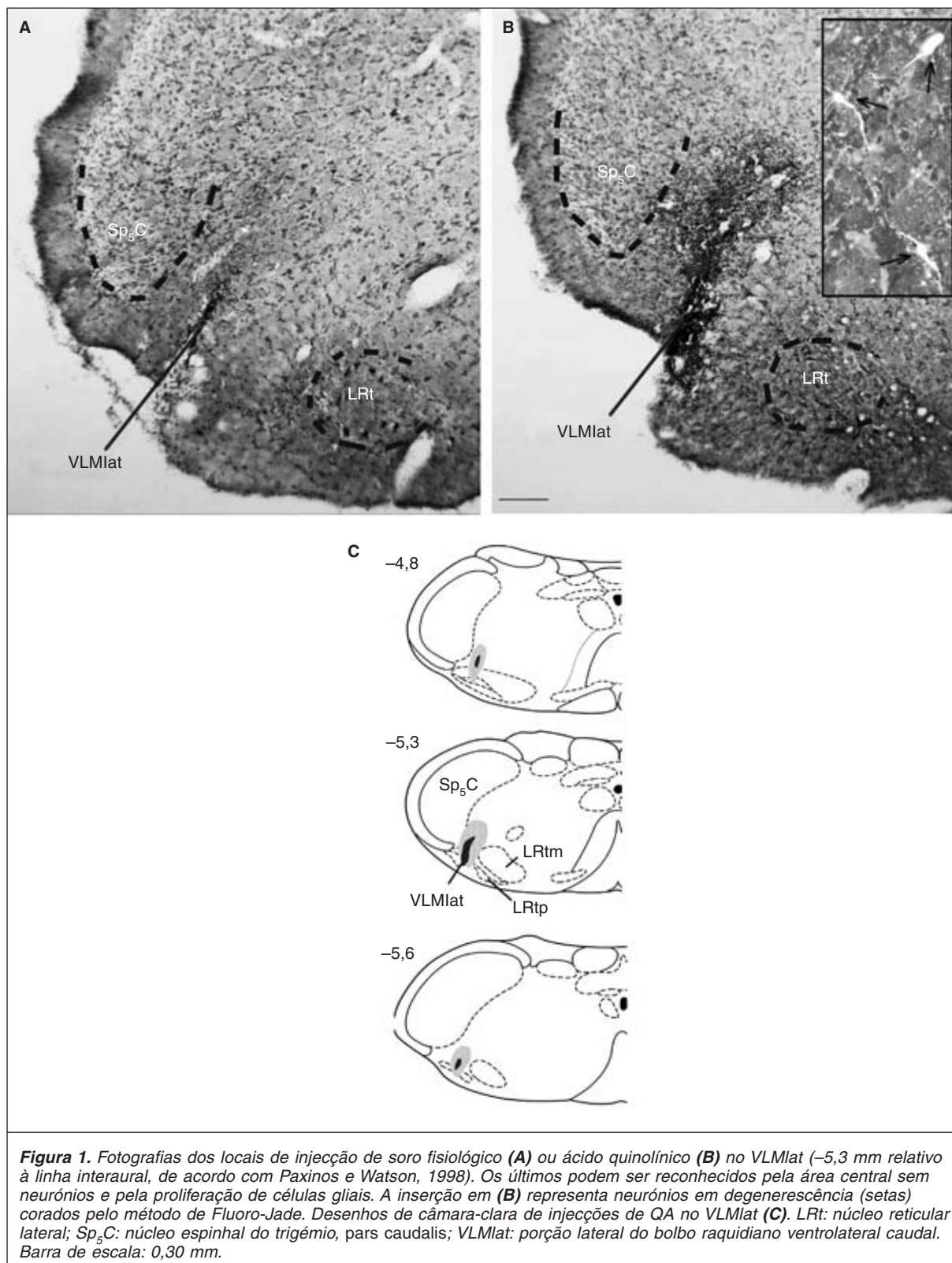
Histologia do bolbo raquidiano

Os locais das injeções estereotáxicas foram confirmados nas secções coronais de bolbo raquidiano, coradas por formol-tionina³⁸. A morte neuronal foi identificada usando o corante fluorescente Fluoro-Jade³⁹.

Resultados

Locais de injeção

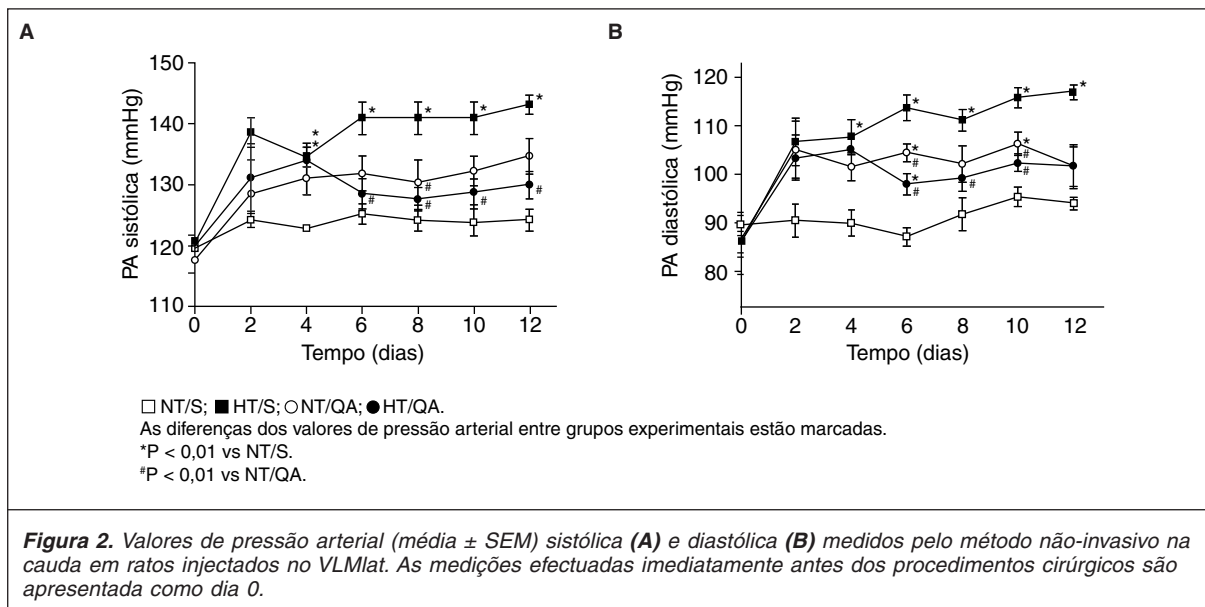
As alterações encontradas nos locais do bolbo raquidiano injectados com QA diferiam das observadas nos injectados com soro fisiológico (Figs. 1 A e B) pela destruição neuronal, confirmada pela coloração com Fluoro-Jade (Fig. 1 B, inserção), e pela proliferação glial. As lesões localizavam-se no VLMLat, não diferindo de rato para rato, e estendiam-se do pólo caudal da área postrema até à decussação das pirâmides (Fig. 1 C).



Papel do VLMIat na hipertensão causada pelo DPSPX (estudo 1)

A infusão de DPSPX causou aumento dos valores de pressão arterial sistólica e diastólica, em relação aos valores basais e em relação ao

grupo controlo (Fig. 2). A injeção de soro no VLMIat não alterou os valores de pressão arterial dos controlos (NT/S) nem o perfil tensional nos animais infundidos com DPSPX (HT/S). A lesão do VLMIat (HT/QA) atenuou o aumento da pressão arterial observado no grupo HT/S (Fig. 2).



Papel do VLMIat na hipoalgesia associada à hipertensão causada pelo DPSPX (estudo 2)

Os neurónios marcados para a proteína Fos distribuíram-se por toda a região dorsoventral do corno dorsal ipsilateral, com algumas células localizadas na lâmina VII (Figs. 3, 4 A e B). No grupo HT/S observou-se diminuição do número de neurónios imunorreactivos para Fos (Fig. 5). No grupo HT/QA não se observaram diferenças em relação ao grupo NT/S (Figs. 5 e 7 C).

Papel do sistema GABAérgico espinhal na hipoalgesia associada à hipertensão (estudo 3)

Os neurónios marcados duplamente para a proteína Fos e receptores GABA_B misturavam-se com neurónios que apresentavam imunoreactividade apenas para a proteína Fos ou para o receptor GABA_B (Fig. 6). A distribuição no corno dorsal dos neurónios imunorreactivos para a proteína Fos foi semelhante à descrita no estudo 2. Os neurónios imunorreactivos para o receptor GABA_B foram observados em todo o corno dorsal (Figs. 4 C e D), com ligeira prevalência nas

lâminas IV-V. Os neurónios marcados duplamente encontravam-se sobretudo nas lâminas I e IV-V (Figs 4 E e F).

No grupo HT observou-se diminuição do número de neurónios imunorreactivos para a proteína Fos no corno dorsal total e nas lâminas profundas (Fig. 7 A). O número de neurónios imunorreactivos para o receptor GABA_B no corno dorsal total foi semelhante entre os grupos NT e HT (Figs. 4 C e D). O número de neurónios marcados duplamente era menor no grupo HT (Fig. 7 B), quando se avaliou o corno dorsal total ou as lâminas I-II. A percentagem de neurónios imunorreactivos para a proteína Fos que expressavam o receptor GABA_B foi semelhante entre os grupos NT e HT. Contudo, a percentagem de neurónios imunorreactivos para o receptor GABA_B que expressavam a proteína Fos foi menor no grupo HT (Fig. 7 C), quando se avaliou o corno dorsal total ou as lâminas I-II.

Discussão

A inibição do CVLM está classicamente associada a aumento da pressão arterial, o que está

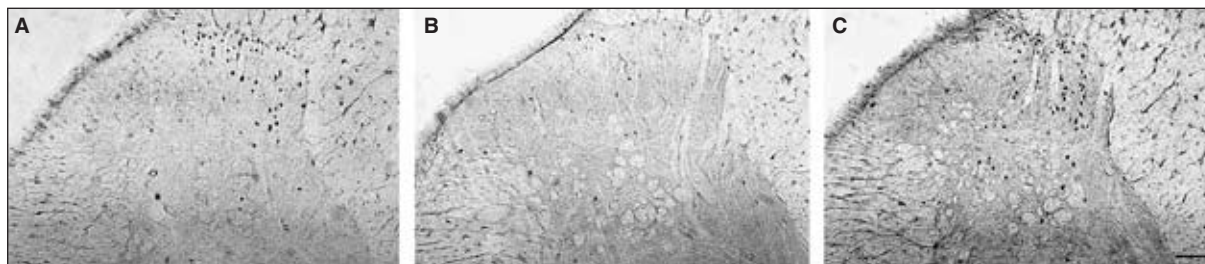


Figura 3. Fotografias de neurónios do corno dorsal imunorreactivos para a proteína Fos de animais NT/S (A), HT/S (B) e HT/QA (C), após estímulo nódico mecânico da pele. Os neurónios marcados para a proteína Fos apresentam um núcleo imunorreactivo castanho. Barra de escala: 0,10 mm.

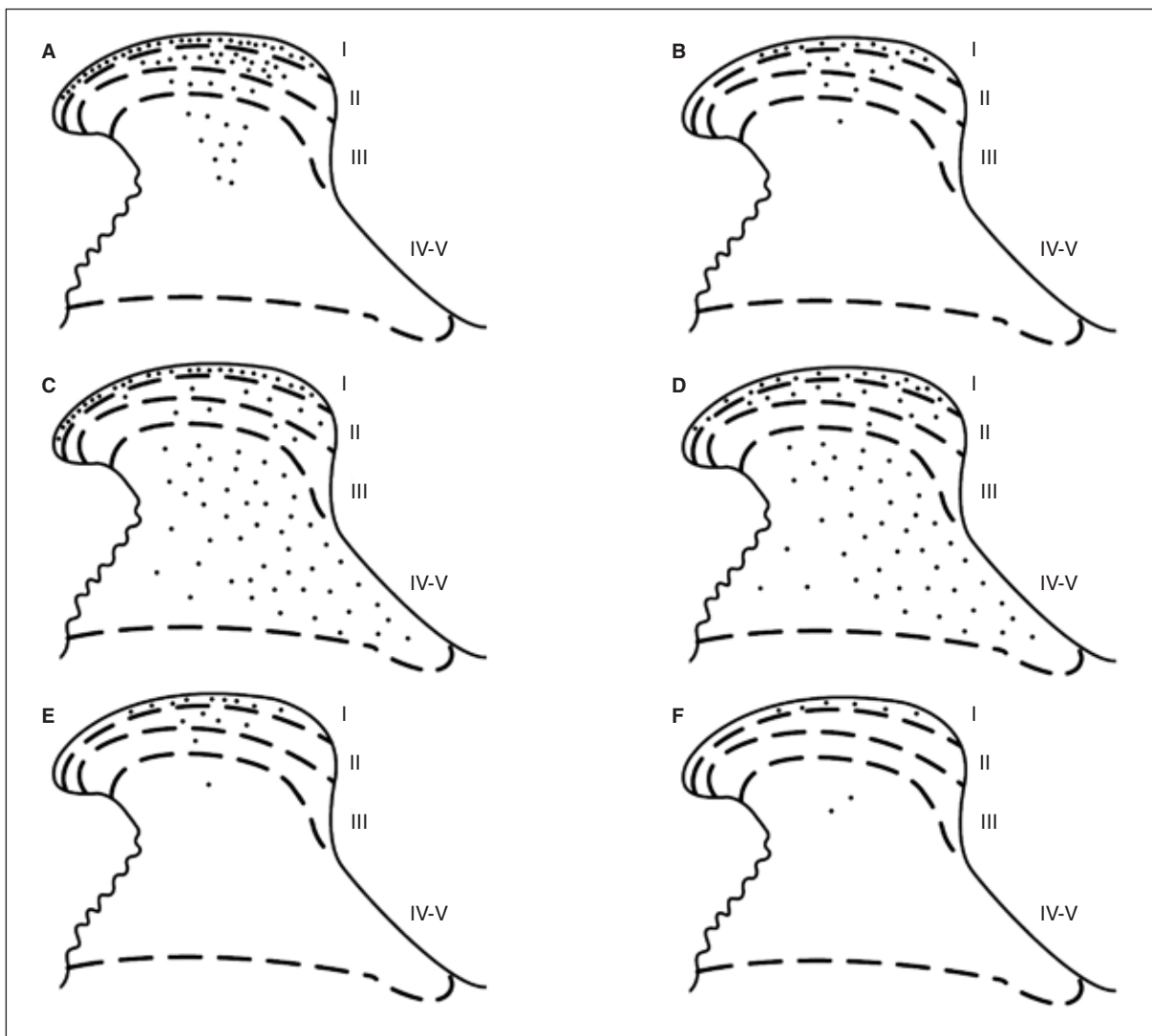


Figura 4. Diagramas mostrando exemplos da distribuição dos neurónios imunorreactivos para a proteína Fos (A, B), receptores GABA_B (C, D) ou duplamente marcados para Fos e GABA_B (E, F) em neurónios espinhais de ratos infundidos com soro fisiológico (A, C, E) e DPSPX (B, D, F). Cada símbolo representa um neurónio.

de acordo com o bloqueio dos barorreflexos e remoção da inibição dos neurónios excitatórios do RVLM^{40,41}. Neste trabalho, a lesão unilateral do VLMIat preveniu o desenvolvimento da hipertensão causada pelo DPSPX, mas não reduziu os valores de pressão arterial nos ratos infundidos com soro, sugerindo um papel modulatório desta região no controlo cardiovascular e evidenciando a sua importância no desenvolvimento da hipertensão.

Nos ratos com hipertensão causada pelo DPSPX, o estímulo nócico determina menor activação de neurónios espinhais. A expressão espinhal da proteína Fos constitui um bom indicador de activação neuronal⁴² e correlaciona-se com resultados de testes comportamentais⁴³. Este trabalho confirma que a hipertensão causada pelo DPSPX está associada a hipoalgesia, como observado noutros modelos experimentais de hipertensão¹. É de notar que por electrofisiologia

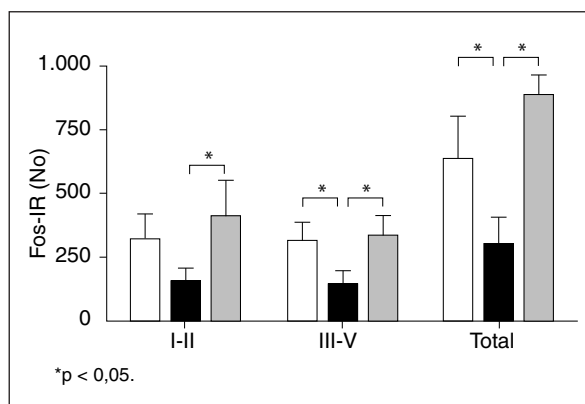


Figura 5. Número (média±SEM) de neurónios imunorreactivos para a proteína Fos na substância cinzenta superficial (I-II), profunda (III-V) e total (Total) do corno dorsal da medula espinhal, em ratos NT/S (barras vazias), HT/S (barras a cheio) e HT/QA (barras listadas).

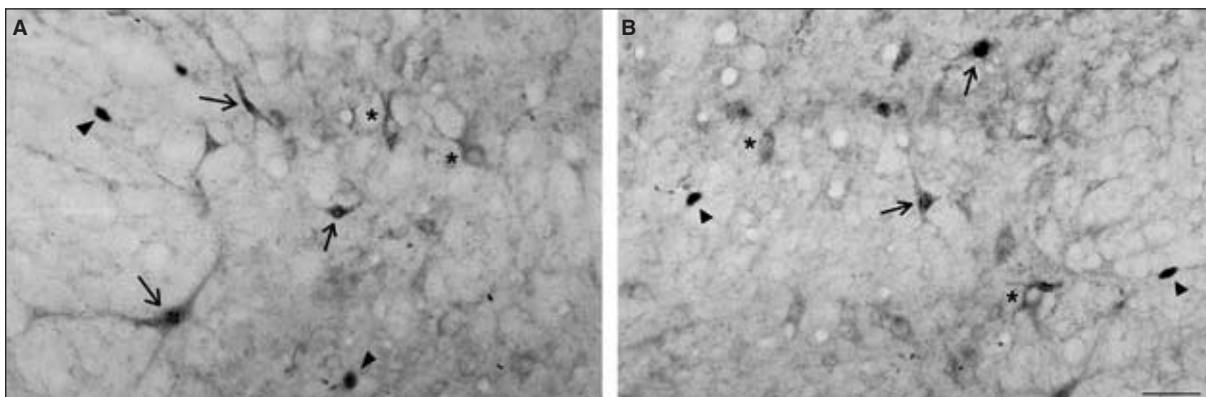


Figura 6. Fotografias de secções do corno dorsal espinhal após imunorreacção para a proteína Fos e receptores GABA_B de animais infundidos com soro fisiológico (A) e DPSPX (B). Os neurónios imunorreactivos apenas para Fos identificam-se pelo núcleo azulado (extremidades de setas), as células com imunorreacção apenas para receptores GABA_B apresentam precipitado castanho no pericário e dendrites (asteriscos) e os neurónios duplamente marcados para a proteína Fos e os receptores GABA_B reconhecem-se pelo precipitado castanho ao redor de núcleos azulados (setas). Barra de escala: 0,40 µm.

se detectou maior inibição de neurónios de largo espectro dinâmico¹⁸, que prevalecem nas lâminas profundas do corno dorsal⁴⁴, e que os estudos de quantificação de c-fos mostram também uma maior inibição nesta região espinhal^{15,19}. Estes resultados apoiam a hipótese de a hipoalgesia associada à hipertensão ser mediada por inibição da transmissão nociceptiva espinhal e

confirmam a maior inibição no corno dorsal profundo.

A lesão do VLMLat preveniu a inibição da expressão de c-fos, reforçando resultados prévios que mostraram que o VLMLat medeia a inibição de neurónios espinhais nociceptivos durante a hipertensão¹⁵. Estudos morfológicos pormenorizados demonstram que o VLMLat projecta para

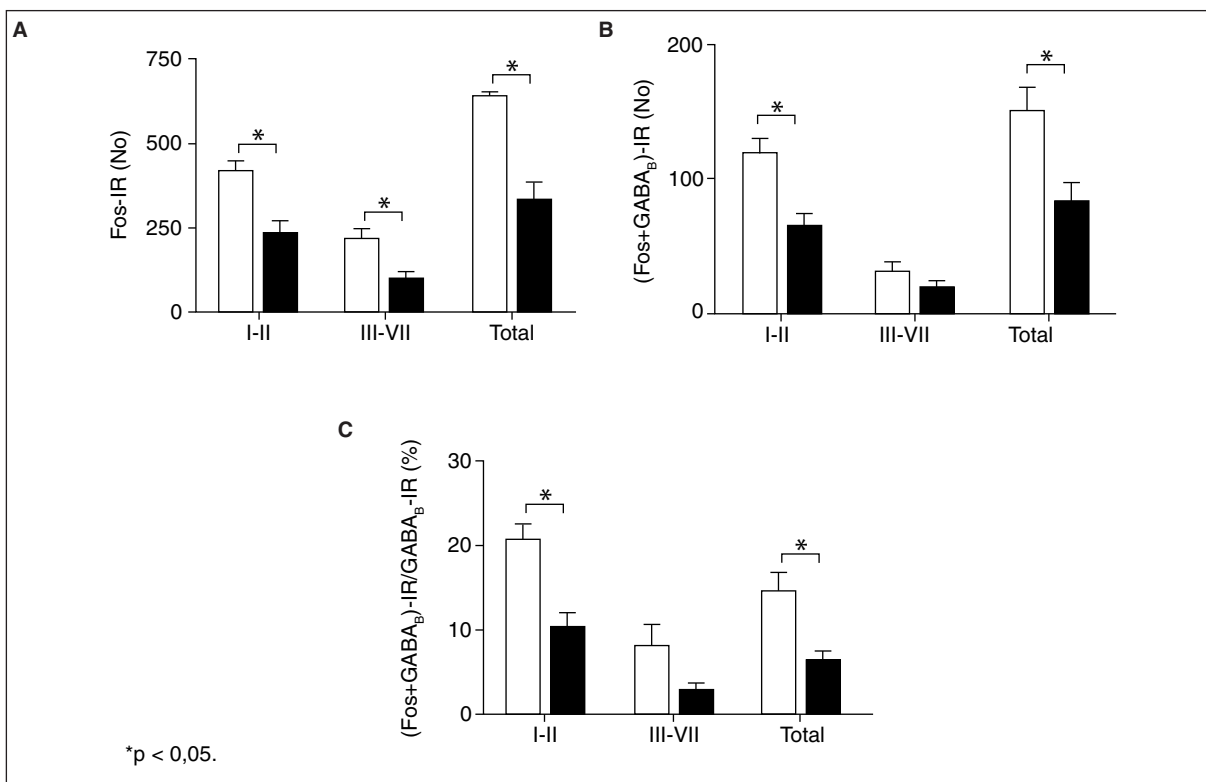


Figura 7. Número (média ± SEM) de neurónios imunorreactivos para a proteína Fos (A), duplamente marcados para Fos e receptores GABA_B (B) e percentagem (média ± SEM) de neurónios positivos para o GABA_B que expressam Fos (C) em ratos infundidos com soro fisiológico (barras vazias) e com DPSPX (barras a cheio). Apresentam-se os valores obtidos na substância cinzenta superficial (I-II), profunda (III-V) e total (Total) do corno dorsal da medula espinhal.

o corno dorsal espinhal através de uma via directa⁴⁵ e de vias polissinápticas conectando no grupo de células noradrenérgicas da ponte, A₅, e na medula rostroventromedial serotoninérgica^{15,16,46}.

Aumentos da pressão arterial activam neurónios do VLMLat, desencadeando hipoalgesia através de inibição directa e indirecta de neurónios espinhais¹⁵. Esta activação neuronal da região do VLMLat desencadeia diminuição compensatória da pressão arterial, por inibição do centro vasopressor do RVLM^{47,48}. Paralelamente, a activação do VLMLat induz analgesia intensa e prolongada⁴⁹. O envolvimento do VLMLat na hipoalgesia associada à hipertensão pode representar um mecanismo associado a reacções complexas de defesa que envolvem inibição da dor.

A menor activação de neurónios nociceptivos espinhais observada nos ratos com hipertensão causada pelo DPSPX está associada a diminuição do número de neurónios nociceptivos que expressam o receptor GABA_B. Tal facto não resulta da menor expressão da proteína Fos, uma vez que só foi observado no corno dorsal superficial enquanto a diminuição da expressão da proteína Fos ocorreu no corno dorsal profundo. De acordo com os nossos resultados, deve-se provavelmente a uma menor inibição GABAérgica da transmissão nociceptiva durante a hipertensão. Neste sentido, é de notar a correlação negativa entre a menor activação neuronal e a inibição GABAérgica no corno dorsal superficial *versus* profundo.

Em conclusão, além de confirmar a menor activação de neurónios nociceptivos espinhais na hipertensão experimental, este trabalho descreve pela primeira vez:

- A importância do VLMLat na instalação da hipertensão causada pelo DPSPX.
- A existência de alterações na modulação inibitória espinhal na hipertensão experimental.

Os resultados são convergentes e reforçam a hipótese de o VLMLat ser uma importante estrutura central de integração da hipoalgesia associada à hipertensão.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo projecto POC-TI/NSE/45409/2002 da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Bibliografia

1. Ghione S. Hypertension-associated hypalgesia. Evidence in experimental animals and humans, pathophysiological mechanisms, and potential clinical consequences. *Hypertension*. 1996;28:494-504.
2. Guasti L, Grimaldi P, Diolisi A, et al. Treatment with enalapril modifies the pain perception pattern in hypertensive patients. *Hypertension*. 1998;31:1146-50.
3. Zamir N, Segal M. Hypertension-induced analgesia: changes in pain sensitivity in experimental hypertensive rat. *Brain Res*. 1979;160:170-3.
4. Thurston CL, Randich A. Acute increases in arterial blood pressure produced by occlusion of the abdominal aorta induces antinociception: peripheral and central substrates. *Brain Res*. 1990;519:12-22.
5. Dampney RAL. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994;74:323-64.
6. Agarwal SK, Gelsema AJ, Calaresu FR. Inhibition of rostral VLM by baroreceptor activation is relayed through caudal VLM. *Am J Physiol*. 1990;258:R1271-8.
7. Horiuchi J, Dampney RAL. Evidence for tonic disinhibition of RVLM sympathoexcitatory neurons from the caudal pressor area. *Auton Neurosci*. 2002;99:102-10.
8. Natarajan M, Morrison SF. Sympathoexcitatory CVLM neurons mediate responses to caudal pressor area stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:364-74.
9. Sved AF, Ito S, Madden CJ. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Brain Res Bull*. 2000;51:129-33.
10. Sun W, Panneton WM. The caudal pressor area of the rat: its precise location and projections to the ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283:768-78.
11. Sun W, Panneton WM. Defining projections from the caudal pressor area of the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol*. 2005;482:273-93.
12. Smith JK, Barron KW. Cardiovascular effects of L-glutamate and tetrodotoxin microinjected into the rostral and caudal ventrolateral medulla in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*. 1990a;506:1-8.
13. Smith JK, Barron KW. The rostral and caudal ventrolateral medulla in young spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*. 1990b;506:153-8.
14. Smith JK, Barron KW. GABAergic responses in ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1990c;258:R450-6.
15. Tavares I, Almeida A, Albino-Teixeira A, Lima D. Lesions of the caudal ventrolateral medulla block the hypertension-induced inhibition of noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Eur J Pain*. 1997;1:149-60.
16. Tavares I, Lima D. The caudal ventrolateral medulla as an important inhibitory modulator of pain transmission in the spinal cord. *J Pain*. 2002;3:337-46.
17. Lima D, Albino-Teixeira A, Tavares I. The caudal medullary ventrolateral reticular formation in nociceptive-cardiovascular integration. An experimental study in the rat. *Exp Physiol*. 2002;87:267-74.
18. Randich A, Robertson JD. Spinal nociceptive transmission in the spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rat. *Pain*. 1994;58:169-83.
19. Tavares I, Albino-Teixeira A, Lima D. Hypertension inhibits noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Neuroreport*. 1995;6:1664-8.
20. Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17:457-62.
21. Castro-Lopes JM, Tavares I, Tolle 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.
22. Schuler V, Luscher C, Blanchet C, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA_B responses in mice lacking GABA_{B1}. *Neuron*. 2001;31:47-58.
23. Weng HR, Laird JM, Cervero F, Schouenborg J. GABA_A receptor blockade inhibits Aβ fibre evoked wind-up in the arthritic rat. *Neuroreport*. 1998;9:1065-9.
24. Aanonsen LM, Wilcox GL. Muscimol, gamma-aminobutyric acid A receptors and excitatory amino acids in the mouse spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;248:1034-8.
25. Castro AR, Bowery N, Castro-Lopes J. Baclofen and midazolam alter c-fos induction by peripheral noxious or innocuous stimulation in the spinal cord of normal and monoarthritic rats. *Neuropharmacology*. 1999;38:1775-88.
26. Sawynok J, LaBella FS. On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology*. 1982;21:397-403.
27. Albino-Teixeira A, Matias A, Polónia J, Azevedo I. Blockade of adenosine receptors causes hypertension and cardiovascular structural changes in the rat. *J Hypertension*. 1991;9 Suppl 6:S196-7.
28. Morato M, Sousa T, Guimarães S, Moura D, Albino-Teixeira A. The role of angiotensin II in hypertension due to adenosine receptors blockade. *Eur J Pharmacol*. 2002;455:135-41.
29. Sousa T, Morato M, Albino-Teixeira A. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents trophic and hypertensive effects of an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2002;441:99-104.

30. Paiva MQ, Santos MJ, Albino-Teixeira A. Endothelium-dependent vascular responses in 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxanthine (DPSPX) hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49:74-7.
31. Morato M, Pinho D, Sousa T, Guimaraes S, Moura D, Albino-Teixeira A. Pre- and postjunctional effects of angiotensin II in hypertension due to adenosine receptor blockade. *Eur J Pharmacol.* 2006;531:209-16.
32. Sousa T, Morato M, Fernandes E, Carvalho F, Albino-Teixeira A. Xanthine oxidase inhibition by 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxanthine (DPSPX), an antagonist of adenosine receptors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004;19:11-5.
33. Sousa T, Fernandes E, Nunes C, et al. Scavenging of nitric oxide by an antagonist of adenosine receptors. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57:399-404.
34. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2a} receptor. *Nature.* 1997;388:674-8.
35. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16:109-10.
36. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4.^a ed. San Diego: Academic Press; 1998.
37. Pinto M, Lima D, Castro-Lopes J, Tavares I. Noxious-evoked c-fos expression in brainstem neurones immunoreactive for GABA_B, μ -opioid and NK₁-receptors. *Eur J Neurosci.* 2003;17:1393-402.
38. Donovan JP. A metachromatic stain for neural tissue. *Stain Technol.* 1974;49:49-51.
39. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 2000;874:123-30.
40. Aicher SA, Kurucz OS, Reis DJ, Milner TA. Nucleus tractus solitarius efferent terminals synapse on neurons in the caudal ventrolateral medulla that project to the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.* 1995;693:51-63.
41. Jeske I, Morrison SF, Cravo SL, Reis DJ. Identification of baroreceptor reflex interneurons in the caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol.* 1993;264:R169-78.
42. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurones following sensory stimulation. *Nature.* 1987;328:632-4.
43. Gogas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behaviour and c-fos expression. *Neuroscience.* 1991;42:617-28.
44. Menetrey D, Giesler GJ Jr, Besson JM. An analysis of response properties of spinal cord dorsal horn neurones to nonnoxious and noxious stimuli in the spinal rat. *Exp Brain Res.* 1977;27:15-33.
45. 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.
46. Tavares I, Lima D, Coimbra A. The ventrolateral medulla of the rat is connected with the spinal cord dorsal horn by an indirect descending pathway relayed in the A5 noradrenergic cell group. *J Comp Neurol.* 1996;374:84-95.
47. Day TA, Ro A, Renaud, LP. Depressor area within caudal ventrolateral medulla of the rat does not correspond to the A₁ catecholamine cell group. *Brain Res.* 1983;279:299-302.
48. Willete RN, Barcas PP, Krieger AJ, Sapru HN. Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. *Neuropharmacology.* 1983;22:1071-9.
49. Gebhart GF, Ossipov MH. Characterization of inhibition of the spinal nociceptive tail-flick reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *J Neurosci.* 1986;6:701-13.

A Neuropatia Diabética está Associada a Alterações nas Respostas Nociceptivas dos Neurónios Espinhais: um Estudo no Rato Injectado com Estreptozotocina

C. Morgado e Isaura Tavares

Resumo

A dor neuropática induzida pela diabetes tem sido associada a alterações dos nervos periféricos. Dados recentes apontam para efeitos centrais, que são avaliados no presente estudo. A actividade dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal de ratos diabéticos por injeção com estreptozotocina (STZ) foi estudada na ausência de estimulação ou após estimulação inócua ou nóxica. Quatro semanas após injeção de STZ ou soro, os ratos foram anestesiados e submetidos a estimulação inócua, nóxica mecânica ou nóxica térmica da pele da face interna da coxa ou não foram submetidos a qualquer estimulação. Quantificaram-se os neurónios imunorreactivos para a proteína Fos (Fos-IR) nas lâminas superficiais (lâminas I-II) e profundas (III-V) do corno dorsal da medula espinhal. O número de neurónios Fos-IR era significativamente superior em ratos injectados com STZ, mesmo na ausência de estimulação. A aplicação de estímulos inócuos não induziu um aumento significativo na expressão de Fos quando comparada com os valores basais. Os estímulos nóxicos mecânicos e térmicos induziram um aumento no número de neurónios Fos-IR, quer em ratos-controlo quer em ratos STZ, com aumentos mais marcados em ratos STZ submetidos a estimulação nóxica mecânica. Este estudo mostra que as respostas dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal estão afectadas durante a diabetes. Atendendo a que a medula espinhal é uma região-chave na modulação da transmissão nociceptiva para níveis supra-espinhais, o aumento da actividade neuronal detectado em condições basais nos ratos diabéticos pode ser uma das causas da dor espontânea na diabetes.

Palavras-chave: Diabetes. Dor. Alterações espinhais. Hiperalgesia mecânica. Respostas térmicas. Dor espontânea.

Abstract

Pain during diabetic neuropathy has been associated mainly to peripheral changes but central effects can also be produced. The present study evaluates the effects of diabetes in the nociceptive activity of spinal dorsal horn neurons using rats rendered diabetic by injection of streptozotocin (STZ) and using the expression of the *c-fos* proto-oncogene as a tool to monitor neuronal activation. Four weeks after STZ or saline injection, the animals were anaesthetised and either not further manipulated or stimulated at the skin of the internal aspect of the thigh. Both innocuous and noxious (mechanical or thermal) stimuli were used and the numbers of neurons immunoreactive for Fos (Fos-IR) were counted at the superficial (laminae I-II) and deep (laminae III-V) dorsal horn. These numbers were significantly higher in STZ-injected animals, even in the absence of stimulation. The application of noxious mechanical or noxious thermal stimulation induced incre-

ases in the numbers of Fos-IR neurons both in control and in diabetic rats. This study demonstrates that the responses of spinal neurons are affected by diabetes. Due to the key-role of the spinal cord in ascending transmission of nociceptive input, it is likely that the increase in neuronal activity has important supraspinal consequences. (Dor. 2007;15(2):22-31)

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

Key words: Diabetes. Pain. Spinal dorsal horn. Mechanical hyperalgesia. Thermal responses. Spontaneous pain.

Introdução

A dor é uma importante complicação da diabetes, ocorrendo espontaneamente e em resposta a estimulação inócua (alodínia) ou nóxica (hiperalgesia)¹⁻⁴. O estudo dos mecanismos da dor neuropática associada à diabetes tem versado, essencialmente, o sistema nervoso periférico, sendo necessário um estudo mais aprofundado dos mecanismos centrais envolvidos nesta patologia^{1,5}. Os doentes diabéticos que sofrem de polineuropatia simétrica periférica apresentam uma diminuição na área total da medula espinhal⁶. Estudos electrofisiológicos realizados em ratos diabéticos demonstraram um aumento na actividade dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal, quer espontaneamente quer em resposta a estímulos mecânicos inócuos e nóxicos^{7,8}. Foram também demonstradas alterações neuroquímicas no corno dorsal da medula espinhal em modelos animais de diabetes, nomeadamente no sistema SP/NK1 e na expressão de receptores do glutamato (receptores NMDA)⁹⁻¹². Estes achados sugerem que a medula espinhal, uma região-chave na modulação e transmissão de informação nociceptiva, se encontra afectada durante a diabetes.

A expressão de *c-fos* é amplamente utilizada como um marcador da actividade nociceptiva dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal^{13,14}. Esta metodologia permite avaliar a activação nociceptiva e estabelecer a localização laminar dos neurónios activados¹⁵. Em modelos animais de dor neuropática traumática, há aumento do número de neurónios imunorreactivos para a proteína Fos (Fos-IR) no corno dorsal da medula espinhal, mesmo na ausência de estimulação¹⁶⁻¹⁸ e após aplicação de estímulos inócuos¹⁹⁻²⁴, demonstrando que os estados de dor crónica neuropática estão associados a alterações plásticas do corno dorsal da medula espinhal. Sendo a diabetes uma doença que também induz um quadro neuropático, é importante estudar os efeitos desta patologia no corno dorsal da medula espinhal. O modelo experimental mais utilizado para estudar a diabetes tipo 1 é o rato injectado com STZ, uma toxina que destrói as células β dos ilhéus de Langerhans. Os estudos da expressão basal de *c-fos* em ratos diabéticos abordaram vários

núcleos encefálicos e mostraram efeitos variados consoante o núcleo analisado²⁵⁻²⁸, indicando que a expressão do *c-fos* não é um resultado directo da toxina, mas sim o efeito da diabetes *per se*.

A sensibilidade aos diferentes tipos de estímulos é afectada diferentemente durante a diabetes. O limiar de dor a estímulos mecânicos é significativamente mais baixo em indivíduos diabéticos e em modelos animais de doença²⁹⁻³¹, enquanto as respostas a estímulos térmicos são muito variáveis. Alguns estudos detectaram hipotalgesia térmica^{7,30-32}, outros não detectaram qualquer alteração na sensibilidade térmica³³ e outros, ainda, demonstraram o desenvolvimento de hiperalgesia^{34,35}. Uma possível explicação para esta variabilidade prende-se com o facto dos estudos não terem considerado a temperatura cutânea basal dos animais diabéticos, dado relevante atendendo a que as alterações da temperatura cutânea afectam as respostas comportamentais a estímulos térmicos e que os animais diabéticos sofrem de hipotermia devido a alterações do fluxo sanguíneo periférico³⁶⁻⁴⁰.

Este estudo utilizou a expressão do proto-oncogene *c-fos* para avaliar a actividade dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal em ratos STZ em condições basais e após estimulação cutânea inócua e nóxica de natureza mecânica e térmica. De forma a caracterizar as respostas comportamentais a diferentes tipos de estímulos e confirmar a presença de neuropatia, foram realizados dois testes comportamentais que avaliam a sensibilidade nóxica mecânica e térmica. Foram, ainda, avaliados os efeitos da temperatura cutânea nas respostas comportamentais ao estímulo térmico.

Materiais e métodos

Foram usados ratos machos *Wistar* (*Charles River*, Barcelona, Espanha), com 250-350 g no início do trabalho experimental. Os animais foram alojados aos pares, num compartimento com temperatura constante (22 ± 2 °C), humidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de luz de 12 horas e receberam alimento e água *ad libitum*. O trabalho experimental respeitou as recomendações éticas para o estudo da dor em ani-

mais⁴¹ e a directiva 86/609/EEC do Conselho da Comunidade Europeia.

Indução da diabetes

A diabetes foi induzida segundo protocolo previamente estabelecido⁴². Os animais foram injectados intraperitonealmente (ip.) com uma solução de STZ (50 mg/kg de peso corporal; *Sigma-aldrich*, St. Louis, EUA) em soro fisiológico e foi-lhes fornecida uma solução açucarada (10% de sacarose) nos primeiros três dias após injeção, de forma a prevenir choque hipoglicémico. Os ratos-controlo foram injectados com igual volume de soro fisiológico. A glicemia foi determinada três dias após a injeção de STZ em amostra de sangue colhida a partir da veia posterior da cauda, utilizando o aparelho *Accu Chek Sensor Comfort* (*Roche Diagnostics*, Alemanha). Apenas os ratos com glicemia superior a 300 mg/dl foram considerados diabéticos e incluídos no grupo STZ.

Avaliação comportamental em resposta à dor

Foi realizada avaliação comportamental, ao longo do tempo, das respostas a estímulos mecânicos e térmicos, utilizando um total de 12 animais (seis ratos-controlo e seis ratos STZ). Os testes foram executados no dia prévio à injeção ou após uma, duas, três e quatro semanas. Os animais foram diariamente manipulados pelo mesmo experimentador durante os oito dias que precederam a aplicação dos testes comportamentais, de modo a promover a habituação ao experimentador e às condições experimentais.

A avaliação da sensibilidade a estímulos nócicos mecânicos foi realizada pelo teste de Randall-Sellito (*Ugo Basile*, Comerio VA, Itália). Foi aplicada sobre a pata direita do animal uma força ascendente e registado o valor da força (em gramas) que induziu a sua retirada. O limiar de dor mecânica foi, então, definido como a média de três ensaios sucessivos, realizados a intervalos de cinco minutos. A avaliação da sensibilidade à estimulação nociceptiva térmica foi feita pelo teste de flexão da cauda (*Ugo Basile*, Comerio VA, Itália). Fez-se incidir um feixe de calor radiante, a 52 °C, na face interna da cauda do animal e registou-se o tempo decorrido até remoção da cauda, definido como latência térmica. O limiar de dor térmica foi definido como a média dos valores de latência térmica obtidos em três ensaios sucessivos, realizados com intervalos de cinco minutos. Foi estabelecido um valor máximo de latência térmica de 24 minutos, de forma a evitar lesões tecidulares. Com base na prévia demonstração que a temperatura cutânea afecta as respostas ao teste de flexão da cauda³²⁻³⁶, foi avaliada a temperatura da cauda de cada animal imediatamente antes da realização dos testes, utilizando para o efeito uma

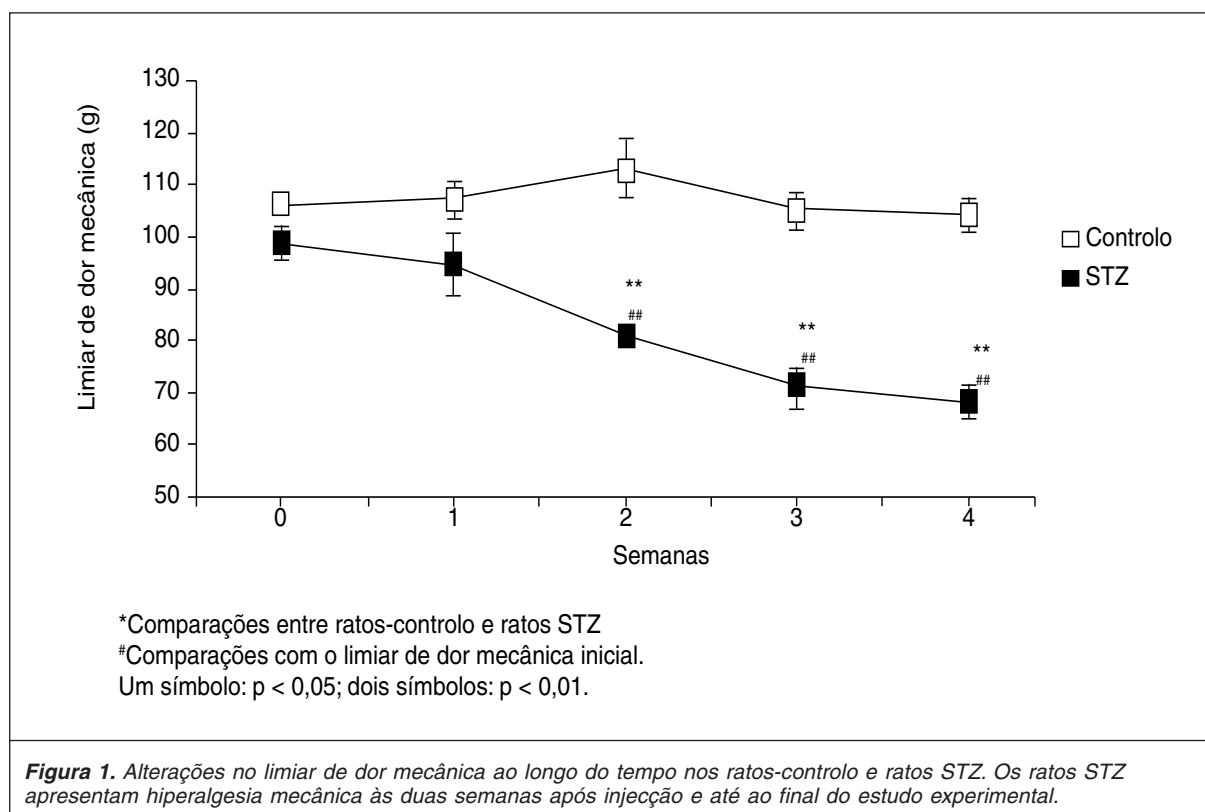
sonda adaptada à cauda (*Sensortek*, EUA; *Greisinger Electronic*, Alemanha). Os valores de latência térmica foram, então, ajustados tendo em conta a temperatura da cauda, segundo método previamente descrito³⁶.

Na análise estatística dos resultados da avaliação comportamental ao longo do tempo aplicou-se uma análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post-hoc* de Tukey para múltiplas comparações. Para as comparações entre grupos usou-se teste *t* Student.

Avaliação da expressão de c-fos

Quatro semanas após injeção, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 35% (1 ml/kg de peso corporal; ip.). Cinco animais de cada grupo não foram submetidos a qualquer manipulação e foram utilizados para avaliação da expressão basal de c-fos. Os restantes animais (n = 5 por grupo e estímulo) foram sujeitos a estimulação cutânea inócua, nócica mecânica ou térmica na face interna da coxa esquerda, como descrito anteriormente^{43,44}. A estimulação inócua consistiu em toque suave com duração de 15 segundos, segundo protocolo publicado¹⁹. Utilizou-se uma pinça de «dentes de rato» para aplicar o estímulo nócico mecânico, conforme descrito anteriormente⁴³⁻⁴⁵. Para a estimulação nócica térmica fez-se incidir um feixe de calor radiante (HLTC-200T, npi *electronic GmbH*), a uma temperatura de 65 ± 2 °C, controlada pela aplicação de uma sonda sobre a superfície cutânea, e em pulsos de 30 segundos⁴³⁻⁴⁵. Todos os estímulos foram aplicados a cada dois minutos durante duas horas. Utilizou-se hidrato de cloral (0,5 ml/kg de peso corporal; ip.) para reforço anestésico durante o período de estimulação.

Terminado o período de estimulação, os animais foram imediatamente sacrificados por perfusão transcardíaca com 200 ml de tampão de sais fosfato (PBS), seguido de 1.000 ml de paraformaldeído em 0,1 M de PBS, pH 7,4. Foram dissecados os segmentos espinhais T13-L3, pós-fixados em paraformaldeído durante quatro horas e conservados durante a noite numa solução de 30% de sacarose em tampão fosfato. Foram obtidos cortes transversais, com 40 µm de espessura, dos referidos segmentos utilizando um micrótomo de congelação e em cada quatro cortes foram colhidos em PBS a 0,1 M e processados em reacção imunocitoquímica contra a proteína Fos, segundo o método da peroxidase-avidina-biotina (método ABC) já descrito⁴⁵. Resumidamente, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogénio a 1% durante 10 minutos para inibição da actividade da peroxidase endógena, seguido de incubação durante duas horas em solução de bloqueio (10% de soro de porco + 0.3% de Triton X a 25% em PBS [PBST] + glicina a 0,1 M). Os cortes foram depois incubados durante uma noite a 4 °C



em anticorpo contra a proteína Fos produzido em coelho (Ab5; Oncogene), diluído de 1:1.000 em PBST. Após sucessivas lavagens com PBST, procedeu-se à incubação em anticorpo secundário biotinilado (imunoglobulina porco anti-coelho, *DakoCytomation*, Dinamarca), a uma concentração de 1:200, durante uma hora, à temperatura ambiente. Os cortes foram depois lavados com PBST e incubados durante uma hora no complexo avidina-biotina (Vectastain, Laboratórios Vector, EUA), e revelados com diaminobenzidina (DAB; 10 mg DAB em 20 ml de Tris-HCL 0,05 M, pH 7,6 com 5µl de peróxido de hidrogénio a 30%). Por fim, os cortes foram lavados em PBS e devidamente preparados para visualização microscópica.

A expressão de Fos basal foi determinada por quantificação do número de neurónios Fos-IR nos cornos dorsais da medula espinhal, em 40 cortes aleatoriamente seleccionados dos segmentos T13-L1 (10 cortes por segmento), com a ajuda de um microscópio dotada de câmara lúcida. Os neurónios Fos-IR foram posicionados em duas áreas distintas do corno dorsal: a parte superficial (lâminas I-II) e a parte profunda, (lâminas III-V)⁴⁶. Aplicou-se o teste *t* Student para comparação da expressão basal de Fos entre ratos-controlo e ratos STZ não-estimulados. Nos animais estimulados a quantificação foi realizada no corno dorsal da medula espinhal ipsilateral ao local de estimulação, em 20 cortes dos segmentos L1-L2 (10 cortes por segmento). A quantificação foi realizada nestes segmentos, visto serem estes que

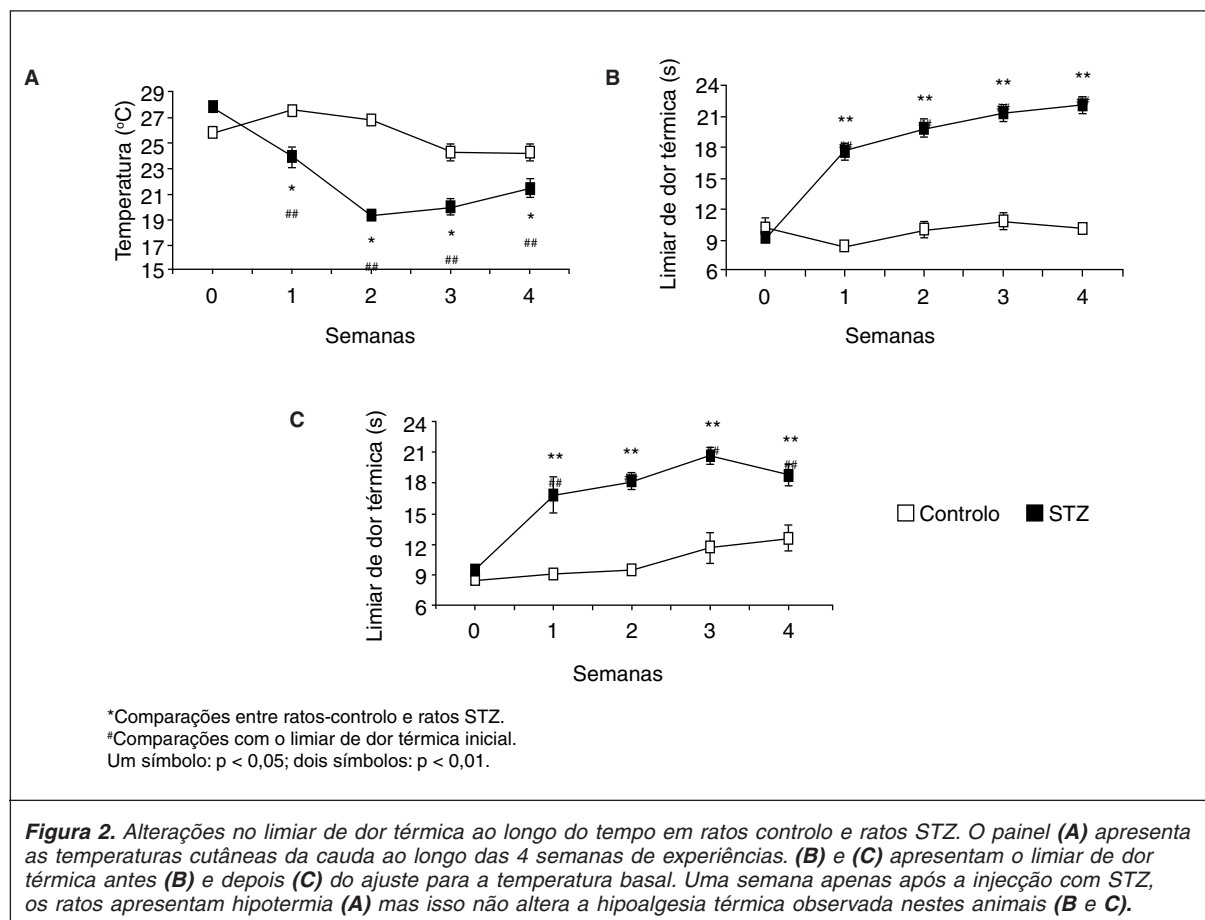
apresentavam maior expressão de Fos, como demonstrado em estudos prévios que utilizaram o mesmo protocolo experimental^{39,40}. Foi aplicada análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post-hoc* de Tukey, para comparação dos números médios de neurónios Fos-IR em ratos-controlo e ratos STZ após estimulação inócua e nóxica. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

Resultados

Os animais apresentaram hiperglicemia (concentração de glicose sanguínea > 300 mg/dl) três dias após a injeção com STZ e mantiveram-se nessa condição durante todo o estudo. Quatro semanas após injeção, os ratos STZ apresentavam valores de glicemia significativamente superiores aos dos ratos controlo (grupo STZ: $484,1 \pm 32,21$ mg/dl; grupo controlo: $136,9 \pm 18,71$ mg/dl) e peso corporal significativamente inferior (grupo STZ: $285 \pm 13,4$ g; grupo controlo: $420 \pm 5,6$). Os ratos STZ apresentaram os sintomas típicos da diabetes, como descrito em referências do modelo animal^{3-35,42}, mantendo as restantes características semelhantes às encontradas no grupo controlo.

Resultados da avaliação comportamental

Não foram observadas diferenças entre os grupos nas respostas nociceptivas aos estímulos mecânicos e térmicos antes da injeção com STZ ou soro (Figs. 1 e 2).



Respostas ao teste de Randall-Sellito

O limiar de dor mecânica dos ratos STZ diminuiu gradualmente durante as quatro semanas de duração do estudo (Fig. 1), sendo essa redução significativa duas semanas após a injeção com STZ e mais pronunciada às quatro semanas (diminuição de cerca de 31% em relação aos valores iniciais).

Respostas ao teste de flexão da cauda

Verificou-se uma redução significativa na temperatura cutânea da cauda dos ratos STZ uma semana após a injeção (Fig. 2 A), mantendo-se os valores baixos durante as quatro semanas do estudo. Contrariamente, o limiar de dor térmica nestes ratos aumentou significativamente uma semana apenas após a injeção e manteve-se praticamente inalterado durante todo o estudo. Estes resultados foram observados tanto antes (Fig. 2 B) como após (Fig. 2 C) ajuste para os valores da temperatura basal da cauda.

Estudo da expressão de Fos

Expressão basal de Fos

Nos ratos-controle não-estimulados detectaram-se escassos neurónios Fos-IR no corno dorsal da medula espinhal. Comparativamente com

ratos-controle, os ratos STZ apresentaram um número significativamente superior de neurónios Fos-IR nos segmentos espinhais T13-L3 (Fig. 3), particularmente na parte superficial do corno dorsal (Fig. 3 C), mas também na parte profunda (Fig. 3 D).

Expressão de Fos induzida por estimulação inócua e nóxica

ESTIMULAÇÃO MECÂNICA INÓCUA

A estimulação mecânica inócua não induziu aumento significativo no número de neurónios Fos-IR no corno dorsal em qualquer dos grupos (Figs. 4 A, B, 5 A e B). Embora os ratos STZ tenham apresentado um número de neurónios Fos-IR significativamente maior no corno dorsal superficial do que os ratos-controle após estimulação inócua, isto parece dever-se aos altos níveis na expressão basal de Fos observados no primeiro grupo e não aos efeitos da estimulação inócua. Verificou-se que os ratos STZ após estímulo inócua apresentavam um número de neurónios Fos-IR semelhante ao observado nos ratos STZ não-estimulados (Figs. 5 A e B).

ESTIMULAÇÃO MECÂNICA NÓXICA

O número de neurónios Fos-IR no corno dorsal da medula espinhal dos ratos controle e ratos

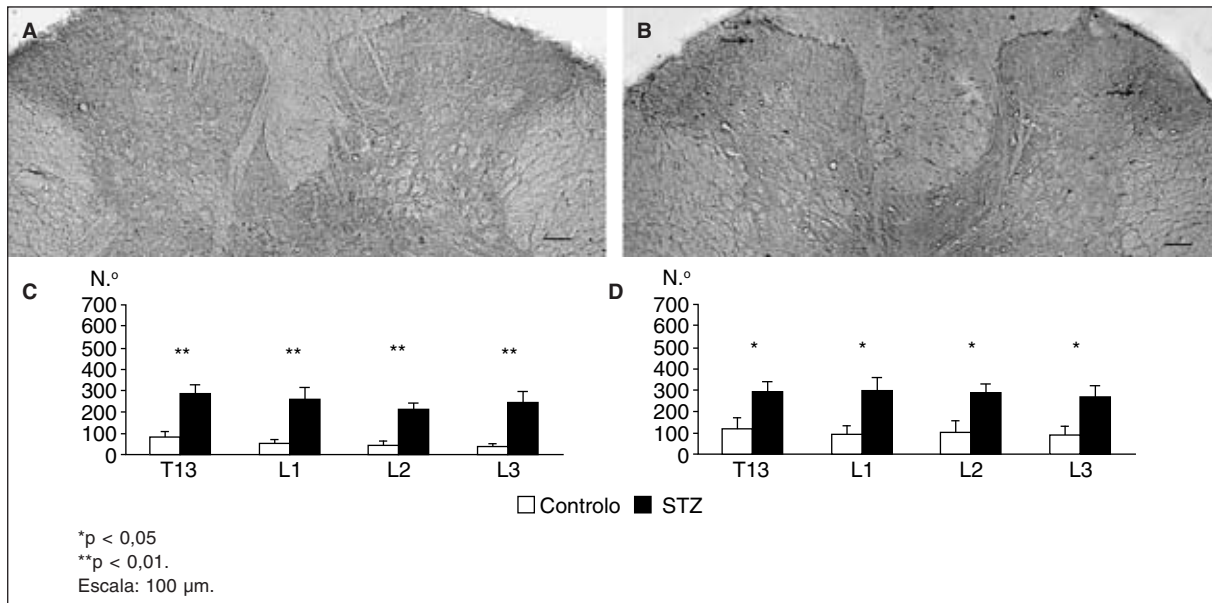


Figura 3. Expressão basal de Fos quatro semanas após injeção. As imagens são fotografias de cortes transversais da medula espinhal de um rato controlo (A) e de um rato STZ (B). Os gráficos (C) e (D) apresentam o número médio de neurónios Fos-IR (\pm EPM) quantificados bilateralmente nas lâminas I-II (C) ou III-V (D). Os ratos STZ apresentam níveis de Fos significativamente superiores aos dos controlo (setas) em todos os segmentos espinhais, mesmo na ausência de qualquer tipo de estimulação.

STZ sujeitos a estimulação mecânica nóxica (Figs. 4 C e D) foram significativamente superiores ao observado nos respectivos grupos experimentais não-estimulados (Figs. 5 C e D). O aumento de expressão de Fos foi mais marcado na parte superficial do corno dorsal em ratos STZ, apresentando um número de neurónios Fos-IR significativamente maior do que os ratos-controlo.

ESTIMULAÇÃO TÉRMICA NÓXICA

O número de neurónios Fos-IR no corno dorsal superficial dos ratos controlo e ratos STZ sujeitos a estimulação térmica nóxica (Figs. 4 E e F) foram significativamente superiores aos observados nos respectivos grupos experimentais não-estimulados (Figs. 5 E e F), não se observando alterações na parte profunda do corno dorsal (Fig. 5 F). Não se verificaram diferenças na expressão de Fos induzida por estímulo térmico entre os grupos controlo e STZ (Figs. 5 E e F).

Discussão

Utilizando a expressão do proto-oncogene *c-fos* como marcador da activação nociceptiva dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal, o nosso estudo demonstra, pela primeira vez, alterações funcionais da medula espinhal durante a diabetes. O principal achado do presente estudo é a hiperactividade dos neurónios do corno dorsal dos ratos diabéticos na ausência de qualquer tipo de estimulação, o que pode contribuir para a dor espontânea que ocorre na

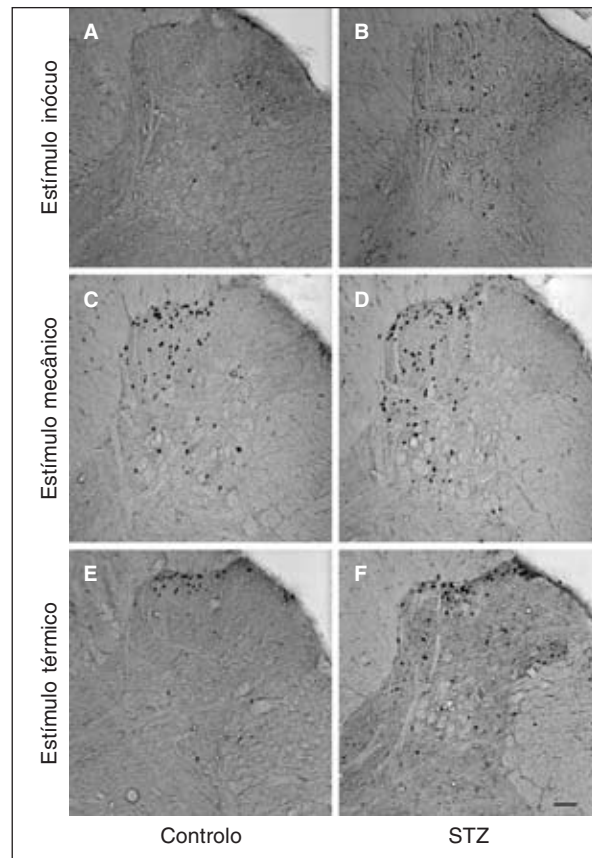


Figura 4. Fotografias do corno dorsal mostrando a expressão de Fos induzida por estimulação inócua (A e B), nóxica mecânica (C e D) e nóxica térmica (E e F) em animais-controlo (A, C e E) e em ratos STZ (B, D e F), quatro semanas após injeção. Escala: 100 µm.

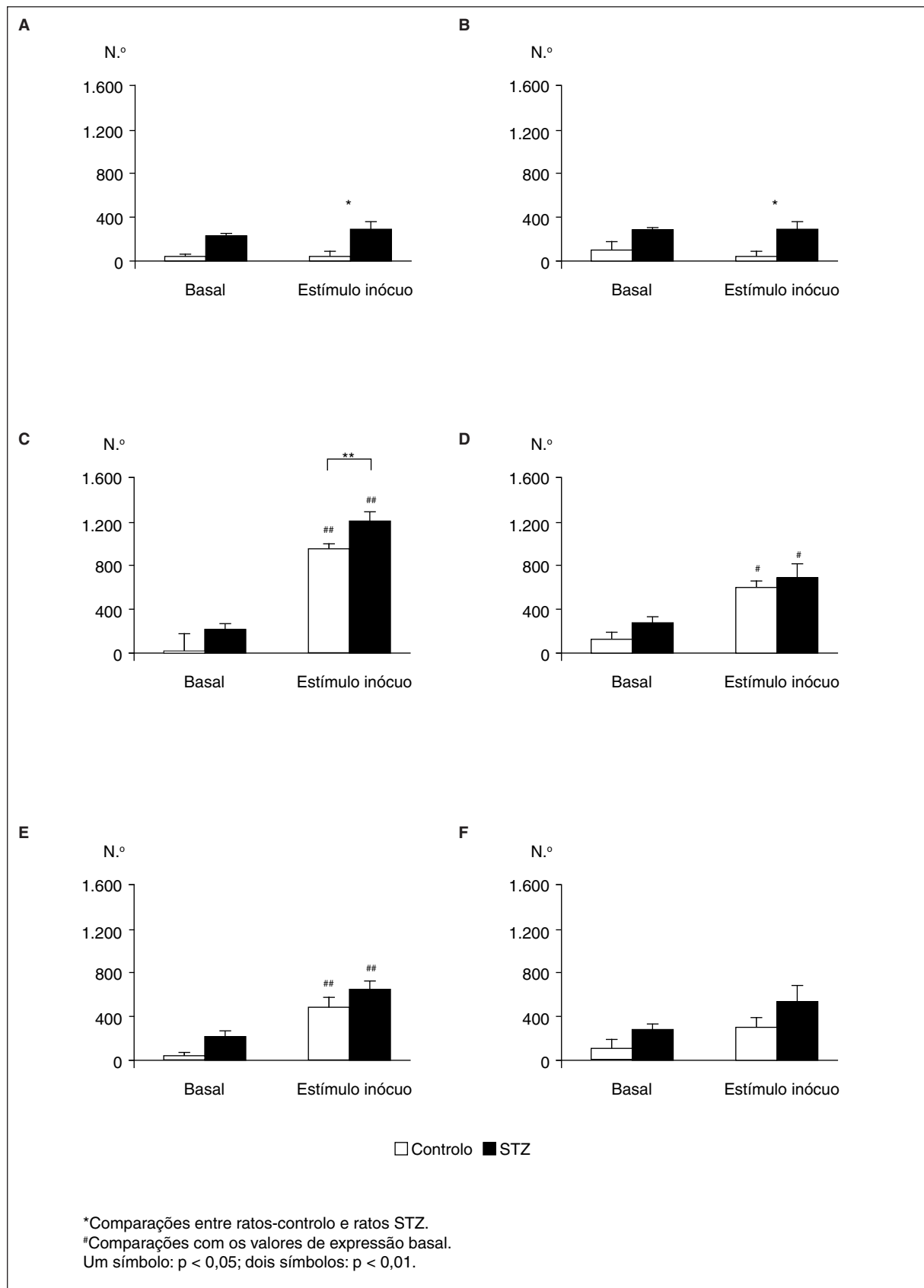


Figura 5. Efeitos da estimulação inócua (A e B), nóxica mecânica (C e D) e nóxica térmica (E e F) na expressão de Fos nos segmentos espinhais L₁-L₂, quatro semanas após injeção. Os gráficos apresentam o número médio de neurónios Fos-IR (\pm EPM) quantificados nas lâminas I-II (A, C e E) ou III-V (B, D e F) do corno dorsal ipsilateral. A estimulação inócua não induziu a expressão de Fos quando comparado com os valores basais. Os efeitos da estimulação nóxica mecânica na expressão de Fos foram mais marcados do que os da estimulação nóxica térmica.

diabetes²⁻⁴. O aumento da actividade neuronal observado neste estudo está de acordo com os dados electrofisiológicos obtidos neste modelo animal^{7,8}. Os estudos electrofisiológicos não permitem, porém, estudar um grande número de neurónios nem correlacionar as suas respostas com a localização na medula espinhal, um facto importante atendendo à distribuição dos diferentes tipos de neurónios pelas lâminas da medula espinhal⁴⁷. As presentes observações mostram que tanto o corno dorsal superficial como o profundo estão afectados durante a diabetes, com um maior comprometimento do primeiro. É provável que estas alterações funcionais de todo o corno dorsal durante a diabetes afectem, de uma forma importante, a transmissão ascendente da informação nociceptiva, na medida em que quer os neurónios do corno dorsal superficial quer do profundo participam nas principais vias espinhofugais^{48,49}. De facto, foi demonstrado que alguns neurónios que apresentavam um aumento da actividade basal durante a diabetes pertenciam ao tracto espinotalâmico⁸. A hiperactividade basal dos neurónios é provavelmente devido à constante chegada de informação vinda da periferia pois existe actividade ectópica das fibras nervosas periféricas nos ratos diabéticos⁵⁰. No entanto, a hiperactividade pode também ser devida a alterações plásticas da medula espinhal, ou mesmo, das regiões supra-espinhais envolvidas na modulação descendente da dor⁵¹⁻⁵³.

A hiperactividade basal observada durante a diabetes está de acordo com os dados de estudos com modelos de neuropatia traumática¹⁵. No entanto, a diabetes parece induzir efeitos diferentes quando se trata de estimulação inócua. Em situações de neuropatia traumática, a estimulação inócua induz activação do proto-oncogene *c-fos*^{15,19,22-24,29}, o que não se verifica nos nossos ratos diabéticos, mesmo após estimulação prolongada. Tendo em consideração que a alodinia mecânica é uma característica da neuropatia diabética^{7,8,31}, é provável que os níveis altos de Fos basal nos ratos diabéticos estejam a mascarar a expressão de Fos induzida pela estimulação mecânica inócua.

Comparativamente aos níveis basais, a estimulação mecânica nóxica aumentou significativamente o número de neurónios Fos-IR no corno dorsal superficial e profundo nos ratos diabéticos. Este estímulo induziu uma expressão de Fos significativamente superior em ratos STZ do que em ratos-controlo. Tendo em consideração as múltiplas evidências da existência de correlação entre a magnitude de expressão de *c-fos* induzida por estímulos nóxicos e as respostas comportamentais à dor⁵⁴⁻⁵⁶, é provável que o aumento da actividade nociceptiva espinhal verificada após estimulação mecânica seja a causa da hiperalgesia mecânica observada na diabetes²⁹⁻³¹. Os efeitos da estimulação nóxica térmica na expressão de Fos verificaram-se apenas nas lâminas superficiais do corno dorsal e

em ambos os grupos, sem diferenças significativas entre eles. O efeito mais marcado do estímulo nóxico mecânico em relação ao térmico está em concordância com outros estudos que mostram que a diabetes afecta de modo mais severo as respostas mecânicas do que as térmicas^{8,33}. Os efeitos da estimulação nóxica mecânica na indução de Fos são mais pronunciados do que os da estimulação térmica, não só nos ratos diabéticos mas também nos ratos controlos, o que está de acordo com estudos prévios^{43,44}. Os diferentes efeitos poderiam ser explicados por diferenças de intensidade dos estímulos, no entanto foi demonstrado previamente que estes dois estímulos são semelhantes no que diz respeito à magnitude do edema tecidual induzido^{43,57}. O padrão de expressão de Fos na medula espinhal parece, pois, ser determinado pela natureza do estímulo, não só em animais controlo^{15,43,44}, mas também em animais diabéticos, conforme demonstrado pela primeira vez no presente estudo.

Os efeitos da estimulação nóxica térmica na expressão de Fos nos ratos diabéticos são difíceis de explicar, tendo em conta que estes animais desenvolvem hipoalgesia térmica^{7,30-32}, confirmada no presente estudo pela realização do teste de flexão da cauda. Com base em estudos que demonstram a necessidade de ajustar os resultados deste teste para os valores da temperatura da cauda³⁶⁻⁴⁰, foi proposto que a diminuição da temperatura cutânea observada nos ratos diabéticos poderia justificar a hipoalgesia térmica detectada com estes testes⁷. Após ajuste dos resultados do teste de flexão da cauda para a temperatura cutânea a hipoalgesia térmica manteve-se, o que sugere a existência de outros factores, que não a hipotermia, na etiologia desta alteração sensorial. A activação de expressão de *c-fos* em neurónios espinhais inibitórios induzida pela estimulação térmica é uma possível explicação para este achado, dado ter sido previamente demonstrado que o *c-fos* pode exprimir-se em populações de neurónios espinhais neuroquimicamente heterogéneas, que podem conter neurotransmissores inibitórios⁵⁸ ou estar sob o efeito de acções inibitórias⁴⁵.

A diabetes induzida pela injeção de STZ é caracterizada por hiperglicemia e deficiência em insulina. Estes dois factores parecem contribuir para a fisiopatologia das lesões dos nervos periféricos durante a diabetes, na medida em que se observou que o tratamento com insulina, com ou sem normalização dos valores glicémicos, previne e reverte as alterações dos nervos periféricos e os sinais de neuropatia diabética⁵⁹⁻⁶¹. Tendo em conta a presença de receptores para a insulina na medula espinhal^{62,63}, é provável que a deficiência em insulina contribua, conjuntamente com a hiperglicemia, para as alterações funcionais observadas no corno dorsal da medula espinhal. O presente estudo não avaliou o

efeito do tratamento insulínico na função dos neurónios espinhais, porque o principal objectivo era avaliar o efeito da diabetes *per se* nas respostas dos neurónios do corno dorsal, e o tratamento com insulina ou outros agentes farmacológicos poderiam influenciar a função destes neurónios. No entanto, é muito importante avaliar qual a contribuição relativa da hiperglicemia e da deficiência de insulina nas alterações da actividade neuronal durante a diabetes.

Assim, o presente estudo demonstra que a actividade basal dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal está claramente aumentada quatro semanas após a indução da diabetes. Estes resultados, em conjunto com observações prévias de alterações funcionais e estruturais da medula espinhal, demonstram que a actividade neuronal na medula espinhal está afectada de uma forma importante nesta patologia.

Agradecimentos

Carla Morgado é apoiada por uma Bolsa de Doutoramento da FCT (SFRH/BD/21555/2005). O trabalho foi realizado com o apoio de bolsas de investigação da Fundação AstraZeneca e da Sociedade Portuguesa de Diabetologia/Novo Nordisk e do projecto da FCT PTCD/SAL/-NEU/64645/2006. Os autores agradecem a orientação técnica do Professor Arne Tjolsen (Universidade de Bergen, Noruega) no ajuste das respostas do teste de flexão da cauda para a temperatura cutânea basal.

Bibliografia

1. Sima AA. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2445-64.
2. Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;47:123-8.
3. Simmons Z, Feldman EL. Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 2002;15:595-603.
4. Podwall D, Gooch C. Diabetic neuropathy: clinical features, etiology, and therapy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2004;4:55-61.
5. Krishnan ST, Rayman G. New treatments for diabetic neuropathy: symptomatic treatments. *Curr Diab Rep* 2003;3:459-67.
6. Eaton SE, Harris ND, Rajbhandari SM, et al. Spinal-cord involvement in diabetic peripheral neuropathy. *Lancet* 2001;358:35-6.
7. Pertovaara A, Wei H, Kalmari J, et al. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. *Exp Neurol* 2001;167:425-34.
8. Chen SR, Pan HL. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol* 2002;87:2726-33.
9. Diemel LT, Brewster WJ, Fernyhough P, et al. Expression of neuropeptides in experimental diabetes; effects of treatment with nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;21:171-5.
10. Kamei J, Ogawa M, Kasuya Y. Development of supersensitivity to substance P in the spinal cord of the streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;35:473-5.
11. Field MJ, McCleary S, Boden P, et al. Involvement of the central tachykinin NK1 receptor during maintenance of mechanical hypersensitivity induced by diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:1226-32.
12. Tomiyama M, Furusawa K, Kamijo M, et al. Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;136:275-81.
13. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 1998;45:1-8.
14. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987;328:632-4.
15. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* 2005;77:299-352.
16. Kajander KC, Madsen AM, Iadarola MJ, et al. Fos-like immunoreactivity increases in the lumbar spinal cord following a chronic constriction injury to the sciatic nerve of rat. *Neurosci Lett* 1996;206:9-12.
17. Williams S, Evan G, Hunt SP. C-fos induction in the Spinal Cord after Peripheral Nerve Lesion. *Eur J Neurosci* 1991;3:887-94.
18. Jergova S, Cizkova D. Long-term changes of c-Fos expression in the rat spinal cord following chronic constriction injury. *Eur J Pain* 2005;9:345-54.
19. Catheline G, Le Guen S, Honore P, et al. Are there long-term changes in the basal or evoked Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord of the mononeuropathic rat? *Pain* 1999;80:347-57.
20. Bester H, Beggs S, Woolf CJ. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol* 2000;428:45-61.
21. Dai Y, Iwata K, Kondo E, et al. A selective increase in Fos expression in spinal dorsal horn neurons following graded thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy. *Pain* 2001;90:287-96.
22. Kosai K, Tateyama S, Ikeda T, et al. MK-801 reduces non-noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of rats with chronic constriction nerve injury. *Brain Res* 2001;910:12-8.
23. Tsai Y, So EC, Chen HH, et al. Effect of intrathecal octreotide on thermal hyperalgesia and evoked spinal c-fos expression in rats with sciatic constriction injury. *Pain* 2002;99:407-13.
24. Tokunaga A, Kondo E, Fukuoka T, et al. Excitability of spinal cord and gracile nucleus neurons in rats with chronically injured sciatic nerve examined by c-fos expression. *Brain Res* 1999;847:321-31.
25. Revsin Y, Saravia F, Roig P, et al. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain Res* 2005;1038:22-31.
26. Zheng H, Li Y-F, Weiss M, et al. Neuronal expression of fos protein in the forebrain of diabetic rats. *Brain Res* 2002;956:268-75.
27. Jang M-H, Chang H-K, Shin M-C, et al. Effect of ginseng radix on c-fos expression in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Sci* 2003;91:149-52.
28. Gouty S, Regalia J, Cai F, et al. α -Lipoic acid treatment prevents the diabetes-induced attenuation of the afferent limb of the baroreceptor reflex rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2003;108:32-44.
29. Clark CM Jr, Lee DA. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;332:1210-7.
30. Calcutt NA, Freshwater JD, Mizisin AP. Prevention of sensory disorders in diabetic Sprague-Dawley rats by aldose reductase inhibition or treatment with ciliary neurotrophic factor. *Diabetologia* 2004;47:718-24.
31. Fox A, Eastwood C, Gentry C, et al. Critical evaluation of the streptozotocin model of diabetic neuropathy in the rat. *Pain* 1999;81:307-16.
32. Malcangio M, Tomlinson DR. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain* 1998;76:151-7.
33. Raz I, Hasdai D, Seltzer Z, et al. Effect of hyperglycemia on pain perception and on efficacy of morphine analgesia in rats. *Diabetes* 1988;37:1253-9.
34. Lee JH, McCarty R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain* 1992;50:231-6.
35. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 1993;53:81-8.
36. Tjolsen A, Lund A, Berge OG, et al. An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail-skin temperature. *J Neurosci Methods* 1989;26:259-65.
37. Hole K, Tjolsen A. The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor. *Pain* 1993;53:247-54.
38. Sawamura S, Tomioka T, Hanaoka K. The importance of tail temperature monitoring during tail-flick test in evaluating the antinociceptive action of volatile anesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46:451-4.
39. Lund A, Tjolsen A, Hole K. The apparent antinociceptive effect of desipramine and zimeclidine in the tail flick test in rats is mainly caused by changes in tail skin temperature. *Pain* 1989;38:65-9.
40. Berge OG, Garcia-Cabrera I, Hole K. Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci Lett* 1988;86:284-8.
41. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-10.
42. Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Methods Mol Med* 2004;99:55-65.

43. Lima D, Avelino A, Coimbra A. Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport* 1993;4:747-50.
44. Tavares I, Lima D, Coimbra A. Neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord projecting to the medullary ventrolateral reticular formation express c-fos after noxious stimulation of the skin. *Brain Res* 1993;623:278-86.
45. Castro AR, Pinto M, Lima D, et al. Imbalance between the expression of NK1 and GABAB receptors in nociceptive spinal neurons during secondary hyperalgesia: a c-Fos study in the monoarthritic rat. *Neuroscience* 2005;132:905-16.
46. Molander C, Grant G. Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat. *Neuroscience* 1986;19:297-312.
47. Todd AJ, Ribeiro-da-Silva A. Molecular architecture of the dorsal horn. Em: Hunt S, Koltzenburg M, eds. *The neurobiology of pain*. Nova Iorque: Oxford University Press Inc; 2005. p. 65-94.
48. Lima D. Anatomical basis for the dynamic processing of nociceptive input. *Eur J Pain* 1998;2:195-202.
49. Willis WD. Spinal cord nociceptive pathways. Em: Flor H, Kalso E, Dostrovsky JO, eds. *Proceedings of the 11th World Congress on pain*. IASP Press: Seattle WA; 2006. p. 269-84.
50. Burchiel KJ, Russell LC, Lee RP, et al. Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats. A possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain. *Diabetes* 1985;34:1210-3.
51. Gogas KR, Cho HJ, Botchkina GI, et al. Inhibition of noxious stimulus-evoked pain behaviors and neuronal fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat by supraspinal morphine. *Pain* 1996; 65:9-15.
52. Jones SL. Noxious heat-evoked fos-like immunoreactivity in the rat lumbar dorsal horn is inhibited by glutamate microinjections in the upper cervical spinal cord. *Brain Res* 1998;788:337-40.
53. Ren K, Ruda MA. Descending modulation of Fos expression after persistent peripheral inflammation. *Neuroreport* 1996;7:2186-90.
54. Bullitt W, Lee CL, Light A, et al. The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-fos expression in the redent spinal cord. *Brain Res* 1992;580:172-9.
55. Presley RW, Menetrey D, Levine JD, et al. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990;10:323-35.
56. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev* 1998; 28:370-490.
57. 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.
58. Todd AJ, Spike RC, Brodbelt AR, et al. Some inhibitory neurons in the spinal cord develop c-fos-immunoreactivity after noxious stimulation. *Neuroscience* 1994;63:805-16.
59. Calcutt N, Jorge MC, Yaksh TL, et al. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 1996;68:293-9.
60. Courteix C, Bardin M, Massol J, et al. daily insulin treatment relieves long-term hyperalgesia in streptozocin diabetic rats. *NeuroReport* 1996;7:1922-4.
61. Biessels G-J, Cristino NA, Rutten G-J, et al. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Course of development and effects of insulin treatment. *Brain* 1999;122:757-68.
62. Folli F, Bonfanti L, Renard E, et al. Insulin Receptor Substrate-1 IRS-1. distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci* 1994; 14:6412-22.
63. Sugimoto K, Murakawa Y, Sima A. Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Peripheral Nervous System* 2002;7:44-53.

Expressão do ARNm para o Receptor Opióide δ (DOR) Durante a Evolução da Monoartrite: Alterações Observadas no Núcleo Reticular do Tálamo e em Núcleos do Bolbo Raquidiano do Tronco Cerebral

Fani Lourença Neto¹, Raquel Carvalhosa¹, Joana Ferreira-Gomes¹, Carlos Reguenga² e José Manuel Castro-Lopes¹

Resumo

Em situações de dor crónica, estão descritas alterações na expressão do ARNm para receptores de neurotransmissores em várias áreas do sistema nervoso central (SNC). Os receptores opióides δ (DOR) têm sido recentemente implicados nos mecanismos de dor, mas não existem estudos que descrevam a expressão do seu ARNm em núcleos específicos do tálamo e do tronco cerebral em condições de dor crónica inflamatória, embora a sua expressão basal tenha sido já avaliada no SNC do rato. Neste estudo foi efectuada uma hibridação *in situ* para o ARNm do DOR em cortes de encéfalo de ratos controlo e ratos monoartríticos (MA) com 2, 4, 7 e 14 dias de inflamação. A quantidade de ARNm, expressa em «densidade de grãos de prata», foi determinada bilateralmente no complexo ventrobasal (VB), núcleos posterior (Po), centromedial/centrolateral (CM/CL) e reticular (Rt) do tálamo, e ainda nos núcleos reticular dorsal (DRt), reticular lateral (LRt) e reticular parvocelular (PCRt) do tronco cerebral. Os animais controlo exibiram uma expressão de ARNm baixa no VB, Po e CM/CL, assim como no PCRt, enquanto no Rt, DRt e LRt foram observados níveis moderados de densidade de grãos de prata. Durante a MA, a expressão de ARNm para o DOR diminuiu significativamente (22%) no Rt contralateral à articulação afectada aos 7 e 14 dias de inflamação, em comparação com os animais controlo. Foi também observada uma redução bilateral (35%) no DRt aos 14 dias de MA, enquanto que no PCRt foi detectado um aumento contralateral aos sete dias (39%). Não foram encontradas alterações nas outras regiões analisadas. Os resultados sugerem que o DOR está provavelmente envolvido nas alterações que ocorrem no tálamo e no tronco cerebral em resposta à dor crónica inflamatória.

Palavras-chave: Receptores opióides δ . Núcleo reticular do tálamo. Hibridação *in situ*. Dor crónica inflamatória. Núcleo reticular dorsal. Núcleo reticular parvocelular. Monoartrite.

Abstract

Changes in the mRNA expression of neurotransmitters receptors under chronic pain conditions have been described in various areas of the central nervous system (CNS). Delta opioid receptors (DOR) have been implicated in pain mechanisms but, although its mRNA expression has been studied in the rat CNS, there are no reports describing its distribution in specific thalamic and brainstem nuclei during chronic inflammatory pain. Here, *in situ* hybridization for DOR mRNA was performed in brain sections from control and monoarthritic (MA) rats with 2, 4, 7 and 14 days of inflammation. Grain densities were determined bilaterally in thalamic and brainstem nuclei known to be involved in pain processing, namely the ventrobasal complex (VB), posterior (Po), centromedial/centrolateral (CM/CL) and reticular (Rt) nuclei of the thalamus, and in the dorsal reticular

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

²Laboratório de Biologia Celular e Molecular
Faculdade de Medicina do Porto e IBMC
E-mail: fanineto@med.up.pt

(DRt), lateral reticular (LRt) and parvocellular reticular (PCRt) nuclei of the brainstem. Control animals exhibited weak DOR mRNA expression in the VB, Po and CM/CL, as well as in PCRt, while moderate grain densities were observed in the Rt, DRt and LRt. During MA, DOR mRNA expression was significantly decreased (22%) in the Rt contralateral to the affected joint at both 7 and 14 days of inflammation, as compared to controls. A bilateral reduction (35%) was also observed in the DRt at 14 days of MA, while a contralateral increase was found in the PCRt at 7 days (+39%). No significant changes were observed in the other regions analyzed. Data suggests that DOR is probably involved in the alterations that occur in the thalamus and brainstem in response to chronic inflammatory pain. (Dor. 2007;15(2):32-40)

Corresponding author: Fani Lourença Neto, fanineto@med.up.pt

Key words: Delta-opioid receptor. Reticular thalamic nucleus. *In situ* hybridization. Chronic inflammatory pain. Dorsal reticular nucleus. Parvocellular reticular nucleus. Monoarthritis.

Introdução

As drogas que actuam nos receptores opióides têm sido usadas desde há muito tempo como uma das terapias mais eficazes no tratamento da dor crónica¹. Apesar disso, e do facto de vários estudos os implicarem na modulação da dor^{2,3}, existem ainda muitas questões em aberto relativamente ao papel desses receptores transmembranares acoplados à proteína G nos mecanismos de processamento da dor, nos diferentes níveis do sistema nociceptivo. Durante algum tempo, a investigação científica devotada a este tema privilegiou os receptores opióides μ (MOR), e estabeleceu este subtipo de receptores como sendo os principais responsáveis pela mediação dos efeitos analgésicos e de tolerância dos opióides². Para além de analgesia, os agonistas do MOR como a morfina, causam depressão respiratória e dependência física. Pelo contrário, a evidência experimental sugere que os agonistas para os receptores opióides delta (DOR) não provocam esses efeitos secundários^{4,5}, o que os torna potenciais alvos para o desenvolvimento de novos analgésicos. Experiências recentes indicam a existência de interacções modulatórias entre MOR e DOR, e, de facto, foi verificado um aumento da potência e eficácia analgésica e uma redução da tolerância e dependência física dos agonistas do MOR, quando essas drogas foram co-administradas com ligandos para o DOR⁶. De facto, os dados sugerem que o endereçamento e tráfego do DOR para a membrana celular são mecanismos cruciais na modulação da analgesia e tolerância aos opiáceos⁷. Outros autores observaram ainda uma regulação positiva da expressão proteica de DOR nos gânglios raquidianos de ratos com lesão de um nervo periférico⁸. Além disso, nesses mesmos animais, a administração periférica de um agonista do DOR atenuou a diminuição dos limites de sensibilidade mecânica induzidos pela condição neuropática⁸.

Após clonagem do DOR⁹, a expressão do seu ARNm foi mapeada no SNC do rato¹⁰. Ainda assim, não existem estudos que analisem a ex-

pressão do ARNm do DOR em condições de dor crónica inflamatória em núcleos do tálamo e tronco cerebral especificamente envolvidos nos mecanismos de processamento da dor, embora seja amplamente reconhecido que a dor crónica inflamatória induz diferentes tipos de alterações plásticas em muitas regiões do SNC¹¹. Assim, foram observados aumentos da actividade metabólica neuronal em situações de dor crónica inflamatória¹² e neuropática¹³, em muitas regiões implicadas no processamento do afluxo nócico. Num desses estudos, as alterações de actividade neuronal, observadas em muitas regiões do encéfalo de ratos com monoartrite (MA) induzida experimentalmente, não foram lineares relativamente à progressão da doença, sugerindo uma interacção entre mecanismos excitatórios e inibitórios de transmissão nociceptiva¹². Para além disso, as expressões do ARNm de vários subtipos de receptores metabotrópicos do glutamato¹⁴ e das subunidades dos receptores GABA_B^{15,16} sofreram regulações em núcleos específicos do tálamo que foram dependentes do tempo de progressão da MA, indicando que esses receptores deverão participar na resposta neuronal ao afluxo nócico crónico. Ainda assim é necessário avaliar o possível papel de outros receptores de neurotransmissores nesses mecanismos e o DOR, pelas razões acima descritas, é um possível candidato. No estudo em causa, foi então avaliada a expressão do ARNm do DOR durante a evolução da MA, em regiões do tálamo e tronco cerebral do rato envolvidas na nocicepção, através do uso de técnicas de hibridação *in situ*.

Materiais e métodos

Animais

Ratos Wistar adultos machos (Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, Portugal) pesando entre 250 e 300 g foram alojados em gaiolas com água e alimento *ad libitum* e mantidos a uma temperatura constante de 22 °C e luminosidade controlada (ciclos de 12 h luz/12 h escuridão).

Em todas as experiências foram seguidos os regulamentos das autoridades locais relativos ao manuseamento de animais de laboratório bem como as normas éticas para o estudo de dor experimental em animais conscientes¹⁷ e a directiva 86/609/EEC da União Europeia.

Indução da inflamação crónica

A MA foi induzida sob anestesia volátil (isoflurano) por injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund's (CFA) na articulação tibio-társica esquerda de acordo com o método descrito por Butler, et al.¹⁸ e os animais foram sacrificados 2, 4, 7 e 14 dias após a injeção (n = 6 por grupo experimental). A evolução da reacção inflamatória foi monitorizada diariamente usando uma escala subjectiva, onde zero significa que não há sinais de inflamação e quatro indica que há uma inflamação severa com repercussões na actividade motora do animal¹⁹. Todos os animais que desenvolveram sinais de poliartrite foram excluídos do estudo. Um grupo de animais controlo (n = 6) foi injectado de modo semelhante com soro fisiológico e sacrificado após dois dias.

Preparação das sondas de ribonucleótidos

Um plasmídeo contendo o ADNc para o DOR de rato foi gentilmente cedido pelo Professor Huda Akil do *Mental Health Research Institute* da Universidade do Michigan. O ADNc foi amplificado pela reacção da polimerase em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e o fragmento de 985 pb resultante (402-1.386 pb, *Genbank Acession #D163489*) foi clonado num vector plasmídico (pCR2.1) contendo o promotor T7 da ARN polimerase para produção, por transcrição *in vitro* (kit T7, Promega), da sonda de ARNc contra o DOR marcada radioactivamente com [μ -³⁵S]-UTP (1.200 Ci/mmol; PerkinElmer). A incorporação da radioactividade foi determinada por contagem de cintilação.

Preparação do tecido e hibridação *in situ*

Os cérebros foram rapidamente dissecados, congelados em gelo seco e armazenados a -80 °C. Foram seccionadas fatias coronais do encéfalo (14 μ m de espessura) num criostato a -20 °C, montadas em lâminas de vidro revestidas com poli-L-lisina e depois fixadas em 4% paraformaldeído (PFA, 5 min) a 4 °C, lavadas em 1x tampão fosfato salino (PBS), desidratadas e armazenadas em etanol 96% a 4 °C^{14,20}. A hibridação *in situ* radioactiva foi realizada de acordo com o método descrito por Mansour, et al.¹⁰. No dia da hibridação *in situ* o tecido foi rapidamente hidratado em 96, 70 e 30% etanol e depois fixado durante uma hora em 4% PFA. Os cortes foram então lavados três vezes em 2x SSC (citratado salino de sódio) pH 7,0, e posteriormente foram tratados com proteinase K (1 μ g/ml em 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) durante 15 minu-

tos a 37 °C. Seguidamente mergulharam-se as lâminas em H₂O, lavaram-se com trietanolamina 0,1 M pH 8,0, depois com uma solução de trietanolamina 0,1 M pH 8,0 e anidrido acético (400:1) e por fim, com H₂O tratada durante dois minutos. Finalmente, os cortes foram desidratados por lavagens em soluções de etanol de concentração crescente. As lâminas secaram ao ar. As sondas de ARN foram aquecidas a 65 °C durante três minutos e depois foram diluídas em tampão de hibridação (75% formamida, 10% dextrano sulfato, 3x SSC, 50mM Na₂PO₄, pH 7,4, 1x Denhardt's, 0,1 mg/ml tARN de bactéria, 10 mM ditiotreitol) obtendo-se uma concentração final na ordem de 10⁶ cpm/100 μ l. Os cortes coronais seriados de encéfalo de ratos controlo e com 2, 4, 7 e 14 dias de MA foram então hibridados (100 μ l sonda/lâmina) durante a noite em câmaras humidificadas (50% formamida, 4x SSC). Após lavagens estridentes em SSC e desidratação, as lâminas foram embebidas em emulsão fotográfica NTB2 Kodak diluída em 0,5% de glicerol em água destilada e expostas durante 15 dias numa caixa à prova de luz. As fatias foram reveladas com D-19 (Kodak, USA), fixadas e coradas com tionina para análise em microscopia óptica de campo claro e escuro. 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

A análise quantitativa da expressão de ARNm para o DOR foi determinada em núcleos talâmicos e do tronco cerebral envolvidos na transmissão e/ou modulação (facilitatória ou inibitória) da nocicepção. Foram analisadas quatro regiões talâmicas, nomeadamente o complexo ventrobasal (VB), o núcleo posterior (Po), os núcleos centro-medial/centrolateral (CM/CL) e o núcleo reticular (Rt) do tálamo, e três núcleos do tronco cerebral, o reticular dorsal (DRt), o reticular lateral (LRt) e o reticular parvicelular (PCRt). A delimitação dos núcleos foi feita de acordo com o atlas do encéfalo de rato de Paxinos e Watson²¹ em cortes coronais seriados. A quantificação foi feita a três níveis rostrocaudais em todos os núcleos cuja extensão compreende esses três níveis, tal como anteriormente descrito¹⁴. Em concordância com estudos prévios¹⁴, a razão entre a área ocupada pelos grãos de prata e a área total ocupada pelas células (valores de densidade de grãos) foi calculada em cada região separadamente nos lados ipsi e contralateral à pata injectada, usando um sistema de captação e análise de imagem computadorizado (Optimas-Bioscan, USA) acoplado a um microscópio Leica Axioplan e a uma câmara de vídeo (Sony Hyper HAD *Digital Colour*). Todas as imagens do mesmo

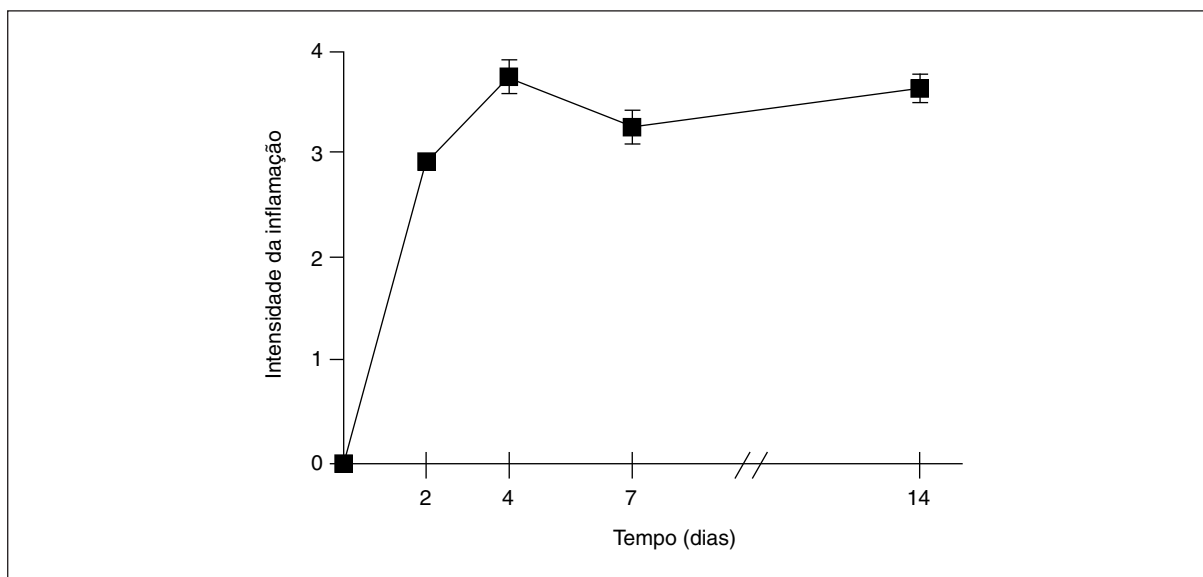


Figura 1. Avaliação da intensidade da inflamação (média ± desvio padrão da média) dos animais com MA, antes da injeção de CFA (tempo 0) e aos 2, 4, 7 e 14 dias de inflamação ($n = 6$ por grupo experimental). A evolução da reacção inflamatória foi monitorizada diariamente de acordo com Castro-Lopes, et al.¹⁹, a cada tempo de inflamação antes dos animais serem sacrificados. Aos dois dias após a injeção de CFA todos os ratos já evidenciavam uma reacção inflamatória grave restrita à articulação artrítica que foi também observável aos 4, 7 e 14 dias de MA.

núcleo a diferentes níveis rostrocaudais foram analisadas individualmente e foi calculada a média dos resultados para cada animal dos diferentes grupos experimentais. Os valores de fundo foram determinados ao acaso nas imagens analisadas, no neurópilo onde, muito provavelmente, não ocorreu marcação específica. Subsequentemente, os valores individuais médios obtidos foram divididos pelos valores de fundo e apresentados como «número de vezes acima dos valores de fundo».

Os números finais de expressão do ARNm do DOR para cada região analisada em cada um dos grupos experimentais, expressos em densidade de grãos de prata, foram obtidos fazendo-se a média dos valores individuais de cada animal de cada grupo ($n = 6$) e são apresentados como a média ± erro padrão da média do número de vezes acima dos valores do fundo a que o ARNm do DOR 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. Em cada região analisada, a expressão de ARNm do DOR para os ratos controlo, 2, 4, 7 e 14 dias de MA foram comparados através de uma análise de variância (ANOVA) para cada região analisada, seguida do teste *post-hoc* LSD. Foi aceite um valor de significância de $p < 0,05$.

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, os animais MA mostraram respostas fisiopatológicas e comportamentais que seguiram um padrão temporal já anteriormente descrito nesses animais^{15,16}, evidenciando uma reacção inflamatória restrita à pata inflamada, edema intenso e um comportamento de defesa, com flexão persistente da articulação injectada (Fig. 1), principalmente no grupo de animais com 14 dias de inflamação.

Expressão do ARNm para o DOR

Em animais controlo, a expressão do ARNm para o DOR foi fraca a moderada em todas as regiões talâmicas analisadas, tendo-se detectado valores médios de $1,7 \pm 0,1$ no VB, $1,8 \pm 0,1$ no Po, $1,9 \pm 0,1$ no CM/CL e $2,0 \pm 0,1$ no Rt (média dos valores obtidos ipsi e contralateralmente ± SEM, número de vezes acima dos valores de fundo) (Fig. 2). No tronco cerebral, a expressão do ARNm para o DOR foi fraca a moderada nos três núcleos estudados, tendo-se obtido valores médios de $1,9 \pm 0,1$ no PCRt, $2,0 \pm 0,1$ no DRt e $2,3 \pm 0,1$ no LRT (média dos valores obtidos ipsi e contralateralmente ± SEM, número de vezes acima dos valores de fundo) (Fig. 2). Não foram detectadas diferenças significativas na distribuição da expressão do ARNm para o DOR ao longo da extensão rostrocaudal dos núcleos analisados nem entre os lados ipsi e contralateral (*Student t-test*). Através da coloração de Nissl, verificou-se que a expressão do ARNm para o DOR se encontrava, aparentemente, restrita às células neuronais em todos os núcleos analisados.

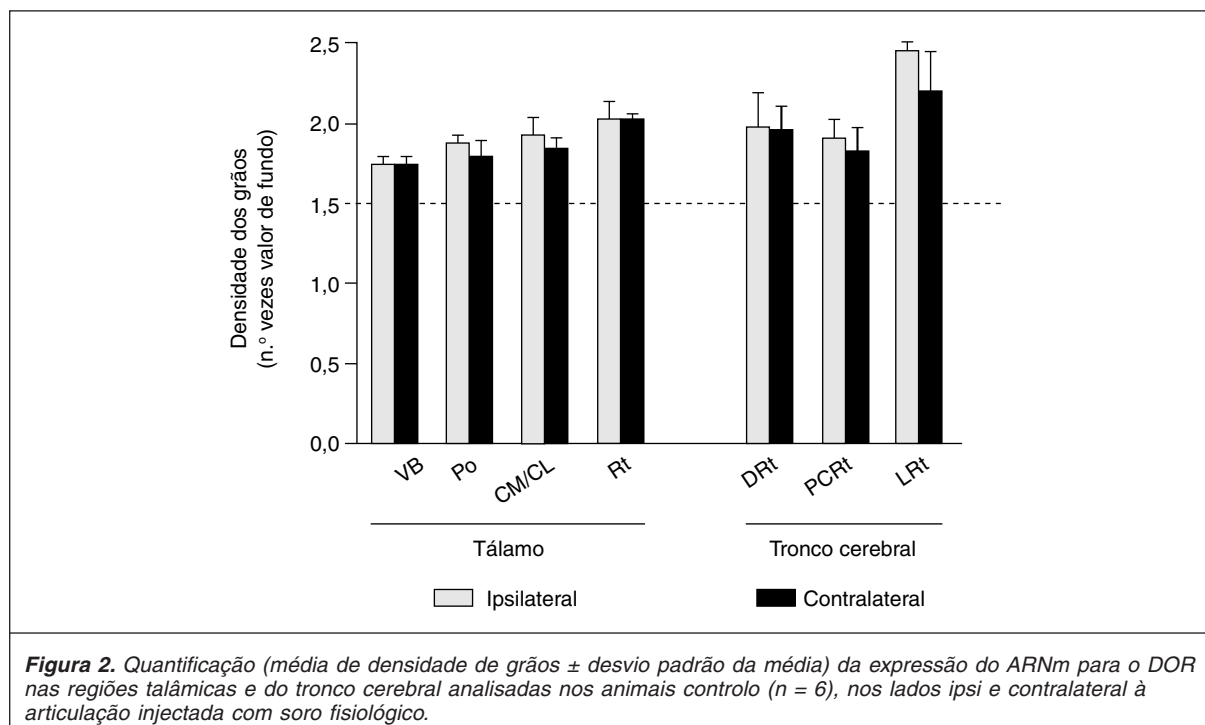


Figura 2. Quantificação (média de densidade de grãos \pm desvio padrão da média) da expressão do ARNm para o DOR nas regiões talâmicas e do tronco cerebral analisadas nos animais controlo ($n = 6$), nos lados ipsi e contralateral à articulação injectada com soro fisiológico.

Em ratos MA, a expressão do ARNm para o DOR sofreu alterações significativas que foram dependentes da região e do tempo de inflamação. Assim, foi detectada uma diminuição estatisticamente significativa de 22% em relação aos animais controlo ($p < 0,01$, análise *post-hoc* LSD) no Rt contralateral à articulação afectada nos animais com 7 e com 14 dias de MA (Figs. 3 e 4). No Rt ipsilateral, assim como bilateralmente em todos os outros núcleos talâmicos analisados, não foram observadas alterações estatisticamente significativas em nenhum dos tempos de inflamação analisados (Fig. 3). No tronco cerebral, foi observado um padrão temporal da expressão do ARNm para o DOR em alguns núcleos do bolbo raquidiano de ratos MA. Assim, não foram detectadas alterações aos 2 e 4 dias de doença, mas estas foram seguidas de aumentos aos 7 dias e de um retorno para os níveis de expressão de ARNm dos animais controlo ou uma diminuição aos 14 dias após a injeção de CFA. Este padrão, embora detectável, nem sempre foi estatisticamente significativo. Reduções da expressão do ARNm para o DOR estatisticamente significativas foram observadas no DRt somente aos 14 dias de MA, em ambos os lados ipsi e contralateral à pata artrítica (37 e 34% de decréscimo em relação aos controlo, respectivamente, $p < 0,05$, análise *post-hoc* LSD), enquanto que os aumentos aos 7 dias não atingiram significância estatística (Fig. 3). No PCRt, pelo contrário, foi detectado um aumento da expressão aos 7 dias, que foi estatisticamente significativo contralateralmente (+ 39% em relação aos controlo, $p < 0,05$, análise *post-hoc* LSD), enquanto que foram obser-

vados decréscimos aos 14 dias mas que não foram estatisticamente significativos (Fig. 3). Finalmente, foi observado o mesmo padrão temporal no LRt, mas nem os aumentos aos 7 dias nem os decréscimos aos 14 dias atingiram significância estatística.

Discussão

No presente estudo, uma expressão basal do ARNm para o DOR fraca a moderada foi observada em todas as regiões talâmicas e do tronco cerebral analisadas em animais normais. No tálamo, a marcação mais elevada foi encontrada no Rt, enquanto que no tronco cerebral foi o LRt que exibiu uma maior marcação de grãos de prata. Estes resultados estão de acordo com um estudo de hibridação *in situ* prévio no rato onde foi detectada uma expressão basal baixa do ARNm para o DOR na maioria dos núcleos do tálamo, com uma localização preferencial de células marcadas no Rt (juntamente com outras quatro regiões que não foram analisadas no presente estudo), e níveis moderados a elevados no LRt¹⁰. No entanto, a comparação directa da quantidade relativa de ARNm é difícil de efectuar uma vez que o sinal de hibridação *in situ* está dependente da actividade específica das sondas marcadas radioactivamente assim como da eficiência de hibridação e/ou degradação/preservação do ARNm^{20,22}. Estudos auto-radiográficos de ligação detectaram também uma densidade de ligação ao receptor DOR fraca a moderada na maioria do tálamo e tronco cerebral²³. No entanto, em alguns núcleos do tronco cerebral, dos quais o LRt é um exemplo, parece existir uma

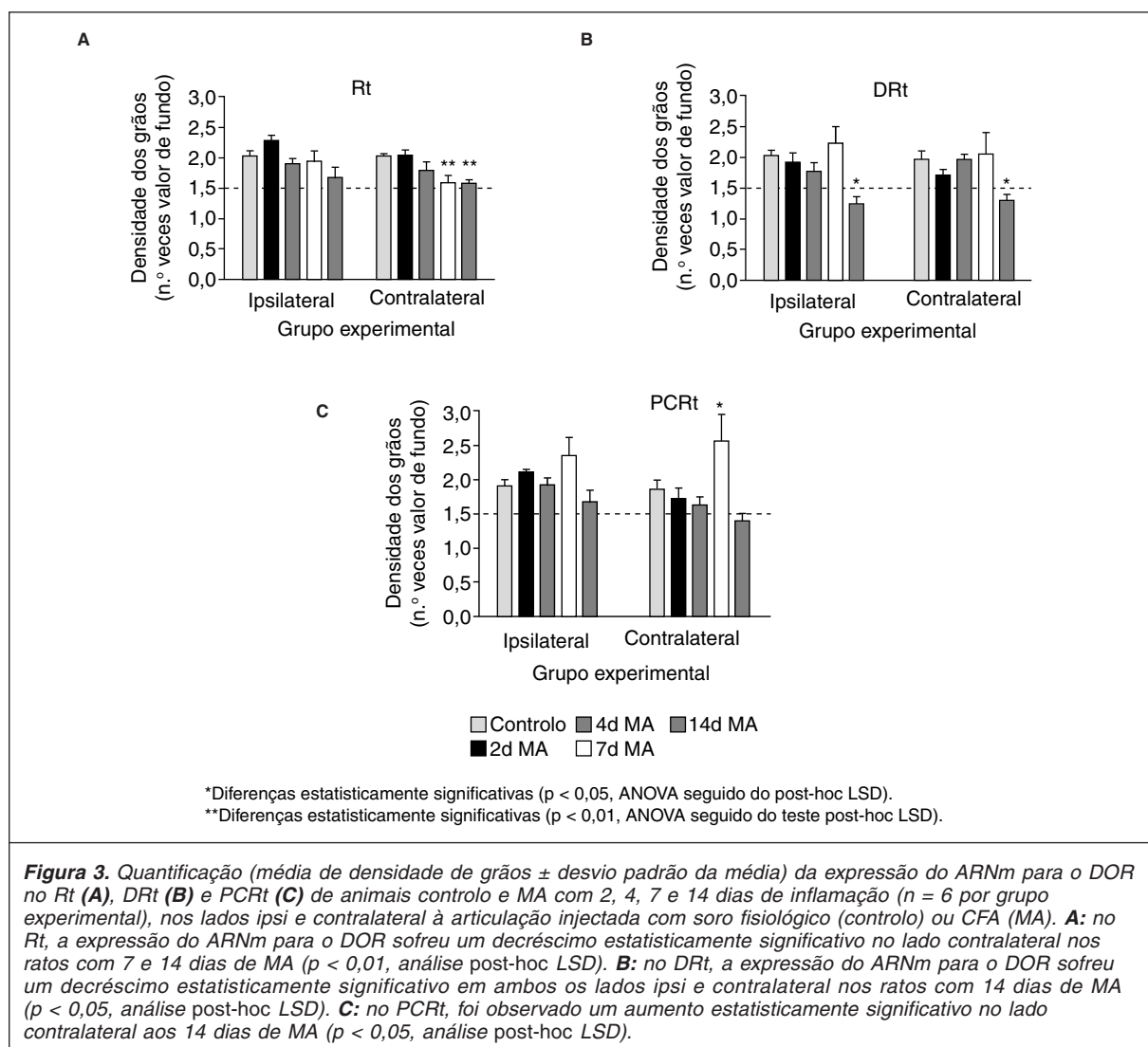


Figura 3. Quantificação (média de densidade de grãos \pm desvio padrão da média) da expressão do ARNm para o DOR no Rt (**A**), DRt (**B**) e PCRt (**C**) de animais controle e MA com 2, 4, 7 e 14 dias de inflamação ($n = 6$ por grupo experimental), nos lados ipsi e contralateral à articulação injectada com soro fisiológico (controlo) ou CFA (MA). **A:** no Rt, a expressão do ARNm para o DOR sofreu um decréscimo estatisticamente significativo no lado contralateral nos ratos com 7 e 14 dias de MA ($p < 0,01$, análise post-hoc LSD). **B:** no DRt, a expressão do ARNm para o DOR sofreu um decréscimo estatisticamente significativo em ambos os lados ipsi e contralateral nos ratos com 14 dias de MA ($p < 0,05$, análise post-hoc LSD). **C:** no PCRt, foi observado um aumento estatisticamente significativo no lado contralateral aos 14 dias de MA ($p < 0,05$, análise post-hoc LSD).

certa discrepância entre a expressão de ARNm para o DOR e a intensidade de ligação ao receptor. Isto poderá reflectir não só as desvantagens da metodologia experimental usada como também o transporte do receptor para locais distantes do local de síntese²³. Para além disso, em algumas áreas antinociceptivas do tronco cerebral, parece não haver uma total concordância entre a intensidade de ligação ao radioligando e a intensidade de ligação funcional, sendo esta avaliada pela resposta ao [³⁵S]GTP γ S, o que possivelmente reflecte uma heterogeneidade regional de acoplamento do receptor à proteína G e/ou alguma heterogeneidade na localização subcelular de DOR²⁴.

É amplamente reconhecido que em condições de dor inflamatória crónica ocorrem várias alterações plásticas, incluindo na expressão de receptores de neurotransmissores a diferentes níveis das vias nociceptivas^{11,14-16,25-32}. No que diz respeito ao sistema opioidérgico em particular, essas alterações encontram-se documentadas especialmente ao nível dos aferentes primários

e medula espinhal^{26,28,29,31,32} e não tanto em regiões supra-espinhais³⁰. Para além disso, existem alguns dados contraditórios relativamente à medula espinhal^{26,29,33}. Em regiões supra-espinhais, não foram detectadas alterações na actividade da proteína G mediada pelo MOR ou DOR em muitas regiões do encéfalo, incluindo o *caudate-putamen*, tálamo medial e substância periaquedutal cinzenta de ratos poliartíticos³⁴. De modo similar, não foram encontradas alterações na densidade total de ligação de opióides no tálamo ou mesencéfalo de ratos artríticos com três semanas de doença, mas foi detectado um decréscimo relativo da proporção de KOR comparativamente a MOR no tálamo, sugerindo um decréscimo relativo de KOR³⁰. Neste estudo, relatamos decréscimos contralaterais da expressão do transcripto para o DOR detectados no Rt, um núcleo talâmico, de ratos MA com 7 e 14 dias de doença. Para além disso, no tronco cerebral, foram observados decréscimos bilaterais no DRt aos 14 dias de inflamação, enquanto que no PCRt de ratos com 7 dias de MA foram

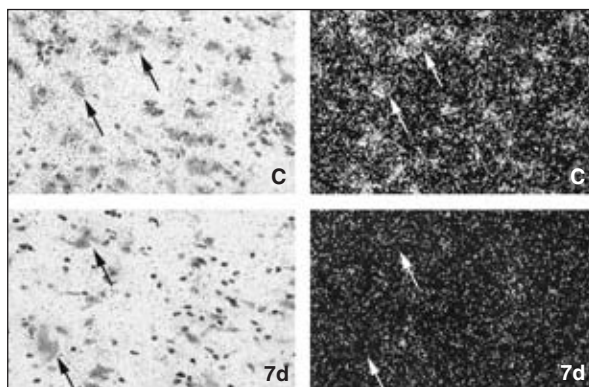


Figura 4. Imagens digitalizadas de microscopia de campo claro (coluna esquerda) e a sua correspondente em campo escuro (coluna direita), de grande ampliação, de fatias de tálamo expostas a uma emulsão fotográfica onde se mostra a expressão do ARNm para o DOR no Rt contralateral à pata injectada em animais controlo (c) e em ratos monoartríticos com 7 dias (7d). As setas apontam para neurónios que expressam o ARNm para o DOR.

detectados aumentos significativos contralateralmente. Ambos os Rt^{35,36} e DRt^{37,38} foram anteriormente implicados nos mecanismos de processamento da dor. O PCRt pertence às áreas motoras extrapiramidais, mas projecta intensamente para o DRt³⁹ sendo por isso possível que esteja a influenciar as reacções motoras à estimulação nóxica através do DRt, um núcleo pró-nociceptivo do tronco cerebral. De facto, vale a pena mencionar que foi observado um aumento da actividade metabólica neuronal no PCRt de ratos com dor crónica inflamatória ou neuropática^{12,13}. Sendo assim, as alterações de expressão do ARNm observadas neste estudo muito possivelmente reflectem uma resposta do sistema nociceptivo à condição de dor inflamatória crónica. É pouco provável que essas alterações sejam sistémicas ou não específicas uma vez que noutros núcleos analisados, que estão profundamente envolvidos no processamento da dor, como o VB ou o Po^{11,40}, não foram detectadas quaisquer alterações na expressão do ARNm para o DOR, sugerindo que a expressão de DOR não é modulada nessas regiões em condições de dor inflamatória crónica. De modo interessante, no mesmo modelo de MA foram anteriormente relatados aumentos significativos da expressão do ARNm do subtipo 3 de receptores metabotrópicos do glutamato (mGluR3) no Rt¹⁴, enquanto que não foram detectadas alterações para os transcriptos das subunidades do receptor GABA_B^{15,16}. É importante, no entanto, verificar se essas alterações na expressão do ARNm têm paralelo nos níveis proteicos.

Nas últimas décadas, houve um aumento substancial de interesse à volta do DOR e do seu uso potencial no tratamento da dor crónica devido à constatação de que os seus ligandos têm efeitos secundários menos graves. Estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que a administração

de agonistas selectivos para o receptor δ produzem antinocicepção e analgesia em várias condições de dor crónica, incluindo inflamatória, neuropática e tumoral⁴¹. Existe evidência de que a activação de DOR pré-sináptico por agonistas específicos pode inibir a libertação de GABA em algumas regiões do tronco cerebral envolvidas na modulação da dor^{42,43}. No *Locus coeruleus*, por exemplo, foi demonstrado que a activação de DOR pré-sináptico excita uma população de neurónios que projectam para a medula espinhal através da inibição da libertação de GABA, provocando desta forma um aumento da libertação de norepinefrina e analgesia⁴³. Noutras regiões do tronco cerebral, como o bolbo ventrolateral rostral, a localização pré-sináptica de DOR também sugeriu que a sua activação por agonistas endógenos ou exógenos possa modular a libertação de neuropeptídeos⁴⁴. Assim, se também se verificarem ao nível proteico, as alterações da expressão do ARNm para o DOR detectadas no presente estudo no Rt, no DRt e no PCRt de ratos MA, poderão também estar relacionadas com mecanismos similares de inibição da libertação de neurotransmissores mediados pelo DOR, que poderão ser iniciados ou estar potenciados em situações em que ocorra aumento do afluxo nóxico oriundo da periferia, tal como o originado pela MA. Ma, et al.⁴² demonstraram também que em alguns núcleos do tronco cerebral muito implicados na analgesia opióide, os agonistas do DOR foram eficazes tanto na inibição da libertação de GABA pré-sináptico, como na mediação de analgesia em ratos tolerantes a morfina. No entanto, o mesmo não aconteceu com ratos aos quais nunca tinha sido administrado um opióide, sugerindo portanto ser necessária uma interacção funcional entre MOR e DOR. Esta interacção parece ser crucial uma vez que foi detectado um aumento significativo da expressão da proteína do DOR tanto em preparações de membranas de *Western blot* como em varicosidades imunorreactivas de tecido do tronco cerebral obtido de ratos tolerantes a morfina por oposição ao obtido de ratos nunca expostos a opióides⁴². Esta sinergia entre os sistemas do MOR e do DOR tinha já sido anteriormente proposta por Qiu, et al.⁴⁵, face a resultados obtidos com ratinhos *knock-out* para o MOR sujeitos a uma injeção intraplantar de CFA, que sugeriram que o MOR possa estar envolvido na persistência da hiperalgesia inflamatória, e que na ausência desses receptores é activado um mecanismo compensatório mediado pelo DOR em resposta ao afluxo nóxico contínuo. Em vista disto, tem sido sugerido que o endereçamento e tráfego do DOR para a membrana celular é crucial à analgesia e tolerância mediada por opióides^{7,41}.

No presente estudo, as alterações de expressão do ARNm para o DOR só foram detectadas nos últimos tempos de inflamação. Este padrão temporal de alterações poderá ser possivelmente

explicado pela necessidade de interacção entre os sistemas MOR e DOR, que poderia estar a ocorrer presumivelmente com maior intensidade nos tempos mais iniciais da doença. De facto, existem dados comprovando uma regulação positiva dos locais de ligação ao MOR, do acoplamento às proteínas G e da imunoreactividade, em neurónios aferentes primários observados aos quatro dias de uma inflamação da pata posterior induzida por injeção de CFA⁴⁶. Para além disso, estudos semelhantes demonstraram que esta regulação positiva foi dependente do tempo de inflamação, atingindo picos às 24 h em animais estudados até aos quatro dias de inflamação³³, enquanto que foi detectada uma regulação positiva bifásica da expressão do ARNm do MOR, com um pico inicial às 1-2 h e um aumento mais tardio às 96 h (quatro dias) nos gânglios raquidianos ipsilaterais³¹. É claro que se mantém ainda a questão de se saber se essas alterações iniciais da expressão do ARNm para o MOR são também observáveis em ratos monoartríticos em centros mais elevados das vias nociceptivas como é o caso do tronco cerebral e do tálamo, uma vez que essa análise não foi efectuada no presente estudo e não temos conhecimento de que esses estudos alguma vez tenham sido relatados.

Em conclusão, neste estudo relatamos que animais sofrendo de MA, uma condição de dor inflamatória crónica, têm alterações significativas da expressão do ARNm para o DOR detectadas num núcleo específico do tálamo, o Rt, que filtra a transferência de informação sensitiva entre o restante tálamo e o córtex cerebral, assim como em dois núcleos do tronco cerebral, o DRt, uma região que pertence à via nociceptiva de modulação descendente facilitatória, e o PCRt. Essas alterações representam, muito possivelmente, uma resposta plástica do sistema nociceptivo ao aumento do afluxo nócico, mas são necessários estudos que analisem a expressão proteica, assim como estudos funcionais e electrofisiológicos, de modo a se compreender melhor o papel dos DOR nas alterações funcionais que estão na base (ou são resultantes) do processamento da dor crónica inflamatória ao nível do tálamo e do tronco cerebral.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e FEDER, Portugal, no âmbito do projecto POCTI/1999/NSE/32375. Os autores agradecem ao Professor Huda Akil do *Mental Health Research Institute*, Universidade do Michigan, USA, pela cedência do plasmídeo contendo o ADNc para o receptor opióide δ de rato.

Referências

- King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F, Lai J. Is Paradoxical Pain Induced by Sustained Opioid Exposure an Underlying Mechanism of Opioid Antinociceptive Tolerance? *Neurosignals* 2005;14:194-205.
- Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nature Neurosci Rev* 2004;5:565-75.
- Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:79-91.
- Bailey CP, Connor M. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:60-8.
- Gallantini EL, Meert TF. A Comparison of the Antinociceptive and Adverse Effects of the μ -Opioid Agonist Morphine and the δ -Opioid Agonist SNC80. *Basic & Clin Pharmacol & Toxicol* 2005;97:39-51.
- Ananthan S. Opioid Ligands With Mixed μ/δ Opioid Receptor Interactions: An Emerging Approach to Novel Analgesics. *AAPS Journal* 2006;8:E118-25.
- Zhang X, Bao L, Guan J-S. Role of delivery and trafficking of δ -opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:324-9.
- Kabli N, Cahill CM. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain* 2007;127:84-93.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H. Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes. *FEBS Lett* 1993;327:311-4.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, et al. Mu, Delta, and Kappa Opioid Receptor mRNA Expression in the Rat CNS: An *In Situ* Hybridization Study. *J Comp Neurol* 1994;350:412-38.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57:1-164.
- Neto FL, Schadrack J, Ableitner A, et al. Tölle, Supraspinal metabolic activity changes in the rat during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience* 1999;94:607-21.
- Mao J, Mayer DJ, Price DD. Patterns of increased brain activity indicative of pain in a rat model of peripheral mononeuropathy. *J Neurosci* 1993;13:2689-702.
- 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.
- 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.
- 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;71:252-8.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-10.
- 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.
- 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 hind limb in the rat. *Eur J Neurosci* 1992;4:296-301.
- 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.
- Paxinos G, Watson W. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1998.
- O'Shea RD, Gundlach AL. Quantitative analysis of in situ hybridization histochemistry. Em: Wisden W, Morris BJ, eds. *In Situ Hybridization Protocols for the Brain*. London: Academic Press; 1994. p. 57-78.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid Receptor mRNA Expression in the Rat CNS: anatomical and functional implications. *TINS* 1995;18:22-9.
- Pradhan AAA, Clarke PBS. Comparison between δ -opioid receptor functional response and autoradiographic labeling in rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 2005;481:416-26.
- Boxall SJ, Berthele A, Laurie DJ, et al. Enhanced expression of metabotropic glutamate receptor 3 messenger RNA in the rat spinal cord during ultraviolet irradiation induced peripheral inflammation. *Neuroscience* 1998;82:591-602.
- Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnel D, Beaudet A. Up-regulation and trafficking of δ opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 2003;101:199-208.
- Dolan S, Kelly JG, Monteiro AM, Nolan AM. Up-regulation of metabotropic glutamate receptor subtypes 3 and 5 in spinal cord in a clinical model of persistent inflammation and hyperalgesia. *Pain* 2003;106:501-12.
- Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L. Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 1998;82:559-74.
- Maekawa K, Minami M, Masuda T, Satoh M. Expression of μ -, κ -, but not δ -opioid receptor mRNAs is enhanced in the spinal dorsal horn of the arthritic rats. *Pain* 1995;64:365-71.

30. Millan MJ, Millan MH, Czlonkowski A, et al. A model of chronic pain in the rat: response of multiple opioid systems to adjuvant-induced arthritis. *J Neurosci* 1986;6:899-906.
31. Puehler W, Zollner C, Brack A, et al. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience* 2004;129:473-9.
32. Puehler W, Rittner HL, Mousa SA, et al. Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. *Neuroscience* 2006;141:989-98.
33. Shaqura MA, Zollner C, Mousa SA, Stein C, Schafer M. Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:712-18.
34. Cichewicz DL, Cox ML, Welch SP, Selley DE, Sim-Selley LJ. Mu and delta opioid-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in brain and spinal cord of polyarthritic rats. *Eur J Pharmacol* 2004;504:33-8.
35. Pechanski M, Guilbaud G, Gautron M. Neuronal responses to cutaneous electrical and noxious mechanical stimuli in the nucleus reticularis thalami of the rat. *Neurosci Lett* 1980;20:165-70.
36. Yen C-T, Shaw F-Z. Reticular thalamic responses to nociceptive inputs in anesthetized rats. *Brain Res* 2003;968:179-91.
37. Lima D, Almeida A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog Neurobiol* 2002;66:81-108.
38. Vanegas H, Schaible H-G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev* 2004;46:295-309.
39. 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.
40. 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.
41. Cahill CM, Holdridge SH, Morinville A. Trafficking of δ -opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:23-31.
42. Ma J, Zhang Y, Kalyuzhny AE, Pan ZZ. Emergence of functional delta-opioid receptors induced by long-term treatment with morphine. *Mol Pharmacol* 2006;69:1137-45.
43. Pan YZ, Li DP, Chen SR, Pan HL. Activation of delta-opioid receptors excites spinally projecting locus coeruleus neurons through inhibition of GABAergic inputs. *J Neurophysiol* 2002;88:2675-83.
44. Milner TA, Drake CT, Aicher SA. C1 adrenergic neurons are contacted by presynaptic profiles containing DELTA-opioid receptor immunoreactivity. *Neuroscience* 2002;110:691-701.
45. Qiu C, Sora I, Ren K, Uhl G, Dubner R. Enhanced δ -opioid receptor-mediated antinociception in μ -opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2000;387:163-9.
46. Zollner C, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C, Schafer M. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* 2003;64:202-10.