

Mensagem do Presidente da APED	3
Editorial	5
TRPV1 e Dor Visceral	6
O Marcador de Lesão Neuronal ATF-3 é Expresso nos Neurónios Aferentes Primários de Ratos Monoartríticos	12
Neuropatia Periférica Induz Instabilidade na Codificação de Informação Espacial Pelas <i>Place Cells</i> da Área CA1 do Hipocampo Dorsal	24
Os Efeitos da Neuropatia Diabética em Componentes Centrais do Sistema de Modulação da Dor	35



DOR[®]

ISSN: 0872-4814

Órgão de Expressão Oficial da APED

Volume 20 • N.º 2/2012

Director da revista

Silvia Vaz Serra

Editores

Armanda Gomes
Ananda Fernandes
Graça Mesquita

Mensagem do Presidente da APED Duarte Correia	3
Editorial Fani Neto	5
TRPV1 e Dor Visceral Ana Charrua, A. Avelino e F. Cruz	6
O Marcador de Lesão Neuronal ATF-3 é Expresso nos Neurónios Aferentes Primários de Ratos Monoartríticos Diana Sofia Marques Nascimento, Daniel Humberto Pozza, José Manuel Castro-Lopes e Fani Lourença Moreira Neto	12
Neuropatia Periférica Induz Instabilidade na Codificação de Informação Espacial Pelas <i>Place Cells</i> da Área CA1 do Hipocampo Dorsal Helder Cardoso-Cruz, Deolinda Lima e Vasco Galhardo	24
Os Efeitos da Neuropatia Diabética em Componentes Centrais do Sistema de Modulação da Dor Carla Morgado e Isaura Tavares	35

Ilustração da capa: Zé Pedro



PERMANYER PORTUGAL
www.permanyer.com

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 ou 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: **ORIGINAIS** - 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.

Currículo da autora da capa

Nome artístico: Zé Pedro. Data de nascimento: 11/05/1967. Galerias Brasil (Piso 2, Sala 20). Av. Manuel Pereira Soares. 4630-207 Marco de Canaveses. Portugal. Tel.: 255 531 728/968 084 219. E-mail: zepedroscp@mail.tmn.pt.

Em 1994/1995, frequentou o curso livre de Pintura e Desenho, da Cooperativa Árvore. Profs.: Sobral Centeno e Mário Bismark. Em 1999/2000, teve aulas com Jorge Figueira. Em 2000/2001, frequentou o curso livre de Pintura e Desenho da Galeria OM (Penafiel). Prof.: Gracinda Ramos. Em 2001/2002, 2002/2003, frequentou o curso livre de Pintura e Desenho do Atelier Rui Alberto. Prof.: Sílvia Carreira.

Exposições colectivas: 2010: II Coletiva Artistas Do Marco – Museu Municipal Marco de Canaveses. 2009: Coletiva2009, Vício das Letras – Santa Maria da Feira; 2.ª Semana da Cultura, Sande – Marco de Canaveses. 2008: 1.ª Exposição coletiva da Associação de Artistas do Marco de Canaveses. 2007: 2.ª Feira Cultural de Soalhães – Marco de Canaveses. 2006: Vício da pintura – Vício das Letras – Santa Maria da Feira; IV Ciclo de Apresentações Artísticas Penafiel/2006. 2.ª Exposição.; Pintura de um de 12 painéis alusivos ao 25 de Abril – Projeto orientado pela Câmara Municipal de Marco de Canaveses. 2005: Dia Mundial da Criança – Projeto Cor é Vida – Marco de Canaveses; XXII Coletiva dos Sócios da Árvore – Porto. 2004: Artistas de Gondomar 2004; Em Favor da Palestina – Leilão organizado pela Árvore. 2003: A Arte nas Terras Raianas (P. Salúquia) – Moura; AGIRARTE/06 – Oliveira do Hospital; III Bienal de Artes Plásticas (Prémio Thomaz de Mello) – Nazaré. 2002: *III Certamen de pintura El Pincel Verde* – Leganés/Madrid, Espanha; VII Prémio Vespeira – Montijo; Artistas de Gondomar, 2002; MAGIC/Atelier Rui Alberto: Galeria Nave – Matosinhos; II Bienal de Pintura, Arte Jovem de Penafiel; A Arte nas Terras Raianas (P. Salúquia) – Moura. 2001: *VII Mostra União Fenosa* – Corunha, Espanha. 2000: XVIII Coletiva dos Sócios da Árvore – Porto; Galeria OM – Penafiel; I Bienal de Pintura, Arte Jovem de Penafiel. 1999: XVII Coletiva dos Sócios da Árvore – Porto. 1995: Ordem dos Médicos Dentistas – Santa Maria da Feira

Individuais: 2010: Já é Natal – Vício das Letras – Santa Maria da Feira. 2009: Letras, notas e bolas – Vício das Letras – Santa Maria da Feira. 2008: Todos os Caminhos vão dar aos corações III – Guimarães. 2007: As Descobertas – Museu Carmen Miranda – Marco de Canaveses; Todos os caminhos vão dar aos corações II – Vício das Letras – Feira, 2006: Todos os caminhos vão dar aos corações – Vício das Letras – Feira. 2006: O Repórter – Galeria A Academia – Porto; Dunas – Restaurante – Mindelo. 2005: Espaço Artes – Câmara Municipal Lousada; Restaurante Donna Pasta – Marco de Canaveses. 2004: Panda Line – Galeria Bar – Oliveira do Hospital; Valentinos Bar/Galeria – Porto; Motor Clube do Marco; Centro Cultural de Alfena. 2003: Motor Clube do Marco. 2001: Associação Nacional de Jovens Empresários (ANJE) – Porto; Galeria Bar Actos – Porto. 1999: Câmara Municipal de Cinfães; Galeria Bar Actos – Porto

Museus em que está representado: Museu Serpa Pinto – Cinfães

Prémios: 2002: Menção Honrosa – Artistas de Gondomar 2002. 2004; 2007: Orador num encontro sobre «Estética na Arte» – Escola Secundária Marco de Canaveses. 2005: Voluntário no projeto «Cor é Vida, Vida é Arte», de apoio a crianças com cancro



© 2012 Permanyer Portugal
Av. Duque d'Ávila, 92, 7.º E - 1050-084 Lisboa
Tel.: 21 315 60 81 Fax: 21 330 42 96
www.permanyer.com

ISSN: 0872-4814
Dep. Legal: B-17364/2000
Ref.: 859AP112



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

Duarte Correia

Neste mês de maio de 2012 escrevo-vos estas breves linhas alusivas à «Página do Presidente» acreditando que este número da revista Dor dedicada às ciências «básicas» será do vosso maior agrado. A editora convidada deste número, a Professora Doutora Fani Neto, coligou alguns trabalhos de investigação, considerados muito relevantes, que apesar da complexidade destes, os ilustres autores dos artigos, redigiram-nos de uma forma inteligível para todos nós clínicos, permitindo uma leitura aliciante e muito atrativa.

Dirijo-me a vós na qualidade de presidente de uma direção por vós eleita, que porventura estará aquém das vossas expectativas, desejos, ou necessidades, mas que apesar das várias vicissitudes, e da «crise» socioeconómica que a todos nos atinge, tem tentado combater a letargia, evitar o conformismo, antítese do dinamismo que gostaríamos que fosse sinónimo da nossa atividade. Para esse desiderato, são fundamentais as vossas sugestões, as críticas, o envolvimento e o empenho de todos vós, pois só assim será possível atingirmos os objetivos que nos propusemos.

Em outubro, nos dias 20 e 21, organizaremos na cidade de Leiria o V Encontro das Unidades de Dor, integrado na Semana Europeia/Dia Nacional de Luta Contra a Dor (20 de outubro), precedido no mesmo local (a 18 e 19 de outubro) das II Jornadas da Unidade de Dor do Centro Hospitalar Leiria-Pombal, estabelecendo uma parceria e uma estreitíssima cooperação organizativa e científica, potenciando uma sinergia que prevemos de excelência.

Propomos para este evento diversos painéis que decorrerão em simultâneo, cujas conclusões finais serão apresentadas e subscritas em documento apropriado e divulgadas posteriormente por diferentes meios, possibilitando um maior consenso, consistência e qualidade técnica dos mesmos, com uma difusão posterior o mais alargada possível.

Os temas a debater serão da maior importância e interesse, integrando especialistas convidados que farão a introdução aos mesmos e que animarão uma discussão que desejaríamos e antevemos participativa e profícua.

A avaliação da qualidade nas Unidades de Dor; que critérios definir; que aplicabilidade; a sustentabilidade das Unidades de Dor; o que se espera das Unidades de Dor; as terapêuticas

não-farmacológicas no tratamento da dor crónica; os instrumentos de avaliação psicológica nas Unidades de Dor; o tratamento da dor crónica na criança (como e onde?); a integração sociolaboral das Unidades de Dor – evocando a multidisciplinaridade, programas de recuperação, terapêuticas ocupacionais, a psicologia social; ou ainda, as sempre mas atuais normas de orientação clínica (NOC) na dor crónica, implicações e necessidade. Se adicionarmos a estes *workshops* os resultados nacionais das avaliações das Unidades de Dor, a responsabilidade social das Unidades de Dor, as fontes de pesquisa de informação e novas tecnologias na informação (acessos e formas de divulgação), estaremos perante um programa interessantíssimo, cuja dificuldade residirá na decisão da opção na inscrição destes *workshops*.

E porque as nossas propostas não se esgotam no V Encontro das Unidades de Dor, nem nos eventos ou atividades que promovemos e divulgamos, alguns destes nesta «Página do Presidente», iremos realizar no sábado dia 1 de junho em Coimbra, uma reunião coordenada pela Dr.^a Cristina Catana, destinada aos psicólogos que integram as Unidades de Dor tendo como objetivo: conhecer/reconhecer os psicólogos que trabalham em Dor a nível nacional; expandir e promover a visão da psicologia na área da Dor; uniformizar procedimentos de referência, avaliação e intervenção psicológicas, formar futuros grupos de trabalho, tendo como referência última a necessidade de implementar de forma consensual e continuada os denominados «registos eletrónicos» nas Unidades de Dor, permitindo uma gestão adequada e otimizada dos meios e recursos disponíveis.

E, porque nem tudo são ou serão êxitos ou sucessos, objetivos atingidos ou metas conseguidas, é com enorme apreensão que antevejo a extinção anunciada da atual Comissão Nacional de Controlo da Dor (CNCDOR). A CNCDOR e a sua predecessora Comissão de Acompanhamento do Plano Nacional de Luta Contra a Dor (PNLCDOR), presididas/coordenadas pelo Professor Doutor Castro Lopes e posteriormente pelo Dr. José Romão, desempenharam uma missão importantíssima e do maior relevo no panorama da Medicina da Dor em Portugal, realizando um trabalho vasto e profícuo, cujas normas ou diretrizes alteraram de uma forma profunda e

insofismável o tratamento da Dor em Portugal, que se traduziu e significou de forma inequívoca o reconhecimento desta área do conhecimento científico *inter pares*, perante o poder político e a sociedade civil.

Uma maior apreensão e preocupação, perante a (in)sustentabilidade das Unidades de Dor, cujos centros de custos próprios e independentes definidos pelo Programa Nacional de Controlo da Dor necessitam e tornam imperativa a publicação com a maior premência possível, pese todas as circunstâncias político-económicas atuais, da Tabela de Medicina da Dor, sucessivamente protelada e adiada, cujos trabalhos se

iniciaram no já distante ano de 2009, no âmbito da CNCDOR e posteriormente desenvolvidos e concluídos na Administração Central dos Sistemas de Saúde, IP (ACSS).

Perante a extinção da CNCDOR, a responsabilidade da APED na sensibilização dos decisores e do poder político torna-se acrescida, para materializar uma maior celeridade na publicação em Portaria desta lista de procedimentos em Medicina da Dor relativos às atividades das Unidades de Dor/Medicina da Dor, constituindo este um objetivo primordial e incontornável, pelo que desenvolveremos todos os nossos esforços na sua almejada concretização.

Editorial

Fani Neto

Por decisão da Dra. Sílvia Vaz Serra, diretora da revista Dor, este número 2 de 2012 é inteiramente dedicado à investigação básica. Foi nesse sentido que me foi dirigido o convite para organizar a elaboração deste número, visto que a minha atividade profissional como docente e investigadora na Faculdade de Medicina do Porto me facilitaria a angariação dos artigos. De facto, ao fazer, eu própria, investigação em neurobiologia da dor, conheço as pessoas que tal como eu trabalham nesta área a nível nacional.

Era intenção inicial que todos os artigos de investigação básica aqui publicados apresentassem resultados originais, nunca antes publicados em revistas estrangeiras pelos autores, nem houvesse esse objetivo a médio ou longo prazo. E foi este pormenor que levantou as maiores dificuldades em obter uma maior participação de autores, meus colegas na investigação básica. Passo a explicar. Toda a investigação que fazemos, seja em neurobiologia da dor ou outra, só tem reconhecimento, quer científico quer a nível curricular, se for publicada em revistas indexadas, com processo de *peer-reviewing* e preferencialmente estrangeiras. Deste modo a disseminação internacional é garantida, e o reconhecimento, com a possibilidade de abertura a colaborações com equipas estrangeiras, e financiamento de novos projetos, torna-se mais fácil. Para além disso, muitos dos dados obtidos resultam de trabalho para teses de doutoramento e os nossos alunos têm que, obrigatoriamente, publicar em revistas indexadas. Por isso, nenhum investigador sensato, no seu melhor juízo, abdica de submeter para publicação em revistas estrangeiras resultados que foram adquiridos de forma rigorosa, e na maior parte das vezes também morosa, e que considera interessantes, e minimamente aceitáveis para serem aceites para publicação numa revista indexada internacional. Pedir-lhes que escrevam especificamente artigos típicos de investigação (com introdução, materiais e métodos, resultados e discussão) com dados originais para que sejam publicados só na revista Dor é algo que é impraticável. Eu própria estou na mesma posição que os meus colegas e é difícil, se não mesmo impossível, considerar esta hipótese. A nossa prioridade são, sempre, os artigos em língua inglesa e indexados.

Sendo assim, tentei que este número incluísse dois tipos de artigos. Os ditos de investigação original, divididos em introdução, métodos, resultados e discussão, mas sem o compromisso de que ainda não tivessem sido, pelo menos em parte, publicados em revistas estrangeiras, ou que não houvesse essa intenção por parte dos autores. E os artigos mais abrangentes, de revisão de um tópico específico, onde estão incluídos dados dos próprios autores. Assim, no que respeita aos artigos de investigação original, num procurou-se avaliar algumas alterações plásticas ao nível do sistema nervoso periférico induzidas por uma condição de dor inflamatória articular, onde se verificou ocorrer a expressão de marcadores de lesão neuronal («O marcador de lesão neuronal ATF-3 é expresso nos neurónios aferentes primários de ratos monoartríticos»). No outro, estudou-se de que modo é que a dor crónica (neste caso derivada de neuropatia periférica) pode afetar as funções cognitivas, nomeadamente a codificação da informação espacial efetuada ao nível do hipocampo («Neuropatia periférica induz instabilidade na codificação de informação espacial pelas *place cells* da área CA1 do hipocampo dorsal»). Os dois artigos de revisão focam-se nas recentes descobertas relativamente quer à modulação descendente da dor num tipo de patologia que afeta cada vez mais pessoas em países desenvolvidos, a neuropatia diabética («Os efeitos da neuropatia diabética em componentes centrais do sistema de modulação da dor»), quer ao envolvimento do recetor vanilóide tipo 1 (TRPV1) em patologias urinárias e nos sintomas dolorosos a elas associados, assim como o possível uso clínico de antagonistas do TRPV1 no tratamento dessa sintomatologia («TRPV1 e dor visceral»).

Os quatro artigos publicados refletem a multidisciplinaridade (de tópicos e de metodologias) da investigação na área da dor efetuada no Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina do Porto. Mas não são de todo abrangentes de toda a investigação básica feita neste campo em Portugal. Uma vez que a revista está condicionada a um número máximo de páginas por número, tal era, de facto, missão impossível. Por isso, fica a promessa de voltarmos com mais artigos de investigação básica, em futuros números da revista Dor. Para já desejo-vos uma leitura agradável e proveitosa.

TRPV1 e Dor Visceral

Ana Charrua¹⁻⁴, A. Avelino^{1,2} e F. Cruz^{2,4}

Resumo

Mesmo antes da sequenciação do receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1), a dessensibilização dos aferentes primários por vanilóides tinha já sido usada para reverter os sintomas associados a patologias urinárias. A identificação do receptor e a sua caracterização farmacológica, tanto *in vitro* como *in vivo*, fizeram do TRPV1 um alvo terapêutico para a reversão desses sintomas. Assim, o desenvolvimento de antagonistas do TRPV1 que actuem de forma efectiva e específica, e o seu possível uso clínico, torna estes fármacos ferramentas promissoras para o tratamento dessas patologias urinárias.

Palavras-chave: TRPV1. Disfunções urinárias. Antagonista.

Abstract

Even before the discovery of TRPV1, neuronal desensitization induced by vanilloids had already been used to overcome symptoms associated with urinary bladder dysfunction. The receptor identification and its pharmacological characterization, both *in vitro* and *in vivo*, prompted TRPV1 as a therapeutic target to overcome such symptoms. Therefore, the development of effective and specific TRPV1 antagonists, and their possible use by clinicians, turns those promising new tools into treatment of such pathologies. (Dor. 2012;20(2):6-11)

Corresponding author: Ana Charrua, anacharr@gmail.com

Key words: TRPV1. Urinary bladder dysfunction. Antagonist.

O que é o TRPV1?

O TRPV1 (do inglês *transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1*), é uma proteína transmembranar que forma um canal catiónico, com preferência pelo catião cálcio¹. Este canal foi assim designado por ser sensível a moléculas vanilóides, como é o caso da capsaicina e da resiniferatoxina. Hoje sabe-se que o TRPV1 é também activado por calor nóstico, por pH baixo, por endovanilóides e outras moléculas pró-inflamatórias lipídicas²⁻⁴. Curiosamente, quando em situações de acidose, o canal abre à temperatura corporal^{2,5}.

Apesar de ter sido descrito, em primeiro lugar, como estando presente nas terminações periféricas e centrais, bem como no corpo celular de um subgrupo de aferentes primários¹, a sua presença

noutros locais do sistema nervoso já foi constatada. Nomeadamente, nos gânglios trigémios^{6,7} e no nervo vago⁸, entre outras estruturas⁹⁻¹⁴.

A expressão do receptor fora do sistema nervoso tem gerado alguma controvérsia. Não só pelo facto de serem apontadas deficiências aos métodos usados para a sua detecção, mas também por não se compreender qual será a função deste canal nessas estruturas. Exemplo disso é a possível expressão do TRPV1 pelas células musculares lisas¹⁵⁻¹⁹. No entanto, a expressão do TRPV1 em mastócitos e em queratinócitos é agora amplamente aceite, sabendo-se que a activação do canal nestas células promove a libertação de moléculas pró-inflamatórias²⁰⁻²⁴.

O TRPV1 no tracto urinário inferior

A presença do receptor vanilóide no tracto urinário inferior, mais propriamente na bexiga, foi primeiro descrita em roedores. Avelino, et al. demonstraram que o receptor vanilóide é expresso por aferentes primários cujas terminações se encontram nas camadas mucosa e muscular²⁵. Na camada muscular, os nervos que expressam o receptor apresentam varicosidades e dispõem-se em plexos densos por entre a camada muscular^{25,26}. Na camada mucosa, as fibras nervosas podem ser encontradas suburotelialmente,

¹Departamento de Biologia Experimental
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

²Grupo *Translational Neuro-Urology*
Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC)

³Faculdade de Ciências de Nutrição e Alimentação
Universidade do Porto

⁴Serviço de Urologia
Hospital de São João
Porto

E-mail: anacharr@gmail.com

apresentando-se algumas terminações por entre as células uroteliais, até ao lúmen²⁵. Para além da expressão nos aferentes primários, a presença do TRPV1 também foi descrita em células uroteliais de roedores²⁶.

Nos humanos, Lazzeri, et al. mostraram a presença do receptor também nas camadas muscular e mucosa, mas evidenciaram o facto deste se encontrar de forma menos abundante do que o observado nos roedores²⁷. Neste mesmo trabalho, evidenciaram, de forma sumária, a presença do receptor em todas as camadas das células uroteliais humanas²⁷.

O TRPV1 na dor visceral: da investigação básica à aplicação clínica

O papel do TRPV1 na função da bexiga em situações normais tem sido controverso. Dados provenientes de experiências com ratinhos transgénicos cujo gene para o TRPV1 foi deletado (TRPV1 KO) mostraram que, quando acordados, estes animais apresentavam episódios de perda de urina entre dois períodos de micção²⁸. Quando anestesiados, a análise cistométrica destes mesmos animais evidenciou a presença de contrações não expulsivas, que estavam ausentes em ratinhos não transgénicos (*Wild Type* [WT]). Estes dados pareciam indicar que o TRPV1 é essencial para a manutenção do reflexo miccional normal. Contudo, experiências posteriores efectuadas em rato mostraram que a aplicação de capsazepina, um antagonista do TRPV1, na bexiga de animais normais não provocava qualquer alteração do reflexo miccional²⁹.

Durante a cistite ocorre um aumento da actividade³⁰ e crescimento e ramificação axonal³¹ dos aferentes sensitivos primários que innervam a bexiga. Mais ainda, Avelino, et al. verificaram um aumento da expressão de TRPV1 em neurónios do gânglio raquidiano L6 após a indução de cistite. Dos aferentes que projectam para a bexiga, os que são sensíveis à capsaicina são tidos como responsáveis pelo aumento da frequência urinária e dor associadas à cistite³²⁻³⁴. O tratamento de ratos com cistite, induzida por ciclofosfamida, com doses elevadas de capsaicina ou resiniferatoxina (agonistas do TRPV1 que em doses elevadas dessensibilizam as fibras a qualquer estímulo posterior) reverte o aumento da frequência urinária e o comportamento doloroso, associados à inflamação^{33,34}. Estes dados demonstraram que as fibras que expressam TRPV1 são importantes para o aumento da frequência urinária e dor associadas à cistite. Contudo, o papel do TRPV1 propriamente dito para o desenvolvimento destes sinais na inflamação só foi estabelecido em trabalhos experimentais efectuados por Charrua, et al., usando ratinhos TRPV1 KO³⁵. Neste trabalho, ratinhos TRPV1 KO com cistite não apresentaram um aumento da frequência urinária nem um aumento da expressão a nível espinhal da proteína Fos (marcador

de neurónios nociceptivos na medula espinhal) que foram observados em ratinhos WT com cistite³⁵. Esta evidência foi prevista aquando da aplicação de capsazepina na bexiga de ratos com cistite crónica dado que este composto provocou um decréscimo da frequência urinária para valores mais próximos dos normais²⁹. O estabelecimento do papel do TRPV1 na cistite fez deste receptor um alvo imperativo para o tratamento de sintomas associados à cistite, ou seja, indicando que o bloqueio do receptor com antagonistas específicos poderá resultar em analgesia e frequência urinária normal em doentes com inflamação crónica da bexiga. Mais ainda, esta determinação da função do TRPV1 no desenvolvimento dos sintomas que acompanham a cistite levanta três questões fundamentais:

1. Quais serão as moléculas/estímulos que estão a activar o TRPV1 durante a cistite?
2. Quais os eventos que levam à activação do receptor e quais as consequências da sua activação?
3. Como bloquear a actividade do receptor durante a cistite?

Relativamente à primeira questão, são vários os compostos que têm sido identificados como sendo endovanilóides (agonistas do TRPV1) endógenos. Exemplo disso são os protões^{1,5}, moléculas lipídicas como a anandamida^{36,37}, a N-oleoil-dopamina^{38,39}, a N-araquidonoil-dopamina⁴⁰⁻⁴², os produtos derivados da actividade das lipoxigenases, como o ácido 12-(S)-hidroperoxieicosatetraenóico, o ácido 15-(S)-hidroperoxieicosatetraenóico e/ou o leucotrieno B₄⁴³. De facto, Dinis, et al. demonstraram que, durante a cistite, existe um aumento dos níveis de anandamida na bexiga que, presumivelmente, será responsável pelo aumento da frequência urinária e expressão de Fos a nível espinhal²⁹.

No que respeita à segunda questão, são vários os mecanismos que podem levar à activação do TRPV1. De facto, o TRPV1 necessita de ser fosforilado pela cinase Ca²⁺/calmodulina-dependente (CaMKII) para ser activado por vanilóides⁴⁴. As proteínas cinase A (PKA) e C (PKC) também fosforilam o receptor, sensibilizando-o⁴⁴. A sensibilização do receptor faz baixar o limiar de abertura do canal e pode ocorrer de várias formas. Receptores como o receptor 2 activado por proteases (PAR2)⁴⁵ ou o receptor 5-hidroxitriptamina 7 (receptor 5-HT(7))⁴⁶ estão envolvidos na sensibilização do TRPV1 via a PKA. A modulação das vias adenosina monofosfato cíclica (cAMP)/PKA pode gerar o efeito inverso. Exemplo disso é o observado após a activação dos receptores metabotrópicos do glutamato do grupo II⁴⁷ ou dos receptores μ opióides^{48,49} que, actuando na via cAMP/PKA, inibem a activação do TRPV1. Outros receptores, como o receptor da bradicinina⁵⁰⁻⁵⁵, os receptores purinérgicos⁵⁶⁻⁵⁹, receptores de tirosina cinase A (Trk A)⁶⁰⁻⁶², entre outros, sensibilizam o receptor TRPV1 através de mecanismos dependentes da PKC. Mais ainda, o

moléculas^{71,118,119}. A dessensibilização do TRPV1 ocorre após abertura do canal fosforilado e está ligada à entrada de cálcio para o interior da célula^{104,120}. A dessensibilização pode ser conseguida quer por aplicação de doses elevadas de vanilóides na bexiga ou por aplicações sucessivas de vanilóides em baixas doses^{95,100-102,111,112}. A dessensibilização por vanilóides promove uma diminuição da sensação dolorosa e da frequência urinária. No entanto, o uso de vanilóides como agentes terapêuticos acarreta problemas como o da necessidade de ser efectuado por pessoal especializado, o facto de ser um método invasivo, o facto da aplicação da capsaicina ser inicialmente dolorosa e pelo facto da solução de resiniferatoxina ser instável^{100,101,121-125}. Estes factos tornam necessário o desenvolvimento de moléculas que consigam antagonizar a activação do TRPV1 de forma específica e eficaz. Existem várias novas moléculas antagonistas do TRPV1 a serem testadas clinicamente, mas nenhuma com o objectivo de ultrapassar a dor ou a elevada frequência urinária associadas a patologias urinárias^{126,127}. Recentemente, demonstrou-se que o uso oral da molécula GRC-6211, um antagonista do TRPV1, reverteu a dor e a elevada frequência urinária em roedores com cistite¹²⁸. A administração do composto por via oral ultrapassa algumas desvantagens que o uso de agentes dessensibilizantes acarreta, para além de qualquer efeito associado à sua administração fazer-se sentir por um período mais curto do que os efeitos associados à dessensibilização^{126,129-131}. Contudo, verificou-se que moléculas antagonistas do TRPV1, ao actuarem ao nível do TRPV1 visceral, promovem vasoconstrição e aumentam termogénese, causando hipertermia¹³²⁻¹³⁵. No entanto, dados recentes mostraram que este efeito poderá ser atenuado com aplicações repetidas de antagonistas, o que vem renovar o interesse em algumas moléculas já conhecidas¹³⁶.

Em suma, o papel das fibras sensitivas no desenvolvimento de patologias urinárias é há muito reconhecido. A identificação do TRPV1 como molécula essencial ao desenvolvimento de dor e ao aumento da actividade vesical fez deste receptor um alvo para o controlo das disfunções urinárias, tornando peremptória a necessidade de se desenvolverem antagonistas específicos a serem usados com fim terapêutico.

Bibliografia

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389:816-24.
- Caterina MJ, Lefber A, Malmberg AB, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000;288:306-13.
- Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*. 2002;108:421-30.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol*. 2009;75(6):1262-79.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, et al. The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron*. 1998;21:531-43.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci*. 1999;11:946-58.
- Ichikawa H, Sugimoto T. VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res*. 2001;890:184-8.
- Holzer P. Capsaicin: cellular target, mechanism of action and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*. 1991;43:143-201.
- Michael GJ, Priestley JV. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci*. 1999;19:1844-54.
- Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3655-60.
- Kadowaki M, Kuramoto H, Takaki M. Combined determination with functional and morphological studies of origin of nerve fibers expressing transient receptor potential vanilloid 1 in the myenteric plexus of rat jejunum. *Auton Neurosci*. 2004;116:11-8.
- Koike S, Uno T, Bamba H, Shibata T, Okano H, Hisa Y. Distribution of vanilloid receptors in the rat laryngeal innervation. *Acta Otolaryngol*. 2004;124:515-9.
- Tóth A, Boczán J, Kedei N, et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;135:162-8.
- Ichikawa H, Terayama R, Yamaai T, Yan Z, Sugimoto T. Brain-derived neurotrophic factor-immunoreactive neurons in the vagal and glossopharyngeal sensory ganglia: co-expression with other neurochemical substances. *Brain Res*. 2007;1155:93-9.
- Ost D, Roskams T, Van Der Aa F, De Ridder D. Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J Urol*. 2002;168:293-7.
- Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS, Sham JS. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L1267-76.
- Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, et al. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol*. 2008;73:1405-12.
- Wang YX, Wang J, Wang C, et al. Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Membr Biol*. 2008;223:151-9.
- Ito S, Kume H, Naruse K, et al. A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38:407-13.
- Biró T, Maurer M, Modarres S, et al. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood*. 1998;91:1332-40.
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:217-22.
- Turner H, Fleig A, Stokes A, Kinet JP, Penner R. Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J*. 2003;371:341-50.
- Ständer S, Moormann C, Schumacher M, et al. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol*. 2004;13:129-39.
- Bodó E, Biró T, Telek A, et al. A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol*. 2005;166:985-98.
- Avelino A, Cruz C, Nagy I, Cruz F. Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience*. 2002;109:787-98.
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, et al. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *PNAS*. 2001;98:13396-401.
- Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, et al. Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. *Eur Urol*. 2004;46:792-8.
- Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, et al. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nature Neuroscience*. 2002;5:856-60.
- Dinis P, Charrua A, Avelino A, et al. Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J Neurosci*. 2004;24:11253-63.
- Yoshimura N, de Groat WC. Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J Neurosci*. 1999;19:4644-53.
- Dickson A, Avelino A, Cruz F, Ribeiro-da-Silva A. Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience*. 2006;141:1633-47.

32. Maggi CA, Lecci A, Santicioli P, Bianco ED, Giuliani S. Cyclophosphamide cystitis in rats: involvement of capsaicin-sensitive primary afferents. *J Auton Nerv Syst.* 1992;38:201-8.
33. Vizzard MA. Alterations in spinal cord Fos protein expression induced by bladder stimulation following cystitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278:R1027-39.
34. Dinis P, Charrua A, Avelino A, Cruz F. Intravesical resiniferatoxin decreases spinal c-fos expression and increases bladder volume to reflex micturition in rats with chronic inflamed urinary bladders. *BJU Int.* 2004;94:153-7.
35. Charrua A, Cruz CD, Cruz F, Avelino A. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 is essential for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity in cystitis. *J Urol.* 2007;177:1537-41.
36. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 1999;400:452-7.
37. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol.* 2000;129:227-30.
38. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:8400-5.
39. Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, et al. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem.* 2003;278:13633-9.
40. Harrison S, De Petrocellis L, Trevisani M, et al. Capsaicin-like effects of N-arachidonoyl-dopamine in the isolated guinea pig bronchi and urinary bladder. *Eur J Pharmacol.* 2003;475:107-14.
41. De Petrocellis L, Chu CJ, Moriello AS, Kellner JC, Walker JM, Di Marzo V. Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *Br J Pharmacol.* 2004;143:251-6.
42. Sagar DR, Smith PA, Millns PJ, Smart D, Kendall DA, Chapman V. TRPV1 and CB1 receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat. *Eur J Neuroscience.* 2004;20:175-84.
43. Hwang SW, Cho H, Kwak J, et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:6155-60.
44. Jung J, Shin JS, Lee SY, et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem.* 2004;279:7048-54.
45. Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase Cepsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol.* 2006;575:555-71.
46. Ohta T, Ikemi Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S. Potentiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons. *J Physiol.* 2006;576:809-22.
47. Carlton SM, Du J, Zhou S. Group II metabotropic glutamate receptor activation on peripheral nociceptors modulates TRPV1 function. *Brain Res.* 2009;1248:86-95.
48. Vetter I, Wyse BD, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ, Cabot PJ. The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Mol Pain.* 2006;2:22-37.
49. Vetter I, Cheng W, Peiris M, et al. Rapid, opioid-sensitive mechanisms involved in transient receptor potential vanilloid 1 sensitization. *J Biol Chem.* 2008; 283:19540-50.
50. Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature.* 2000;408:985-90.
51. Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol.* 2001;534:813-25.
52. Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol.* 2002;88:544-8.
53. Carr MJ, Lollarik M, Meekeer SN, Udem BJ. A role for TRPV1 in bradykinin-induced excitation of vagal airway afferent nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304:1275-9.
54. Tang HB, Inoue A, Oshita K, Nakata Y. Sensitization of vanilloid receptor 1 induced by bradykinin via the activation of second messenger signaling cascades in rat primary afferent neurons. *Eur J Pharmacol.* 2004;498:37-43.
55. Mizumura K, Sugiur T, Koda H, et al. [Pain and bradykinin receptors-sensory transduction mechanism in the nociceptor terminals and expression change of bradykinin receptors in inflamed condition]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 2005;25:33-8. Japonés.
56. Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *PNAS USA.* 2001;98:6951-6.
57. Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, et al. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci.* 2003;23:6058-62.
58. Tominaga M, Numazaki M, Iida T, Tominaga T. [Molecular mechanisms of nociception]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 2003;23:139-47. Japonés.
59. Lakshmi S, Joshi PG. Co-activation of P2Y2 receptor and TRPV channel by ATP: implications for ATP induced pain. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25:819-32.
60. Bonnington JK, McNaughton PA. Signalling pathways involved in the sensitization of mouse nociceptive neurons by nerve growth factor. *J Physiol.* 2003;551:433-46.
61. Zhuang ZY, Xu H, Clapham DE, Ji RR. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J Neurosci.* 2004;24:8300-9.
62. Zhu W, Oxford GS. Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1. *Mol Cell Neurosci.* 2007;34:689-700.
63. Shin J, Cho H, Hwang SW, et al. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signalling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:10150-5.
64. Ferreira J, da Silva GL, Calixto JB. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol.* 2004;141:787-94.
65. Prescott ED, Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science.* 2003;300:1284-8.
66. Liu B, Zhang C, Qin F. Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci.* 2005;25:4835-43.
67. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature.* 2001;411:957-62.
68. Rohacs T, Thyagarajan B, Lukacs V. Phospholipase C mediated modulation of TRPV1 channels. *Mol Neurobiol.* 2008;37:153-63.
69. Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol.* 2006;128:509-22.
70. Voets T, Nilius B. Modulation of TRPs by PIPs. *J Physiol.* 2007;582:939-44.
71. Lishko PV, Procko E, Jin X, Phels CB, Gaudet R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron.* 2007;54:905-18.
72. Liu HT, Kuo HC. Increased expression of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 in the bladder predicts the response to intravesical instillations of resiniferatoxin in patients with refractory idiopathic detrusor overactivity. *BJU Int.* 2007;100:1086-90.
73. Liu L, Mansfield KJ, Kristiana I, Vaux KJ, Millard RJ, Burcher E. The molecular basis of urgency: regional difference of vanilloid receptor expression in human urinary bladder. *Neuro Urodyn.* 2007;26:433-8.
74. Smet PJ, Moore KH, Jonavicius J. Distribution and colocalization of calcitonin gene related peptide, tachykinins and vasoactive intestinal peptide in normal and idiopathic unstable human urinary bladder. *Lab Invest.* 1997;77:37-49.
75. Brady CM, Apostolidis AN, Harper M, et al. Parallel changes in bladder suburothelial vanilloid receptor TRPV1 and pan-neuronal marker PGP9.5 immunoreactivity in patients with neurogenic detrusor overactivity after intravesical resiniferatoxin treatment. *BJU Int* 2004;93:770-6.
76. Lowe EM, Anand P, Terenghi G, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV, Osborne JL. Increased nerve growth factor levels in the urinary bladder of women with idiopathic sensory urgency and interstitial cystitis. *Br J Urol.* 1997;79(4):572-7.
77. Liu HT, Tyagi P, Chancellor MB, Kuo HC. Urinary nerve growth factor level is increased in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome and decreased in responders to treatment. *BJU Int.* 2009;104:1476-81.
78. Xue Q, Jong B, Chen T, Schumacher MA. Transcription of rat TRPV1 utilizes a dual promoter system that is positively regulated by nerve growth factor. *J Neurochem.* 2007;101:212-22.
79. Charrua A, Reguenga C, Paule CC, Nagy I, Cruz F, Avelino A. Cystitis is associated with TRPV1b-downregulation in rat dorsal root ganglia. *Neuroreport.* 2008;19:1469-72.
80. Charrua A, Reguenga C, Cordeiro JM, et al. Functional transient receptor potential vanilloid 1 is expressed in human urothelial cells. *J Urol.* 2009;182:2944-50.
81. Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX. An alternative splicing product of the murine trpv1 gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *JBC.* 2004;279:37423-30.
82. Vos MH, Neelands TR, McDonald HA, et al. TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J Neurochem.* 2006;99:1088-102.
83. Eilers H, Lee SY, Hau CW, Logvinova A, Schumacher MA. The rat vanilloid receptor splice variant VR.5sv blocks TRPV1 activation. *Neuroreport.* 2007;18:969-73.
84. Schumacher MA, Moff I, Sudanagunta SP, Levine JD. Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. *JBC.* 2000;275:2756-62.
85. Xue Q, Yu Y, Trilk SL, Jong BE, Schumacher MA. The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: evidence for multiple splice variants. *Genomics.* 2001;76:14-20.

86. Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience*. 2001;107:373-81.
87. Lu G, Henderson D, Liu L, Reinhart PH, Simon SA. TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant. *Molecular Pharmacol*. 2005;67:1119-27.
88. Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, García-Sanz N, Ferrer-Montiel A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem*. 2004;279:25665-72.
89. Bhawe G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*. 2002;35:721-31.
90. Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, Pauza ME, Premkumar LS. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Molecular Pain*. 2005;1:17-28.
91. Fowler CJ, Jewkes D, McDonald WI, Lynn B, de Groat WC. Intravesical capsaicin for neurogenic bladder dysfunction. *Lancet*. 1992;339:1239.
92. Fowler CJ, Beck RO, Gerrard S, Betts CD, Fowler CG. Intravesical capsaicin for treatment of detrusor hyperreflexia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:169-73.
93. Geirsson G, Fall M, Sullivan L. Clinical and urodynamic effects of intravesical capsaicin treatment in patients with chronic traumatic spinal detrusor hyperreflexia. *J Urol*. 1995;154:1825-9.
94. Chandiramani VA, Peterson T, Duthie GS, Fowler CJ. Urodynamic changes during therapeutic intravesical instillations of capsaicin. *Br J Urol*. 1996;77:792-7.
95. Das A, Chancellor MB, Watanabe T, Sedor J, Rivas DA. Intravesical capsaicin in neurologic impaired patients with detrusor hyperreflexia. *J Spinal Cord Med*. 1996;19:190-3.
96. Lazzeri M, Beneforti P, Benaim G, Maggi CA, Lecci A, Turini D. Intravesical capsaicin for treatment of severe bladder pain: a randomized placebo controlled study. *J Urol*. 1996;156:947-52.
97. Lazzeri M, Beneforti P, Turini D. Urodynamic effects of intravesical resiniferatoxin in humans: preliminary results in stable and unstable detrusor. *J Urol*. 1997;158:2093-6.
98. Lazzeri M, Spinelli M, Beneforti P, Zanollo A, Turini D. Intravesical resiniferatoxin for the treatment of detrusor hyperreflexia refractory to capsaicin in patients with chronic spinal cord diseases. *Scand J Urol Nephrol*. 1998;32:331-4.
99. Lazzeri M, Spinelli M, Zanollo A, Turini D. Intravesical vanilloids and neurogenic incontinence: ten years experience. *Urol Int*. 2004;72:145-9.
100. Cruz F, Guimarães M, Silva C, Rio ME, Coimbra A, Reis M. Desensitization of bladder sensory fibres by intravesical capsaicin has long lasting clinical and urodynamic effects in patients with hyperactive or hypersensitive bladder dysfunction. *J Urol*. 1997;157:585-9.
101. Cruz F, Guimarães M, Silva C, Reis M. Suppression of bladder hyperreflexia by intravesical resiniferatoxin. *Lancet*. 1997;350:640-1.
102. De Ridder D, Chandiramani V, Dasgupta P, Van Poppel H, Baert L, Fowler CJ. Intravesical capsaicin as a treatment for refractory detrusor hyperreflexia: a dual center study with long-term followup. *J Urol*. 1997;158:2087-92.
103. de Sèze M, Wiart L, Joseph PA, Dosque JP, Mazaux JM, Barat M. Capsaicin and neurogenic detrusor hyperreflexia. A double blind placebo controlled study in 20 patients with spinal cord lesions. *Neurourol Urodyn*. 1998;17:513-23.
104. de Sèze M, Wiart L, Ferrière J, de Sèze MP, Joseph P, Barat M. Intravesical instillation of capsaicin in urology: A review of the literature. *Eur Urol*. 1999;36:267-77.
105. de Sèze M, Wiart L, de Sèze MP, et al. Intravesical capsaicin versus resiniferatoxin for the treatment of detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a double-blind, randomized, controlled study. *J Urol*. 2004;171:251-5.
106. de Sèze M, Gallien P, Denys P, et al. Intravesical glucidic capsaicin versus glucidic solvent in neurogenic detrusor overactivity: a double blind controlled randomized study. *Neurourol Urodyn*. 2006;25:752-7.
107. Wiart L, Joseph PA, Petit H, et al. The effects of capsaicin on the neurogenic hyperreflexic detrusor. A double blind placebo controlled study in patients with spinal cord disease. Preliminary results. *Spinal Cord*. 1998;36:95-9.
108. Chancellor MB, de Groat WC. Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways to treat the overactive bladder. *J Urol*. 1999;162:3-11.
109. Fagerli J, Fraser MO, deGroat WC, et al. Intravesical capsaicin for the treatment of interstitial cystitis: a pilot study. *Can J Urol*. 1999;6:737-44.
110. Silva C, Rio ME, Cruz F. Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical resiniferatoxin, a capsaicin analog: long-term results for the treatment of detrusor hyperreflexia. *Eur Urol*. 2000;38:444-52.
111. Giannantoni A, Di Stasi SM, Stephen RL, et al. Intravesical capsaicin versus resiniferatoxin in patients with detrusor hyperreflexia: a prospective randomized study. *J Urol*. 2002;167:1710-4.
112. Igawa Y, Satoh T, Mizusawa H, et al. The role of capsaicin-sensitive afferents in autonomic dysreflexia in patients with spinal cord injury. *BJU Int*. 2003;91:637-41.
113. Kim JH, Rivas DA, Shenot PJ, et al. Intravesical resiniferatoxin for refractory detrusor hyperreflexia: a multicenter, blinded, randomized, placebo-controlled trial. *J Spinal Cord Med*. 2003;26:358-63.
114. Novakova-Tousova K, Vyklicky L, Susankova K, et al. Functional changes in the vanilloids receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience*. 2007;149:144-54.
115. Vyklicky L, Nováková-Tousová K, Benedikt J, Samad A, Tuskova F, Vlachová V. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res*. 2008;57:S59-68.
116. Lee SY, Lee JH, Kang KK, Hwang SY, Choi KD, Oh U. Sensitization of vanilloid receptor involves an increase in the phosphorylated form of the channel. *Arch Pharm Res*. 2005;28:405-12.
117. Piper AS, Yeats JC, Bevan S, Docherty RJ. A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J Physiol*. 1999;518:721-33.
118. Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1997;17:3525-37.
119. Mohapatra DP, Nau C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloids receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2005;280:13424-32.
120. Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch*. 1996;431:828-37.
121. Lazzeri M, Beneforti P, Spinelli M, Zanollo A, Barbagli G, Turini D. Intravesical resiniferatoxin for the treatment of hypersensitive disorder: a randomized placebo controlled study. *J Urol*. 2000;164:676-9.
122. Cruz F. Vanilloid receptor and detrusor instability. *Urology*. 2002;59:51-60.
123. Payne CK, Mosbaugh PG, Forrest JB, et al. ICOS RTX Study Group (Resiniferatoxin Treatment for Interstitial Cystitis). Intravesical resiniferatoxin for the treatment of interstitial cystitis: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *J Urol*. 2005;173:1590-4.
124. Chen TY, Corcos J, Camel M, Ponsot Y, Tu le M. Prospective, randomized, double-blind study of safety and tolerability of intravesical resiniferatoxin (RTX) in interstitial cystitis (IC). *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2005;16:293-7.
125. Brady CM, Apostolidis A, Yiangou Y, et al. P2X3-immunoreactive nerve fibres in neurogenic detrusor overactivity and the effect of intravesical resiniferatoxin. *Eur Urol*. 2004;46:247-53.
126. Gunthorpe MJ, Chizh BA. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discov Today*. 2009;14:56-67.
127. Khairatkar-Joshi N, Szallasi A. TRPV1 antagonists: the challenges for therapeutic targeting. *Trends Mol Med*. 2009;15:14-22.
128. Charrua A, Cruz CD, Narayanan S, et al. GRC-6211, a new oral specific TRPV1 antagonist, decreases bladder overactivity and noxious bladder input in cystitis animal models. *J Urol*. 2009;181:379-86.
129. Andersson KE. New pharmacologic targets for the treatment of the overactive bladder: an update. *Urology*. 2004;63:32-41.
130. Theoharides TC. Treatment approaches for painful bladder syndrome/interstitial cystitis. *Drugs*. 2007;67:215-35.
131. Mourtzoukou EG, lavazzo C, Falagas ME. Resiniferatoxin in the treatment of interstitial cystitis: a systematic review. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2008;19:1571-6.
132. Steiner AA, Turek VF, Almeida MC, et al. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci*. 2007;27:7459-68.
133. Swanson DM, Dubin AE, Shah C, et al. Identification and biological evaluation of 4-(3-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylic acid (5-trifluoromethylpyridin-2-yl)amide, a high affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist. *J Med Chem*. 2005;48:1857-72.
134. Gavva NR, Bannon AW, Surapaneni S, et al. The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci*. 2007;27:3366-3374.
135. Gavva NR, Treanor JJ, Garami A, et al. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain*. 2008;136:202-10.
136. Wong GY, Gavva NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev*. 2008;60:267-77.

O Marcador de Lesão Neuronal ATF-3 é Expresso nos Neurónios Aferentes Primários de Ratos Monoartríticos

Diana Sofia Marques Nascimento^{1,2}, Daniel Humberto Pozza^{1,2}, José Manuel Castro-Lopes^{1,2} e Fani Lourença Moreira Neto^{1,2}

Resumo

Objectivo: O factor de activação da transcrição 3 (ATF-3) é normalmente usado como um marcador de lesão neuronal, visto a sua expressão ser grandemente induzida em vários modelos animais de dor neuropática. Usando ratos monoartrite (MA), um modelo de dor articular inflamatória crónica induzido por injeção de adjuvante completo de Freund (CFA) na articulação tibiotársica, investigámos a expressão de ATF-3 nos neurónios aferentes primários e caracterizámos a subpopulação neuronal onde esta maioritariamente ocorreu.

Métodos e resultados: Por imuno-histoquímica simples, foi observada uma indução significativa de ATF-3 nos animais MA, particularmente nos gânglios raquidianos (DRG) L5 aos dois e quatro dias após injeção intra-articular de CFA. A medição da área das células que expressaram ATF-3, assim como imuno-histoquímica tripla contra ATF-3 e os marcadores de populações neuronais peptidérgicas (proteína relacionada com o gene da calcitonina; calcitonin gene-related peptide [CGRP]) e não-peptidérgicas (isolectina B4 [IB4]) demonstraram que as células que expressam ATF-3 nos ratos MA são principalmente neurónios pequenos a médios com características peptidérgicas, embora em geral se tenham observado baixos valores de co-localização. O número de células imunorreactivas (IR) a CGRP mostrou também uma ligeira tendência para diminuir ao longo da progressão da doença. A inibição da produção de prostaglandinas, por administração de cetoprofeno aos animais inflamados, não conseguiu reverter a indução de ATF-3, mas aumentou significativamente a expressão de CGRP nos tempos iniciais da doença.

Conclusão: Os dados sugerem que a expressão de ATF-3 está definitivamente envolvida na MA, marcando neurónios que se encontram danificados. A lesão neuronal parece ocorrer logo após os primeiros dias da doença, afectando principalmente neurónios peptidérgicos pequenos a médios. A injeção intra-articular de CFA e o desenvolvimento de um ambiente neuroinflamatório parecem ser a explicação mais provável para a lesão neuronal local.

Palavras-chave: Factor de activação da transcrição 3. Calcitonin gene-related peptide. Gânglios raquidianos. Dor articular inflamatória. Lesão neuronal.

Abstract

Objective: Activating transcription factor-3 (ATF-3) is commonly accepted as a neuronal injury marker since its expression is highly induced in several neuropathic pain animal models. Using the monoarthritic (MA) model of chronic inflammatory joint pain induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA) injection into the tibiotarsal joint, we aimed to investigate ATF-3 expression in primary afferents and characterize the neuronal population most implicated.

Methods and results: Single immunolabeling revealed ATF-3 is highly induced in MA animals, especially at 2d and 4d after CFA intraarticular injection for the L₅ dorsal root ganglia (DRGs). Cell size distribution of all ATF-3 expressing cells, as well as triple immunolabeling against ATF-3 and the well known markers of neuronal populations calcitonin gene-related peptide (CGRP) and isolectin B4 (IB4), demonstrated ATF-3 expressing cells are mainly small-to-medium peptidergic neurons, although low values of co-localization were obtained. The

¹Departamento de Biologia Experimental
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

²Grupo de Morfofisiologia do Sistema Somatossensitivo
Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC)

Porto

E-mail: fanineto@med.up.pt

number of CGRP immunoreactive cells also showed a non-significant slight tendency to decrease along MA progression. Inhibition of prostaglandins production by Ketoprofen administration to inflamed animals, failed to reverse ATF-3 induction, but significantly increased CGRP expression, in the early time points of the disease. Conclusion: Data suggest ATF-3 expression is definitely involved in MA, actually marking injured neurons. Neuronal damage seems to occur right from the first days of disease, mainly affecting small-to-medium peptidergic neurons. The CFA intraarticular injection and the generation of a neuroinflammatory environment seem to be the plausible explanation for the local nerve damage. (Dor. 2012;20(2):12-23)

Corresponding author: Diana Sofia Marques Nascimento, fanineto@med.up.pt

Key words: Activating transcription factor-3. Calcitonin gene-related peptide. Dorsal root ganglions. Inflammatory joint pain. Neuronal damage.

Introdução

A inflamação articular é um problema clínico de elevada relevância e constitui uma das principais causas de dor crónica debilitante, caracterizada por hiperalgesia mecânica pronunciada e dor persistente em repouso¹. A sensibilização de neurónios aferentes primários, cujos corpos celulares se localizam nos DRG (do inglês *dorsal root ganglions*), envolve vários mediadores que desencadeiam vias de sinalização intracelular particulares. Uma grande parte destas vias implica a activação de factores de transcrição, levando em última instância ao desenvolvimento da dor articular inflamatória. Embora a investigação centrada na procura de tratamentos eficazes para esta condição dolorosa tenha sido (esteja a ser) importante, os mecanismos moleculares com ela relacionados ainda estão longe de serem completamente conhecidos, especialmente quando se consideram as diferenças anatómicas e fisiológicas que parecem existir entre nociceptores cutâneos e articulares¹.

O ATF-3 parece desempenhar um papel na resposta adaptativa do organismo, devido à sua capacidade de desencadear soluções distintas e adaptadas a diferentes contextos celulares². Foi já reportada a sua implicação em vias de sinalização envolvidas em mecanismos anti e pró-apoptóticos³, na sobrevivência celular⁴, regeneração⁵ e neuroprotecção⁸. No entanto, o papel do ATF-3 na patofisiologia da dor precisa ainda de ser decifrado. De facto, o ATF-3 é actualmente visto meramente como um marcador de lesão neuronal, visto que a sua expressão é grandemente induzida em diversos modelos de dor neuropática⁷⁻⁹. Na dor articular, é interessante o facto de nos modelos de artrite induzida por injeção de colagénio e de osteoartrite (AO) induzida por injeção de monoiodoacetato, o ATF-3 também ser expresso nos neurónios dos DRG^{10,11}, sugerindo que está a ocorrer algum grau de lesão neuronal. No entanto, os dados de expressão de ATF-3 nos aferentes primários em diferentes modelos de dor inflamatória não têm sido sempre consistentes¹²⁻¹⁴. Por exemplo, a injeção intraplantar de adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês *Complete Freund's Adjuvant*) não induziu a

expressão de ATF-3, sugerindo que não há lesão neuronal associada^{12,13}.

Tendo em consideração os dados controversos e a pouca informação existente acerca do papel do ATF-3 no processamento da dor, fomos investigar o seu padrão de expressão nos aferentes primários a diferentes tempos de progressão de uma monoartrite (MA) em ratos, um modelo bem estabelecido de dor crónica inflamatória articular induzido pela injeção de CFA na articulação tibiotársica¹⁵. De maneira a caracterizarmos as populações neuronais mais implicadas, analisámos ainda a distribuição por áreas das células que expressaram ATF-3, assim como a sua co-localização com a isolectina B4 (IB4) ou com o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP, do inglês *Calcitonin Gene-Related Peptide*)¹⁶. O CGRP potencia a transmissão do sinal doloroso desde os neurónios sensitivos primários até à medula espinal, funcionando como mediador da inflamação neurogénica na periferia¹⁷, assim como está descrito como sendo importante na indução e manutenção da inflamação articular^{1,18,19}. O CGRP tem também sido reconhecido como um peptídeo promotor da regeneração nervosa, após lesão neuronal²⁰. Mais recentemente foi demonstrado que a sua expressão ora aumentou ora diminuiu, dependendo do tipo de lesão induzida no nervo ciático, indicando que a natureza do dano periférico tem impacto na expressão de CGRP²¹, afectando mesmo diferentes populações neuronais²². Assim, foram também avaliadas possíveis alterações na expressão de CGRP durante a MA. Além disso, foi administrado cetoprofeno, um anti-inflamatório inibidor não-selectivo da ciclooxigenase (COX), de forma a avaliar o seu efeito na expressão de ATF-3 e CGRP durante a instalação da MA. Partes deste trabalho foram já publicados sob a forma de resumo^{23,24}.

Material e métodos

Indução da monoartrite e monitorização dos sintomas inflamatórios

Foram utilizados ratos adultos da estirpe Wistar, do sexo masculino (*Charles River Laboratories*, França), pesando entre 200 a 300 g. Os animais

foram mantidos em gaiolas (2-3 por gaiola) com alimento e água, a uma temperatura constante de 22 °C e luminosidade controlada (ciclos 12 h luz/12 h escuridão). Todas as experiências foram efectuadas tendo em consideração as normas estabelecidas nos regulamentos das autoridades locais relativas ao manuseamento dos animais, assim como as boas práticas éticas recomendadas para o estudo da dor experimental em animais²⁵ e a directiva 86/609/EEC do Conselho da Comunidade Europeia revista a 22 de Julho de 2003 pela directiva 2003/65/CE.

A MA foi induzida por injeção de 50 µl de CFA na articulação tibiotársica esquerda, tal como descrito em Butler, et al.¹⁵, sob o efeito de breve anestesia com isoflurano volátil (5% para indução e 2,5% para manutenção). O CFA foi preparado como anteriormente descrito²⁶. Os ratos monoartríticos, mediante o grupo experimental a que pertenciam, foram sacrificados 2, 4, 7 ou 14 dias após a injeção de CFA (dias de MA). O material biológico foi recolhido a estes tempos de MA de modo a avaliar a expressão de ATF-3 ao longo do tempo de progressão da doença. Os controlos foram injectados com 50 µl de veículo de CFA (composto pelos mesmos reagentes que o CFA, excepto que não tem *Mycobacterium butyricum*, agente indutor da inflamação) e sacrificados dois dias após a injeção. Resultados preliminares não mostram diferenças para controlos sacrificados a tempos posteriores após a injeção de veículo. De modo a evitar alguns comportamentos derivados ao medo/stress, todos os animais foram habituados ao experimentador, durante alguns dias, antes da injeção e durante a progressão da MA.

A evolução da reacção inflamatória foi monitorizada diariamente segundo uma escala subjectiva de 0 a 4 descrita por Castro-Lopes, et al.²⁷, que tem em consideração os sinais inflamatórios e a redução da actividade locomotora e em que: 0 corresponde a uma ausência de sinais inflamatórios; 1 indica alterações mínimas de inchaço e rubor; 2 representa inchaço mais intenso e diminuição de movimentos passivos; 3 corresponde aos sintomas anteriores e ainda a uma maior dificuldade em colocar peso sobre a pata inflamada, neste caso a esquerda, e 4 que indica sintomas muito severos de inflamação que afectam tanto a actividade motora como ocorre fleção persistente do joelho.

Para melhor avaliar a severidade da inflamação, medimos também o diâmetro das patas inflamadas, fazendo uma comparação com a respectiva pata contralateral e as patas não inflamadas dos animais-controlo.

Imuno-histoquímica

Cada rato foi anestesiado por injeção intraperitoneal com hidrato de cloral 35% (p/v em soro; 0,1 ml/100 g de peso corporal). A perfusão foi depois feita através da aorta ascendente com

cerca de 250 ml de solução oxigenada Tyrode, seguida de 750 a 1.000 ml de fixador (paraformaldeído a 4% em 0,1M de tampão fosfato salino [PBS]). Após perfusão, dissecou-se os DRG ipsi e contralaterais correspondendo aos segmentos espinhais L₃, L₄ e L₅. O material biológico foi pós-fixado na solução de fixador durante 4 h e depois foi armazenado a 4 °C em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1M. Os gânglios foram posteriormente envolvidos num material congelante (*Frozen Section Medium – Richard-Allas Scientific*) e seccionados num crióstato (a -20 °C) em cortes sequenciais de 14 µm. Este material foi recolhido em lâminas de poli-L-lisina, e foi armazenado a -20 °C até ao início das reacções de imunocitoquímica.

Lâminas contendo um em cada cinco cortes dos gânglios L₃, L₄ e L₅, de cada animal em cada grupo experimental, foram processadas para a reacção de imunofluorescência contra ATF-3. Para a tripla imunorreacção contra ATF-3, CGRP e IB4 apenas cortes de gânglios L₅ (um em cada cinco) foram processados. Depois de várias lavagens em PBS e um bloqueio no soro do animal mais adequado, os cortes foram incubados com os anticorpos primários respectivos durante 48 h a uma temperatura de 4 °C. No segundo dia de reacção e após novas lavagens em tampão, os mesmos cortes foram incubados durante 1 h nos anticorpos secundários apropriados.

Na imunodeteção do ATF-3, os cortes dos gânglios L₃, L₄ e L₅ tanto ipsi como contralaterais (n = 5 ratos por grupo experimental) foram incubados em anticorpo policlonal contra ATF-3 criado em coelho (*polyclonal rabbit anti-ATF-3*; C-19; sc-188, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*) numa concentração de 1:500. A detecção foi feita com anticorpo secundário contra proteínas de coelho criado em cabra e que emite fluorescência vermelha por estimulação com luz de comprimento de onda adequada (*Alexa 594 goat-anti-rabbit*; A11012, *Molecular Probes*, Estados Unidos da América [EUA]) numa concentração de 1:1.000. Na tripla imunodeteção do ATF-3, CGRP (marcador neuronal de aferentes primários peptidérgicos) e IB4 (marcador neuronal de aferentes primários não-peptidérgicos), os cortes de gânglios L₅ ipsilaterais (n = 5 ratos para controlos e 7 d MA; n = 4 ratos para todos os outros grupos experimentais) foram inicialmente incubados em anticorpo policlonal contra ATF-3 criado em coelho (*polyclonal rabbit anti-ATF-3*; 1:500) e em anticorpo contra CGRP criado em ovelha (*sheep anti-CGRP*; ab22560 ABCAM, Cambridge, Reino Unido) numa concentração de 1:4.000. A detecção foi feita usando o anticorpo secundário contra proteínas de coelho criado em burro que emite fluorescência verde (*Alexa 488 donkey anti-rabbit*; A21206, *Molecular Probes*, EUA) numa concentração de 1:1.000, no caso do ATF-3, e o anticorpo secundário contra proteínas de ovelha criado em burro que emite fluorescência vermelha (*Alexa 568 donkey anti-sheep*; A21099,

Molecular Probes, EUA) numa concentração de 1:1.000 no caso do CGRP. As lâminas foram posteriormente incubadas por uma noite à temperatura ambiente em IB4 da *Bandeiraea simplicifolia* conjugada com biotina (L2140, *Sigma Aldrich*), numa concentração de 1:1.000. A detecção fez-se por incubação numa solução de estreptavidina conjugada com uma molécula que emite fluorescência azul (*streptavidin 350; Jackson ImmunoRes. Lab, Inc.*), numa concentração de 1:200. Para comprovar a especificidade da reacção, reagiram-se lâminas exactamente como o descrito acima, excluindo o passo da incubação com o anticorpo primário. Depois de reagidas, as lâminas foram montadas com glicerol em PBS 0,4M para posterior visualização em microscópio de fluorescência.

Tratamento com cetoprofeno

Para avaliar o efeito de um anti-inflamatório não-esteróide (AINE), inibidor não selectivo da COX (cetoprofeno), na expressão do ATF-3 e CGRP, induziu-se a MA como descrito acima e administrou-se o fármaco diariamente (5 mg/kg de rato/24 horas; subcutâneo). Num dos grupos experimentais, o cetoprofeno foi administrado logo a partir do dia em que foi injectado o CFA para indução da MA (dia 0), de modo a diminuir o desenvolvimento de um ambiente neuroinflamatório, desde o início. Num outro grupo experimental, o fármaco foi administrado também diariamente mas apenas a partir do dia 2 após indução da MA, pelo facto de sabermos que a este tempo de progressão da doença a expressão de ATF-3 já alcançou valores elevados nos gânglios L₅ ipsilaterais à pata inflamada (resultados prévios). Um grupo controlo foi injectado diariamente com soro fisiológico, após igual indução de MA na articulação tibiotársica. Todos os animais foram perfundidos com 4 d de MA, o pico da expressão de ATF-3, e os gânglios L₅ tanto ipsi como contralaterais foram dissecados e processados para imunocitoquímica contra ATF-3 (n = 4 ratos por grupo experimental) e CGRP (n = 5 ratos por grupo experimental), como descrito no ponto anterior. A severidade dos sintomas inflamatórios foi monitorizada igualmente em todos os animais usando uma escala de graus inflamatórios²⁷ e por medição do diâmetro das patas inflamadas, como já descrito acima.

Análise de dados

Contagem das células

A análise da marcação por imunocitoquímica foi realizada por um experimentador desconhecido dos grupos experimentais em estudo utilizando-se um microscópio de fluorescência (AXIO Imager.Z1, Zeiss), acoplado a uma câmara digital (Axiocam MRm) e um software de imagem (Axiovision 4.6). Para se obterem as fotomicrografias, os parâmetros de aquisição de imagens como amplificação,

objectiva, intensidade de luz, contraste e tonalidade foram mantidos constantes.

No que diz respeito à imunodeteção do ATF-3, todas as células IR foram contactadas em cortes seccionais espaçados de 5 em 5 (14 µm × 5) de cada gânglio e esse número foi dividido pelo número total de cortes, contendo corpos celulares dos neurónios aferentes primários, analisados na respectiva lâmina (aproximadamente 9-12 cortes por DRG). A marcação do ATF-3 é nuclear e distinta, e portanto só células com núcleos perfeitamente visíveis foram consideradas. Para a tripla imunodeteção do ATF-3, CGRP e IB4, pelo menos um total de 350 células com núcleo visível, por rato/DRG (o que corresponde a uma média de 1.500 células por grupo experimental), foram aleatoriamente contabilizadas em cerca de oito a nove cortes (espaçados de cinco em cinco) do mesmo gânglio, de modo semelhante ao já descrito^{22,28}. Dependendo do marcador, esta contagem corresponde a cerca de 400-750 neurónios imunorreactivos por grupo experimental. Assim, de forma a avaliar a expressão de ATF-3 e dos dois marcadores de população neuronal, individualmente, as células IR a cada uma das três moléculas foram contabilizadas e divididas pelo número total de neurónios aleatoriamente seleccionados. As percentagens de co-localização entre ATF-3 e CGRP ou ATF-3 e IB4 obtiveram-se dividindo o número de células duplamente marcadas pelo número total de células positivas para ATF-3¹². O mesmo tipo de selecção aleatória e cálculo de percentagens de co-localização foi utilizado para o estudo da expressão de CGRP nos animais MA tratados com cetoprofeno e não tratados.

Distribuição por áreas

As áreas de todas as células positivas para ATF-3 (n = 4 ratos para 7 d MA; n = 5 ratos para todos os outros grupos experimentais) foram medidas. As áreas de neurónios peptidérgicos que expressaram CGRP, seleccionados aleatoriamente durante a contagem das células IR (ponto anterior), foram também obtidas (n = 5 ratos para controlos e 7 d MA; n = 4 ratos para todos os outros grupos experimentais). Para tal, as células IR para cada marcador foram manualmente contornadas usando um rato de computador e desta forma as áreas foram calculadas através de um software de imagem de acesso livre (ImageJ[®] versão 1.37)^{28,29}. Mediante a medida da sua área, as células foram agrupadas em três categorias: pequenas (< 600 µm²), médias (600-1.200 µm²) e grandes (> 1.200 µm²) como descrito anteriormente pelo grupo de Noguchi³⁰.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita através do software *GraphPad Prism 5[®]* (*GraphPad Software*) e SPSS versão 13.0. Para todos os resultados, e tendo em conta o número de grupos experimentais, utilizamos sempre uma análise de

variância (ANOVA) de uma via de forma a investigar possíveis diferenças estatísticas. Esta análise foi seguida de testes *post hoc* adequados sempre que o valor de significância foi $p < 0,05$.

O teste *post hoc* Bonferroni foi utilizado para discriminar diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais, no que diz respeito à expressão individual de ATF-3 e às reacções triplas contra ATF-3, CGRP e IB4. Este teste foi também utilizado para avaliar possíveis diferenças nos diâmetros das patas dos animais. Realizou-se o teste *post hoc* de comparação múltipla de Newman-Keuls com o objectivo de encontrar diferenças significativas na distribuição por tamanhos das células IR tanto a ATF-3 como CGRP. Este teste foi também utilizado na comparação dos diferentes grupos de ratos MA que sofreram tratamento com cetoprofeno (2 d cetoprofeno e 4 d cetoprofeno) e respectivos controlos (animais MA sem tratamento com o fármaco), de forma a discriminar diferenças na expressão de ATF-3 e CGRP.

Resultados

A monoartrite foi induzida com sucesso em todos os animais

Todos os animais injectados com CFA apresentaram sintomas inflamatórios severos tais como inchaço, vermelhidão e transferência de peso para a pata não inflamada. Estes sintomas reflectiram-se em graus inflamatórios perto de 4 (valor máximo na escala descrita por Castro-Lopes, et al.²⁷) logo após o segundo dia de MA ($3,67 \pm 0,12$; Fig. 1 D), condição esta que se manteve até ao 14.º dia ($3,75 \pm 0,13$; Fig. 1 D), o que aliás está de acordo com outros estudos^{31,32}. Os controlos exibiram graus inflamatórios insignificantes ($0,67 \pm 0,11$), reflectindo mínimos sintomas inflamatórios possivelmente devido a trauma local causado pela injeção de veículo. O diâmetro das patas inflamadas dos animais MA apresentou-se significativamente ($p < 0,001$) maior ($1,24 \pm 0,03$ cm de diâmetro para 4 d MA, por exemplo) a todos os tempos de inflamação quando comparados com os respectivos animais controlo ($0,59 \pm 0,02$ cm; Fig. 1 E).

Conclui-se assim que a MA foi induzida com sucesso e homogeneamente em todos os animais injectados com CFA, já que todos eles demonstraram respostas fisiológicas semelhantes a cada tempo de progressão da doença. Todos os animais com sinais de desenvolvimento de poliartrite foram excluídos.

A expressão de ATF-3 é grandemente induzida nos aferentes primários durante a MA

A expressão de ATF-3 foi induzida nos neurónios dos DRG ipsilaterais de ratos MA, a todos os tempos de inflamação (Figs. 1 B e F). O número de células IR ao ATF-3 por corte aumentou significativamente aos dois e quatro dias de MA,

período a partir do qual se notou um decréscimo, muito embora aos 7 e 14 dias de MA a expressão de ATF-3 tenha sido ainda bem maior do que nos controlos. Estes aumentos foram observados nos três níveis de gânglios analisados (L_3 , L_4 e L_5), mas as diferenças foram mais significativas nos gânglios L_4 e L_5 (Fig. 1 F), enquanto nos animais-controlo foi encontrada uma expressão praticamente nula de ATF-3 (Fig. 1 A). Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas apenas para os animais com quatro dias de MA nos gânglios L_4 , e animais com dois e quatro dias de MA nos gânglios L_5 ($p < 0,05$; ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* Bonferroni; Fig. 1 F). Não foi encontrada expressão relevante de ATF-3 em neurónios de DRG contralaterais em nenhum grupo experimental (Fig. 1 C).

As células que expressam ATF-3 são maioritariamente neurónios pequenos a médios

A medida das áreas das células positivas para ATF-3 na MA indicou que estes neurónios são na sua maioria pequenos e médios. Esta observação é particularmente notória nos tempos mais tardios da doença (7 e 14 dias de MA), onde o número de células ATF-3 positivas pertencentes ao grupo dos neurónios de tamanho grande ($> 1.200 \mu\text{m}^2$) é muito menor que o número daquelas que pertencem ao grupo dos neurónios de tamanho pequeno ($< 600 \mu\text{m}^2$) ou médio (600 a $1.200 \mu\text{m}^2$) (Fig. 1 G). A análise estatística demonstrou diferenças significativas no número de células IR ao ATF-3, entre as três classes de tamanhos, apenas para os animais com 14 dias de MA ($1,29 \pm 0,24$; $2,15 \pm 0,38$ e $0,30 \pm 0,10$ células ATF-3 IR/corte para os grupos de tamanhos < 600 , $600-1.200$ e $> 1.200 \mu\text{m}^2$, respectivamente). A maior significância estatística foi encontrada para as diferenças entre as células ATF-3 positivas de médio e grande tamanho ($p < 0,001$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de comparação múltipla de Newman-Keuls), no fundo reflectindo o pequeno número de células que expressam ATF-3 com área superior a $1.200 \mu\text{m}^2$ (Fig. 1 G).

A expressão de ATF-3 é maior em neurónios peptidérgicos do que não-peptidérgicos

Nas reacções triplas realizadas contra ATF-3, CGRP e IB4, a análise individual da expressão de ATF-3 (Fig. 2 A) corroborou com os dados previamente obtidos confirmando que na MA há uma indução da expressão deste factor de transcrição nos neurónios aferentes primários do lado ipsilateral à pata inflamada. Desta forma, a expressão de ATF-3 foi sempre mais elevada nos animais MA quando comparando com os controlos não inflamados que mostraram níveis insignificantes da expressão desta proteína ($0,06\% \pm 0,06$ células ATF-3 IR na população total de neurónios). Assim como nos resultados anteriores, os animais com dois ($6,07\% \pm 1,02$ células ATF-3 IR na

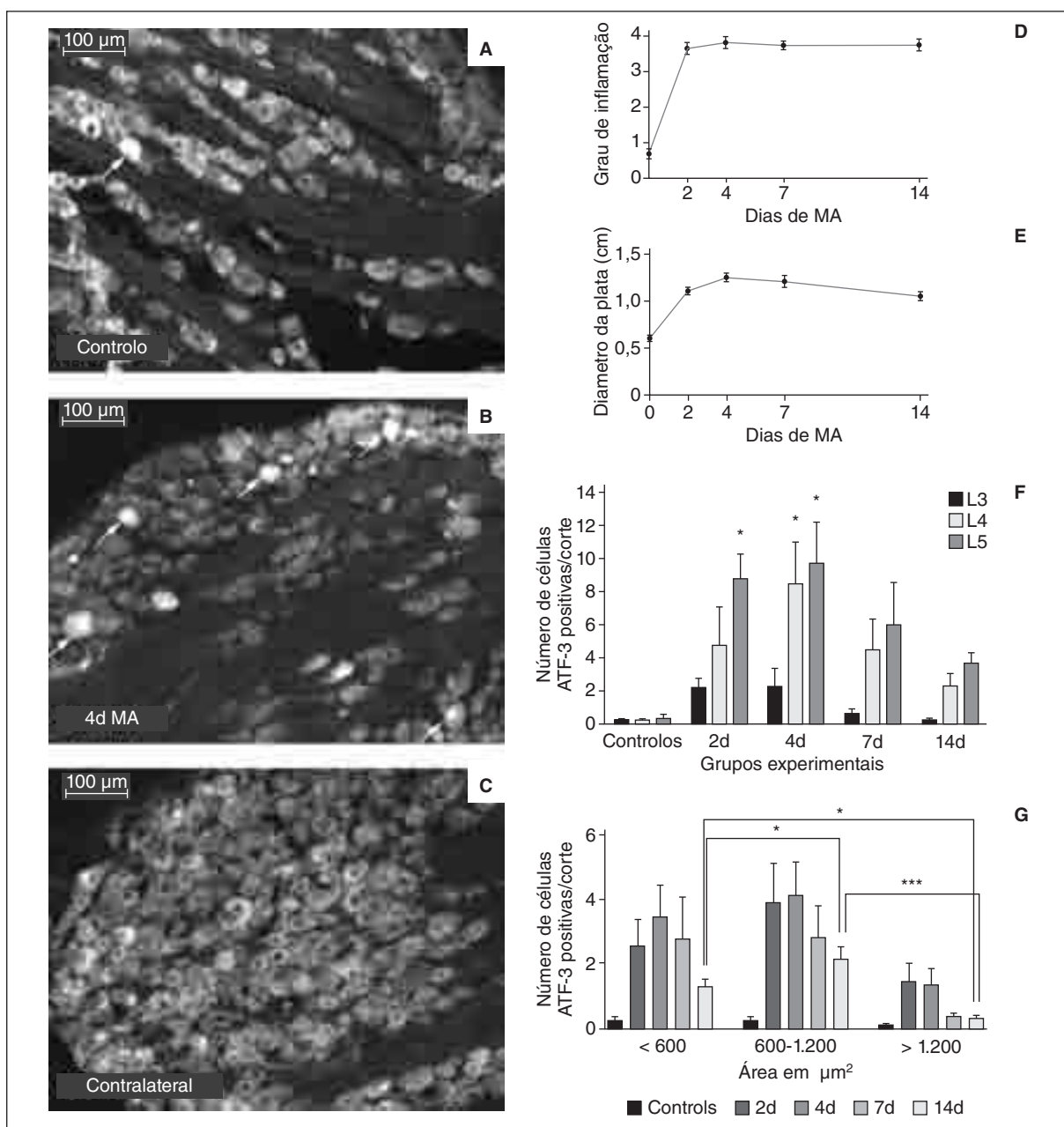


Figura 1. Expressão de ATF-3 nos neurónios aferentes primários de ratos monoartríticos. **A, B e C:** fotografias captadas em microscópio de fluorescência, onde se observa marcação nuclear para o ATF-3 nos neurónios de um gânglio L₅ ipsilateral de um rato controlo não-inflamado (**A**), de um rato injectado com CFA com quatro dias de MA (**B**), e dum gânglio L₅ contralateral de um rato com quatro dias de MA (**C**). As células que expressam ATF-3 apresentam núcleo marcado de vermelho (setas). Escala representa 100 μm. Gráficos: **(D)** os ratos MA apresentaram sinais de inflamação graves que corresponderam a graus inflamatórios com pontuação máxima²⁷ logo aos dois dias após injeção com CFA, tendo esses valores se mantido durante todo o período da patologia. **E:** o diâmetro da pata injectada também foi também consideravelmente maior do que o da pata contralateral ou do que o observado nos animais-controlo, tendo apresentado um padrão temporal semelhante ao detectado para o grau inflamatório. **F:** o número de células positivas para ATF-3 por corte aumentou significativamente (em comparação com os controlos) aos quatro dias de MA nos gânglios L₄ e aos dois e quatro dias de MA nos gânglios L₅. Embora não tenham sido alcançadas significâncias estatísticas para outros tempos de MA, os animais inflamados apresentaram sempre valores de expressão de ATF-3 superiores aos controlos. Os valores estão apresentados como média ± erro-padrão da média (SEM). *representa $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Bonferroni). $n = 5$ ratos por cada grupo experimental. **G:** a distribuição por áreas das células IR ao ATF-3 foi feita tal como descrito por Fukuoka, et al.³⁰, tendo revelado que estas são maioritariamente neurónios pequenos (menores que 600 μm²) e médios (entre 600 e 1 200 μm²) a todos os tempos de MA. Isto foi particularmente evidente nos tempos mais tardios da patologia (14 d MA), aos quais as diferenças significativas foram detectadas entre categorias de diferentes tamanhos. Os valores estão apresentados como média ± SEM. *representa $p < 0,05$ e ***representa $p < 0,001$. A ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de comparações múltiplas de Newman-Keuls, para avaliar diferenças entre o número de células IR encontrado em cada categoria de tamanho, relativamente a cada grupo experimental. $n = 5$ ratos para todos os grupos excepto para os 7d MA em que $n = 4$ ratos.

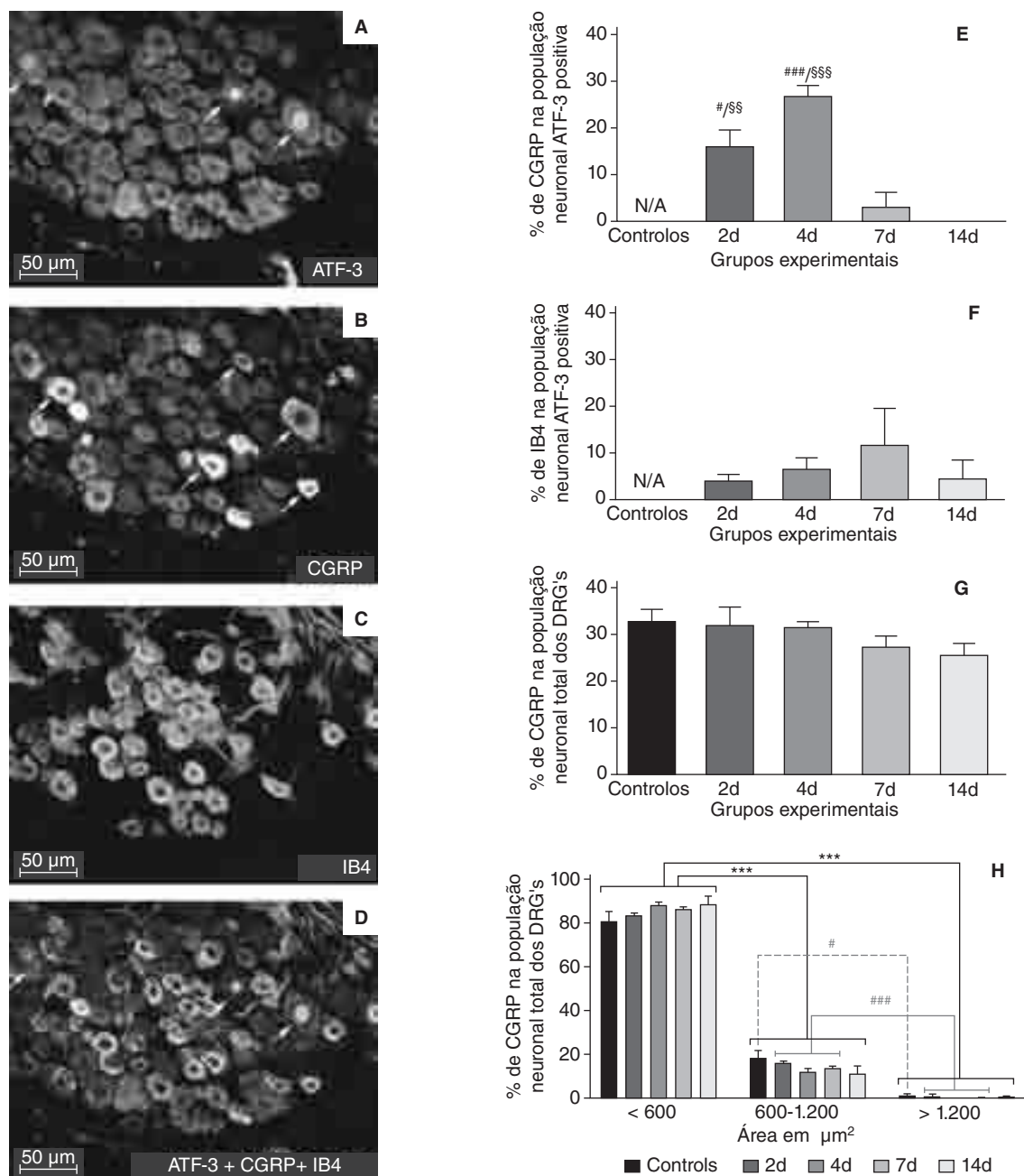


Figura 2. Co-localização de ATF-3 com CGRP e IB4, e padrão de expressão de CGRP (A, B, C e D). Fotografias, captadas em microscópio de fluorescência, onde se observa marcação nuclear para o ATF-3 (núcleo verde) (A), CGRP (citoplasma vermelho) (B), IB4 (citoplasma azul) (C) e células com marcação tripla (D), nos neurónios de um gânglio L_5 de um rato com 4d MA (ampliação 20 vezes). Escala representa 50 μm . Gráficos: (E) a co-localização entre ATF-3 e cada um dos marcadores de populações neuronais foi mais baixa do que o esperado, no entanto foram encontradas diferenças significativas na co-localização com CGRP no ratos com dois e quatro dias de MA. F: não foram encontradas diferenças semelhantes para a co-localização com IB4, a nenhum tempo da patologia. G: a análise individual da expressão de CGRP revelou uma pequena tendência para o decréscimo ao longo da progressão da MA, embora não tenha sido detectada significância estatística. Os valores apresentados em percentagem como média \pm SEM. **representa $p < 0,01$ e ***representa $p < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Bonferroni). $n = 5$ ratos para os grupos-controlo e 4 d MA; e $n = 4$ para todos os outros grupos experimentais. H: a distribuição por áreas, da percentagem de células IR ao CGRP relativamente à totalidade da população neuronal, foi feita tal como descrito por Fukuoka, et al.³⁰, tendo revelado que não ocorre alteração da população neuronal durante a MA, indicando que esses neurónios peptidérgicos apresentam tamanho médio. Os valores estão apresentados como média \pm SEM. *foi usado para representar diferenças significativas entre neurónios pequenos relativamente às outras duas categorias de tamanho (médios e grandes); #foi usado para representar diferenças significativas entre neurónios médios e grandes. #representa $p < 0,05$ e ###representa $p < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de comparações múltiplas de Newman-Keuls). $n = 5$ ratos para os grupos-controlo e 4d MA; e $n = 4$ para todos os outros grupos experimentais.

população total de neurónios) e quatro dias de MA (7,96% ± 2,38 células ATF-3 IR na população total de neurónios) foram os que evidenciaram maiores níveis de ATF-3, significativamente diferentes em comparação com os ratos-controlo injectados com veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ para os animais com dois e quatro dias de MA, respectivamente; ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* Bonferroni) (dados não apresentados).

As percentagens de co-localização entre ATF-3 e CGRP (marcador de aferentes primários peptidérgicos) na população neuronal ATF-3 positiva (Figs. 2 D e E) foram relativamente baixas nos ratos MA, principalmente para os tempos mais tardios da doença (aos 14 dias de MA é mesmo inexistente). Como esperado, não foi encontrada qualquer co-localização nos animais-controlo, onde não há praticamente nenhuma expressão de ATF-3. Contudo, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na população de neurónios ATF-3 positivos que expressam também CGRP. Assim foram encontrados valores significativamente diferentes para os animais com dois dias de MA (15,96% ± 4,10 células CGRP + ATF-3 IR na população neuronal de ATF-3) e quatro dias de MA (26,73% ± 2,36) comparativamente aos controlos (Fig. 2 E). Estes aumentos nas percentagens de co-localização aos dois e quatro dias de MA podem reflectir os aumentos da expressão de ATF-3 a estes tempos de progressão da doença. Contudo, o mesmo comportamento não foi observado para os valores de co-localização entre ATF-3 e IB4 (marcador de aferentes primários não-peptidérgicos) na população neuronal ATF-3 positiva. Neste caso não foram encontradas quaisquer diferenças significativas e os valores foram ainda mais baixos (Figs. 2 C, D e F).

A quantificação do número de células CGRP (Fig. 2 B) e IB4 IR (Fig. 2 C) nos gânglios ipsilaterais à pata inflamada, revelou não existirem quaisquer diferenças significativas na expressão destas duas moléculas, ao longo da MA. Contudo, muito embora não alcançando diferenças estatisticamente significativas, denotou-se um ligeiro decréscimo na expressão de CGRP ao longo da progressão da doença (8% de decréscimo, com 25,71% ± 2,57 de células CGRP IR para os animais com 14 dias de MA e 33,01% ± 2,56 para os controlos) (Fig. 2 G). A percentagem de células CGRP positivas nos gânglios L₅ ipsilaterais (33,01 ± 2,56; 32,04 ± 4,00; 31,61 ± 1,31; 27,45 ± 2,39 e 25,71 ± 2,57 para controlos e animais com 2, 4, 7 e 14 dias de MA respectivamente) foi um pouco menor do que o normalmente descrito, já que o CGRP está presente em cerca de 40% dos neurónios dos DRG²².

As células que expressam CGRP não sofrem alteração de população neuronal, durante a MA

A maioria das células que expressam CGRP, consideradas na população total de neurónios CGRP positivos, têm tamanho pequeno (mais de

80% para todos os grupos experimentais), sendo que uma menor porção pertence à categoria dos neurónios de tamanho médio (cerca de 15%; sem diferenças significativas entre os grupos experimentais). Por outro lado, a percentagem de neurónios grandes CGRP positivos é praticamente nula (Fig. 2 H). O mesmo padrão de distribuição por tamanhos foi obtido quando consideradas as células que expressam CGRP relativamente à população total de neurónios do gânglio (dados não apresentados).

Não foram encontradas quaisquer alterações no padrão de distribuição destas células pelos três tamanhos em resposta à MA. Na verdade, os valores de percentagem (tanto tendo em conta a população CGRP positiva como a população neuronal total dos DRG) foram muito semelhantes entre todos os grupos experimentais (Fig. 2 H).

O tratamento com cetoprofeno não afectou a indução da expressão de ATF-3 durante a MA, mas aumentou a expressão de CGRP

Os animais tratados com cetoprofeno apresentaram patas com diâmetros significativamente ($p < 0,01$) inferiores (1,06 ± 0,05 cm e 0,96 ± 0,04 cm para 4 d MA + 2 d cet e 4 d MA + 4 d cet, respectivamente) que os animais MA não tratados (1,24 ± 0,03 cm para animais com 4 d MA), muito embora os sintomas inflamatórios principais se mantivessem.

Contudo, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de ATF-3 (Figs. 3 A, C e E) nos animais MA sujeitos tanto ao tratamento durante dois (6,38% ± 1,24) como durante quatro dias (8,05% ± 1,38) com o anti-inflamatório, comparativamente aos animais MA sem tratamento (5,66% ± 0,73) (Fig. 3 G). A expressão de ATF-3 nos gânglios L₅ contralaterais à pata inflamada, nos dois grupos experimentais de animais tratados com cetoprofeno, foi praticamente nula, como aliás já observado em animais MA (dados não apresentados).

No que diz respeito à expressão de CGRP (Figs. 3 B, D e F), os animais MA não tratados revelaram valores significativamente inferiores (31,61% ± 1,31) que os animais MA sujeitos a tratamento com cetoprofeno durante dois (43,51% ± 2,20; $p < 0,01$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de comparação múltipla de Newman-Keuls) e quatro dias (37,75% ± 2,29; $p < 0,05$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de comparação múltipla de Newman-Keuls) (Fig. 3 H).

Discussão

Em animais com MA, induzida por injeção intra-articular de CFA, foi observada uma expressão significativa de ATF-3 nos neurónios aferentes primários dos DRG L₃, L₄ e L₅ ipsilaterais à articulação inflamada. Para além disso, essa expressão foi mais significativa nos gânglios L₅, de acordo com a somatotopia de

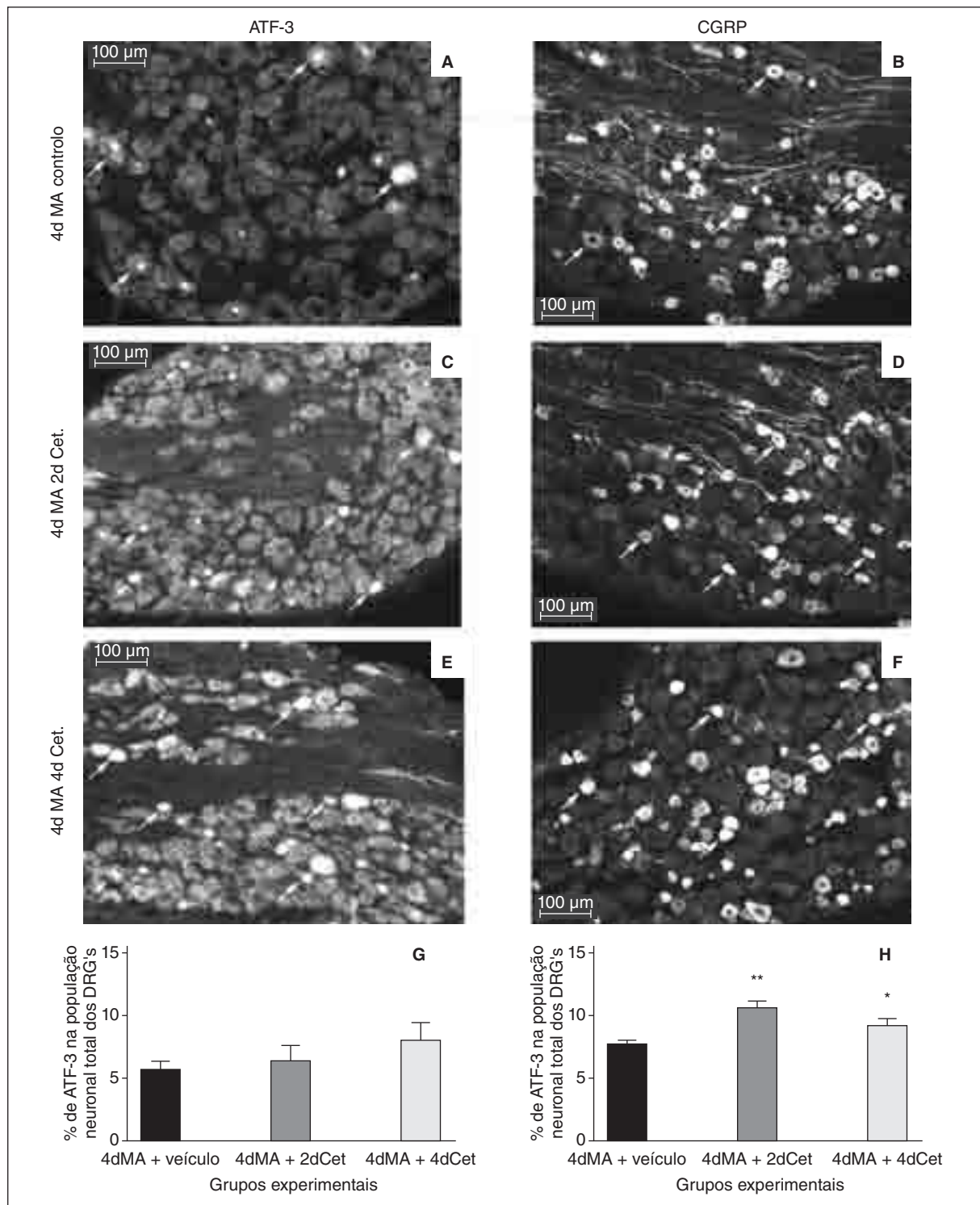


Figura 3. Efeito do tratamento com cetoprofeno na expressão de ATF-3 e CGRP (**A, B, C, D, E e F**). Fotografias captadas em microscópio de fluorescência, onde se observa a imunodeteção para o ATF-3 (núcleos vermelhos apontados com setas brancas na coluna esquerda) (**A, C e E**) e para CGRP (citoplasma vermelho apontados com setas brancas na coluna direita) (**B, D e F**), nos gânglios L_5 de ratos com 4d MA e que foram injectados com veículo (**A e B**), ratos com 4 d MA sujeitos a 2d de tratamento com cetoprofeno (**C e D**) e ratos com 4d MA sujeitos a 4d de tratamento com cetoprofeno (**E e F**). Gráficos: (**G**) a expressão de ATF-3 manteve-se induzida nos animais MA após tratamento com o anti-inflamatório. Nenhuma alteração significativa foram encontradas entre qualquer dos grupos experimentais. Os valores estão apresentados como média \pm SEM (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de comparações múltiplas de Newman-Keuls). $n = 4$ ratos para cada um dos três grupos experimentais. **H**: o número de células IR ao CGRP aumentou significativamente nos gânglios L_5 dos ratos MA pertencentes aos dois grupos experimentais que foram tratados com o anti-inflamatório. Os valores estão apresentados como média \pm SEM. *representa $p < 0,05$ e **representa $p < 0,01$ (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de comparações múltiplas de Newman-Keuls). $n = 5$ ratos para cada um dos três grupos experimentais.

enervação da pata, e foi notória e mais aumentada logo após os primeiros tempos de instalação da doença (aos dois e quatro dias de MA). Sendo o ATF-3 considerado um marcador de lesão neuronal³⁶, estes dados indiciam que esteja a ocorrer algum grau de dano neuronal pelo menos nos tempos iniciais da patologia, apesar de a MA ser vista como um modelo de dor inflamatória. Isto está de acordo com os estudos de Ivanavicius e colaboradores que também observaram uma grande expressão de ATF-3 no modelo de OA induzida por injeção de monoiodoacetato na articulação do joelho, e que foi sugestiva de uma possível neuropatia na origem da doença¹¹. No mesmo modelo de OA, foram recentemente observados no nosso laboratório dados semelhantes relativamente à expressão de ATF-3 (comunicação pessoal, Ferreira-Gomes J, et al.). Controversamente, outros investigadores mostraram que na artrite do joelho induzida por injeção de colagénio não ocorre expressão de ATF-3 nos DRG, embora se tenha verificado uma densa infiltração macrófágica, sugerindo que uma inflamação profunda não é capaz, por si só, de desencadear a indução de ATF-3¹⁴. Alguns dados experimentais sugerem que diferentes agentes indutores provocam efeitos distintos na expressão de ATF-3. De facto, Braz e Basbaum¹² mostraram que diferentes estímulos químicos induzem um padrão estável de expressão significativa de ATF-3 nos DRG, mas que é dependente da dose e do tempo após injeção. No entanto, os mesmos autores não observaram qualquer expressão de ATF-3 após injeção intraplantar de CFA¹². Tendo em consideração os resultados obtidos neste trabalho nos ratos monoartríticos, parece que o CFA só induz expressão de ATF-3 nos aferentes primários, e portanto lesão neuronal periférica, quando injectado em articulações, o mesmo não ocorrendo quando é injectado na superfície plantar. Isto poderá estar relacionado com uma específica sensibilização de nociceptores encontrados nas articulações, distinta daquela que ocorrerá na pele¹. De facto, a maioria da investigação tem-se focado no estudo da nocicepção cutânea, enquanto os mecanismos de dor articular têm sido menos explorados, e como tal a distinta organização neuronal nociceptiva associada às articulações está também menos esclarecida. Alguns autores sugerem mesmo que a maior incidência de dor crónica em tecidos profundos e nas articulações pode repercutir uma maior vulnerabilidade das estruturas anatómicas envolvidas¹.

A medição das áreas dos neurónios que expressaram ATF-3 indicou que estes estão maioritariamente distribuídos entre as populações de células pequenas a médias nos DRG L₅ de ratos MA. Esta distribuição por áreas foi relativamente constante durante a progressão da patologia. Diferenças significativas dentro de cada grupo experimental foram somente encontradas aos 14 dias, indicando que nas fases finais da MA o

ATF-3 é induzido maioritariamente em neurónios com áreas médias. No entanto, a imunodeteção tripla para o ATF-3 e os marcadores neuronais CGRP e IB4 não evidenciou os níveis de co-localização com ATF-3 que eram esperados após análise das áreas das células positivas ao ATF-3. O número de células IR ao IB4 não se alterou significativamente durante a MA (nos diferentes tempos) ou quando comparado com os controlos (cerca de 45-50% de células positivas). Para além do mais, a co-localização de ATF-3 com IB4 não se modificou entre grupos experimentais, tendo sido, aliás, bastante baixa. Considerando que um elevado número de neurónios positivos para o ATF-3 apresentaram áreas pequenas, esta baixa co-localização com IB4 parece estranha, uma vez que o IB4 marca células maioritariamente pequenas e médias. No entanto, outros autores não encontraram quaisquer células duplamente IR ao ATF-3 e IB4 após lesão neuronal severa²⁸.

A co-localização entre ATF-3 e CGRP aumentou significativamente aos dois e quatro dias de MA. Esses resultados reflectem os aumentos significativos na expressão de ATF-3 que já tinham sido verificados a esses tempos da doença. No entanto, o mesmo não foi observado relativamente à co-localização com IB4. Logo, este acréscimo na co-localização com ATF-3 provavelmente significa que o ATF-3 é induzido maioritariamente em aferentes primários com características peptidérgicas, nos tempos iniciais da MA. Este facto certamente terá repercussões relevantes no processamento da dor na medula espinal, uma vez que, no rato, a maior fonte de CGRP no corno dorsal são os aferentes primários^{18,33-35}. No entanto, os valores desta co-localização com CGRP foram mais baixos do que o esperado se for tido em consideração que um elevado número de neurónios positivos para o ATF-3 durante a MA pertence a populações com áreas pequenas a médias. De facto, a expressão de ATF-3 já foi associada com uma expressão reduzida do ARNm para o CGRP após esmagamento do nervo sural, tendo sido observado que o CGRP foi expresso exclusivamente em neurónios não lesados (logo, negativos para o ATF-3) situados na vizinhança de neurónios sensitivos danificados. Foi sugerido que estes últimos podem modificar a forma como o CGRP é expresso nos neurónios intactos³⁶. Em concordância, propomos que no modelo da MA de dor inflamatória articular, o ATF-3 seja induzido em neurónios danificados que perdem gradualmente a sua capacidade de produzir importantes biomoléculas, tais como neuropeptídeos. Isto poderá ser também uma possível explicação para a baixa co-localização encontrada entre ATF-3 e CGRP/IB4.

O CGRP é libertado normalmente em condições de estimulação dolorosa, potenciando a sinalização nociceptiva¹⁸, e tem sido indicado como desempenhando importantes funções na manutenção de estados de dor, tanto neuropática como inflamatória^{21,22,37,38}. Na MA, embora não

tenham sido encontradas diferenças significativas, foi observado um pequeno decréscimo da expressão de CGRP ao longo da progressão da doença. Galeazza, et al. observaram um aumento considerável na libertação de CGRP dos DRG durante o desenvolvimento de inflamação e hiperalgisia, explicando desta forma o número significativamente diminuído de células IR a CGRP encontradas em aferentes primários dois dias após injeção subcutânea de CFA³⁸. Um aumento continuado nos níveis do ARNm para o precursor de CGRP nos DRG L₃-L₅ foi também detectado logo após dois dias de inflamação periférica. Síntese *de novo* de CGRP nos DRG parece ter levado ao restauo dos seus valores de imunoreactividade, o que, juntamente com o seu transporte para os terminais centrais, foi responsável pelos seus valores de expressão aumentados no corno dorsal da medula espinal lombar, oito dias após injeção de CFA³⁸. Num modelo de inflamação do cólon, outros autores também justificaram os decréscimos iniciais no conteúdo de CGRP com a sua maior necessidade tanto a nível central como periférico³⁹. De acordo, o pequeno decréscimo observado nos níveis de CGRP durante a MA poderá, de modo semelhante, ser explicado pela sua libertação aumentada. Ademais, a MA difere dos modelos em que o CFA é injectado na superfície plantar, visto que a indução de ATF-3 observada indica que, muito possivelmente, ocorre lesão neuronal. Este baixo decréscimo, e o facto de pelo menos até aos 14 dias de MA não haver recuperação da expressão de CGRP (tal como observado por Galeazza, et al.³⁸), poderão ser provavelmente justificados por perda celular, principalmente de neurónios peptidérgicos, como, de facto, a co-localização de ATF-3 e CGRP sugere. Os modelos distintos de inflamação usados, bem como os diferentes padrões temporais e de severidade das respostas, podem contribuir para as divergências de dados. O facto de essas diminuições não serem estatisticamente significativas parece estar de acordo com outros estudos nos quais a expressão de CGRP se encontrou significativamente alterada nos DRG somente a tempos tardios (21 dias), na dor artrítica³⁷. A medição das áreas das células que expressam CGRP mostrou que estas são maioritariamente pequenas e que não ocorre modificação da população neuronal implicada, indiciando que este peptídeo é expresso em neurónios com um perfil de tamanho idêntico durante toda a MA, tal como observado por Galeazza, et al. no modelo de dor usado por estes autores³⁸.

Os animais MA foram também injectados com um fármaco anti-inflamatório (cetoprofeno) da classe de inibidores das COX. Estas enzimas estão envolvidas na produção de prostanóides que estão descritos como tendo um efeito importante na instalação do processo inflamatório⁴⁰. A sobre-regulação de COX-2 e produção de prostanóides são hoje conhecidos como constituindo

o mecanismo central subjacente ao aumento da hiperalgisia mecânica e térmica em muitos modelos de inflamação periférica⁴⁰, tal como é considerada a MA. A administração do fármaco anti-inflamatório não reverteu a expressão de ATF-3, em nenhum grupo experimental, visto que não foram detectadas diferenças significativas entre os animais MA tratados com cetoprofeno (dois ou quatro dias de cetoprofeno) e MA não tratados. De facto, Ivanavicius, et al. também verificaram uma ausência de eficácia de um inibidor da COX não-selectivo no modelo de OA, sugerindo que a inflamação não foi crucial na manutenção do comportamento nociceptivo¹¹. Assim, concluímos que é improvável que a produção de prostanóides constitua a causa primária de indução de ATF-3, e consequente lesão neuronal, no modelo da MA. Os animais tratados com cetoprofeno apresentaram redução do diâmetro da pata inflamada comparativamente aos ratos MA não-tratados, embora isto não se tenha reflectido na expressão de ATF-3, sugerindo que o dano neuronal continua a ocorrer. Nos animais tratados com cetoprofeno foi detectada uma maior expressão de CGRP, especialmente no grupo 4 d MA + 2 d cet. Staton, et al. observaram uma expressão de CGRP diminuída entre os dias 13 e 17 após administração oral de rofecoxib a ratos injectados com CFA no Joelho¹⁹. Uma quantificação separada de células pequenas e médias, mas particularmente os diferentes tratamentos (vias de administração e tempos), poderão contribuir para a discordância com os nossos dados na MA. De notar que no nosso estudo os tratamentos foram iniciados num tempo em que a indução de ATF-3 estava no seu pico máximo, quando aparentemente a lesão neuronal está a acontecer. Considerando os estudos de Galeazza, et al.³⁸, é possível que o fármaco anti-inflamatório esteja a bloquear a libertação de CGRP dos DRG, embora os níveis de ARNm possam continuar elevados devido à existência de neuropatia. Estas duas condições poderão levar a maiores valores de imunoreactividade para o CGRP, encontrada nos animais MA tratados com cetoprofeno.

Em conclusão, o ATF-3 é expresso nos DRG nas fases iniciais de instalação da MA em ratos, indicando a ocorrência de lesão neuronal. Isto é provavelmente devido ao ambiente neuroinflamatório gerado pela injeção intra-articular de CFA.

Agradecimentos

O trabalho foi em parte financiado pelo Programa Doutoral em Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Os autores estão gratos ao Prof. António Avelino pela sua preciosa ajuda nas reacções de imunodeteção tripla e agradecem à Sra. Elisa Nova pela sua assistência técnica durante o corte dos gânglios no crióstato.

Bibliografia

1. Schaible HG, Richter F, Ebersberger A, et al. Joint pain. *Exp Brain Res*. 2009;196(1):153-62.
2. Lu D, Chen J, Hai T. The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J*. 2007;401(2):559-67.
3. Nobori K, Ito H, Tamamori-Adachi M, et al. ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(10):1387-97.
4. Ohba N, Maeda M, Nakagomi S, Muraoka M, Kiyama H. Biphasic expression of activating transcription factor-3 in neurons after cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;115(2):147-56.
5. Francis JS, Dragunow M, During MJ. Over expression of ATF-3 protects rat hippocampal neurons from in vivo injection of kainic acid. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;124(2):199-203.
6. Chen HM, Wang L, D'Mello SR. Inhibition of ATF-3 expression by B-Raf mediates the neuroprotective action of GW5074. *J Neurochem*. 2008;105(4):1300-12.
7. Obata K, Yamanaka H, Fukuoka T, et al. Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain*. 2003;101(1-2):65-77.
8. Peters CM, Ghilardi JR, Keyser CP, et al. Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. *Exp Neurol*. 2005;193(1):85-100.
9. Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci*. 2000;15(2):170-82.
10. Inglis JJ, Nottley CA, Essex D, et al. Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia: functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumor necrosis factor blockade. *Arthritis Rheum*. 2007;56(12):4015-23.
11. Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, Westwood FR, Murray F, Read SJ. Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain*. 2007;128(3):272-82.
12. Braz JM, Basbaum AI. Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain*. 2010;150(2):290-301.
13. Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R807-16.
14. Segond von Banchet G, Boettger MK, Fischer N, Gajda M, Brauer R, Schaible HG. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor-alpha-dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain*. 2009;145(1-2):151-9.
15. Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain*. 1992;48(1):73-81.
16. Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 1995;7(7):1484-94.
17. Ryu PD, Gerber G, Murase K, Randic M. Actions of calcitonin gene-related peptide on rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Res*. 1988;441(1-2):357-61.
18. Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;194(2):451-91.
19. Staton PC, Wilson AW, Bountra C, Chessell IP, Day NC. Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory model of the rat knee joint: differential modulation by rofecoxib and paracetamol. *Eur J Pain*. 2007;11(3):283-9.
20. Blesch A, Tuszynski MH. GDNF gene delivery to injured adult CNS motor neurons promotes axonal growth, expression of the trophic neuropeptide CGRP, and cellular protection. *J Comp Neurol*. 2001;436(4):399-410.
21. Zheng LF, Wang R, Xu YZ, Yi XN, Zhang JW, Zeng ZC. Calcitonin gene-related peptide dynamics in rat dorsal root ganglia and spinal cord following different sciatic nerve injuries. *Brain Res*. 2008;1187:20-32.
22. Ruiz G, Banos JE. The effect of endoneurial nerve growth factor on calcitonin gene-related peptide expression in primary sensory neurons. *Brain Res*. 2005;1042(1):44-52.
23. Nascimento D, Pozza DH, Castro-Lopes JM, Neto FL. Altered expression of ATF-3 in primary afferent neurons during inflammatory pain. *Eur J Pain*. 2009;13(Suppl 1):S52.
24. Nascimento D, Pozza DH, Castro-Lopes JM, Neto FL. Induced expression of the neuronal injury marker ATF3 in primary afferents during monoarthritis: characterization of the neuronal populations involved. In Society for Neuroscience, 2010. Online. 2010. San Diego, CA: Program No 586.3/ZZ9. 2010 Neuroscience Meeting Planner.
25. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.
26. Lourenco Neto F, Schadrack J, Platzer S, Zieglgansberger W, Tolle TR, Castro-Lopes JM. Expression of metabotropic glutamate receptors mRNA in the thalamus and brainstem of monoarthritic rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;81(1-2):140-54.
27. 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(4):296-301.
28. Averill S, Michael GJ, Shortland PJ, et al. NGF and GDNF ameliorate the increase in ATF3 expression which occurs in dorsal root ganglion cells in response to peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*. 2004;19(6):1437-45.
29. Ferreira-Gomes J, Adaes S, Sarkander J, Castro-Lopes JM. Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats. *Arthritis Rheum*. 2010;62(12):3677-85.
30. Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J Neurosci*. 2001;21(13):4891-900.
31. Neto FL, Carvalhosa AR, Ferreira-Gomes J, Reguenga C, Castro-Lopes JM. Delta opioid receptor mRNA expression is changed in the thalamus and brainstem of monoarthritic rats. *J Chem Neuroanat*. 2008;36(2):122-7.
32. Schadrack J, Neto FL, Ableitner A, et al. Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience*. 1999;94(2):595-605.
33. Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, et al. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci*. 1984;4(12):3101-11.
34. Tuchscherer MM, Seybold VS. A quantitative study of the coexistence of peptides in varicosities within the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci*. 1989;9(1):195-205.
35. Yashpal K, Kar S, Dennis T, Quirion R. Quantitative autoradiographic distribution of calcitonin gene-related peptide (hCGRP alpha) binding sites in the rat and monkey spinal cord. *J Comp Neurol*. 1992;322(2):224-32.
36. Li XQ, Verge VM, Johnston JM, Zochodne DW. CGRP peptide and regenerating sensory axons. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(10):1092-103.
37. Calza L, Pozza M, Zanni M, Manzini CU, Manzini E, Hokfelt T. Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience*. 1998;82(2):575-89.
38. Galeazza MT, Garry MG, Yost HJ, Strait KA, Hargreaves KM, Seybold VS. Plasticity in the synthesis and storage of substance P and calcitonin gene-related peptide in primary afferent neurons during peripheral inflammation. *Neuroscience*. 1995;66(2):443-58.
39. Traub RJ, Hutchcroft K, Gebhart GF. The peptide content of colonic afferents decreases following colonic inflammation. *Peptides*. 1999;20(2):267-73.
40. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(7):521-32.

Neuropatia Periférica Induz Instabilidade na Codificação de Informação Espacial Pelas *Place Cells* da Área CA1 do Hipocampo Dorsal

Helder Cardoso-Cruz^{1,2}, Deolinda Lima^{1,2} e Vasco Galhardo^{1,2}

Resumo

Vários estudos têm demonstrado que o hipocampo responde a estimulação dolorosa e que o seu funcionamento pode estar alterado em condições de dor crónica. O presente estudo pretendeu avaliar se a indução de um modelo de dor neuropática periférica pode afectar as funções básicas de processamento do hipocampo, como seja a codificação da informação espacial efectuada pelas *place cells* da área CA1. Estas *place cells* disparam preferencialmente em determinadas posições do meio ambiente e o seu mapa espacial de disparo permanece estável ao longo de múltiplas sessões experimentais, mesmo no caso de os animais serem removidos do ambiente de teste por longos períodos. Para estudar o efeito de uma condição de dor prolongada na estabilidade da codificação das *place cells*, foram implantados cronicamente matrizes de eléctrodos na área CA1 do hipocampo de ratos adultos e registada a actividade neuronal multicanal durante a execução de uma tarefa comportamental simples de alternância para obtenção de recompensa. A actividade das *place cells* foi monitorizada durante um período de três semanas, antes e depois da indução de um modelo animal de neuropatia – *spared nerve injury* (SNI). Os dados obtidos demonstraram que a lesão do nervo induz um aumento do número de *spatial fields* codificados por cada célula e um aumento do seu tamanho. Para além destas alterações, foi observado um aumento da coerência de disparo dentro dos *spatial fields*, enquanto o índice que mede a quantidade de informação espacial que cada disparo consegue aportar sobre a localização do animal diminuiu ao longo do tempo. Outros parâmetros de caracterização espacial permaneceram inalterados entre os grupos experimentais. Estes resultados demonstraram que a integração da informação espacial pelas *place cells* é claramente alterada durante a instalação de uma condição de dor neuropática.

Palavras-chave: Hipocampo. *Place cells*. Dor neuropática. Informação espacial. Registos multicanal. Rato.

Abstract

Several physiological, pharmacological, and behavioral studies suggest that the hippocampal CA1 complex-spike “place” cells respond to persistent noxious activation. These place cells have the unique property of showing spatially selective activity, firing, strongly when the animal is in a certain location or place in the environment (place field). The aim of the present study is to evaluate if the induction of persistent peripheral neuropathic pain would affect basic hippocampal processing such as the spatial encoding performed by CA1 place cells. These place cells fire preferentially in a certain spatial position in the environment, and this spatial mapping remains stable across multiple experimental sessions even when the animal is removed from the testing environment. To address the effect of prolonged pain on the stability of place cell encoding, we chronically

¹Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC)
Grupo de Morfofisiologia do Sistema Somatossensitivo
Universidade do Porto
Porto

²Departamento de Biologia Experimental
Faculdade de Medicina
Universidade do Porto
Porto
E-mail: galhardo@med.up.pt

implanted arrays of electrodes in the CA1 hippocampal region of adult rats and recorded the multichannel neuronal activity during a food-reinforced alternation task in a U-shaped runway. The activity of place cells was followed over a three-week period before and after the establishment of an animal model of neuropathy – spared nerve injury (SNI). Our results show that the nerve injury increased the number of place fields encoded per cell and the mapping size of the place fields. In addition, there was an increase of in-field coherence, while the amount of spatial information content that a single spike conveyed about the animal location decreased over time. Other measures of spatial tuning (in-field firing rate, firing peak, and number of spikes) were unchanged between the experimental groups. These results demonstrate that the functioning of spatial place cells is altered during chronic pain conditions. (Dor. 2012;20(2):24-34)

Corresponding author: Vasco Galhardo, galhardo@med.up.pt

Key words: Hippocampus. Place cell. Neuropathic pain. Spatial information. Multichannel recording. Rat.

Introdução

O hipocampo é conhecido pelo seu papel crucial nos processos de aprendizagem e de memória. Uma das características particulares dos neurónios piramidais que se encontram nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo é o facto de codificarem a localização espacial do animal no meio onde se encontra¹. Estas *place cells* aumentam a sua frequência de disparo quando o animal se encontra numa posição particular do seu meio ambiente (o seu campo receptivo espacial ou *spatial field*)^{2,3}; esse *spatial field* é habitualmente estável ao longo de várias visitas ao mesmo ambiente de teste, mesmo no caso do animal ser retirado do ambiente de teste por longos períodos^{4,5}. Na literatura, vários estudos demonstram que alterações nas características espaciais ou conteúdo motivacional do meio ambiente de teste podem afectar a estabilidade dos *spatial fields*^{4,6-9}. Essa estabilidade pode ser ainda alterada por manipulações farmacológicas do hipocampo¹⁰⁻¹² ou por lesão directa do hipocampo ou de outras áreas interconectadas¹³⁻¹⁷.

Para além da informação espacial, o hipocampo está envolvido na regulação de diversos aspectos comportamentais associados à adaptação a situações adversas, incluindo a dor¹⁸⁻²⁰. Os neurónios do hipocampo respondem à estimulação dolorosa²⁰⁻²⁶, e estudos de imagiologia em humanos comprovaram a sua activação durante estimulação dolorosa aguda²⁷⁻²⁹. Por outro lado, a hipocampectomia parcial tem sido utilizada em humanos, embora com sucesso moderado no tratamento de síndromes de dor crónica³⁰, ao passo que a inactivação da transmissão sináptica do hipocampo revelou ter atenuado o comportamento nociceptivo em ratos sujeitos ao modelo do formol^{23,31,32}.

Apesar de todo o conhecimento adquirido acerca de como o hipocampo afecta o processamento da dor, pouco é conhecido acerca de como a dor afecta o funcionamento do hipocampo. Alguns estudos demonstraram que a dor crónica altera a expressão de c-Fos^{33,34}, perturbam os mecanismos de *long term potentiation* (LTP)^{35,36},

e causam diminuições na volumetria do hipocampo^{37,38}, mas são ainda desconhecidos os efeitos da dor em funções cruciais do hipocampo, como por exemplo na geração dos mapas espaciais. Como tal, o nosso objectivo neste estudo foi testar se uma condição de dor neuropática a longo prazo pode causar perturbações na estabilidade dos *spatial fields* gerados na área CA1 do hipocampo, na ausência de alterações espaciais e motivacionais no ambiente familiar de teste ou na capacidade de *performance* do animal. A actividade neuronal foi registada em ratos durante a execução de uma tarefa simples de alternância, antes e depois da indução de um modelo de dor neuropática –SNI³⁹.

Materiais e métodos

Modelo animal

Neste estudo foram utilizados 12 ratos adultos da estirpe *Sprague-Dawley* com peso entre os 275 e 325 g. Os ratos foram mantidos num ciclo de 12 h diurno/nocturno, com as sessões de treino e registo a terem lugar todos os dias à mesma hora na fase diurna. Todos os procedimentos e experiências efectuadas seguiram as normativas impostas pelo comité para investigação e ética da *International Association for the Study of Pain* (IASP)⁴⁰, normativas para experimentação animal da Comunidade Europeia transcritas na directiva número 86/609/ECC de 24 Novembro de 1986, e foram aprovados pela Direcção Geral de Veterinária, Lisboa, Portugal.

Tarefa comportamental e treino

O ambiente de teste consistiu numa arena em forma de U, composta por três secções com 72 cm de comprimento e 15 cm de largura e paredes opacas com 30 cm de altura (Fig. 1). Os ratos foram treinados para executar alternâncias na arena, recebendo uma recompensa na extremidade do percurso sempre que realizaram uma alternância correcta. A recompensa é libertada por um dispensador automático (*Coulbourn Instruments*, Whitehall, PA, EUA). O controlo dos dispensadores foi automatizado utilizando o software

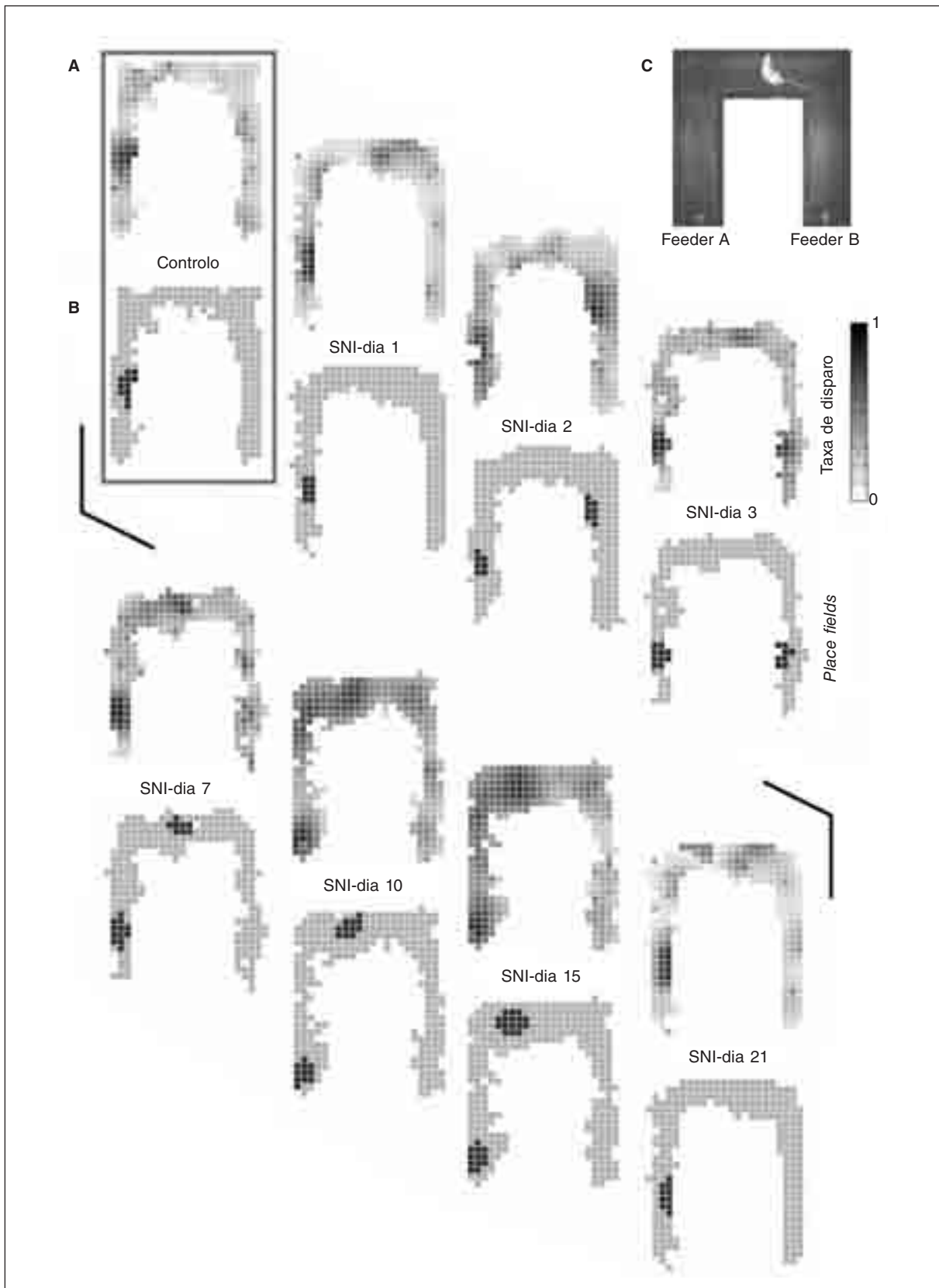


Figura 1. Ilustração da actividade de uma place cell durante a navegação pelo ambiente de test, antes (controlo) e depois da lesão periférica do nervo (SNI). **A:** mapas de actividade normalizados. Os píxeis mais escuros correspondem a regiões onde a célula dispara a uma frequência mais elevada, e os mais claros a uma frequência mais baixa. **B:** spatial fields codificados. **C:** fotografia do ambiente de teste em forma de U. Nesta tarefa comportamental, os ratos foram treinados para alternar de forma a obterem uma recompensa dispensada nas extremidades da arena. Cada dispensador liberta uma recompensa cada vez que o animal executa uma alternação correcta.

OpenControl adaptado para esta tarefa particular⁴¹. Durante o período de treino, cada rato recebeu por dia duas sessões de 15 min para aprender a tarefa. Foi estabelecido um critério de pelo menos 80 alterações correctas a obter num período de quatro dias consecutivos⁴². Após cada animal alcançar esse critério, foram sujeitos a uma cirurgia para implantação unilateral de uma matriz de eléctrodos para o registo da actividade neuronal (ver detalhes a seguir).

Após sete dias de recobro da cirurgia de implantação, os 12 ratos ($n = 6$ grupo controlo e $n = 6$ grupo SNI) foram registados durante quatro dias consecutivos (a seguir denominado por período controlo) enquanto executavam a tarefa comportamental de alternância (duas sessões diárias de 15 min cada). No dia subsequente os animais foram anestesiados e submetidos ao modelo de dor neuropática (SNI)³⁹ ou à intervenção de controlo que consistiu numa incisão na pele e dissecação de músculo com a mesma extensão do modelo SNI, embora deixando o nervo intacto. Ambas as intervenções foram realizadas na pata posterior contralateral à localização intracraniana dos eléctrodos de registo. Os dois grupos de animais foram registados durante um período de três semanas (com registos efectuados nos dias 1, 2, 3, 7, 10, 15 e 21 após a cirurgia SNI ou de controlo). O nível de sensibilidade à estimulação dolorosa foi avaliado com uma escala de filamentos von Frey (Somedic, Suécia) seguindo a metodologia descrita⁴³.

Implantação intracraniana dos eléctrodos

Para a implantação intracraniana das matrizes de eléctrodos, os animais foram anestesiados com mistura de cetamina e xilazina administrada por via intramuscular (10 e 60 mg/kg, respectivamente). O nível de anestesia foi mantido com administração de pequenas quantidades de cetamina (1/3 da dose de indução). Durante o procedimento foi fornecido oxigénio através de uma máscara facial. O nível de profundidade da anestesia e parálise muscular foi regularmente verificado testando os reflexos musculares e movimentos da córnea. Após a indução da anestesia, a cada animal foi administrada uma dose subcutânea de sulfato de atropina (0,02 mg/kg) e 1 ml de soro subcutâneo (sacarose a 2% p/v em NaCl a 0,9 p/v) a cada 60 min. A temperatura corporal foi monitorizada com um termómetro rectal e mantida a 37 °C através da utilização de um tapete homeotérmico. A cabeça do animal foi rapada e limpa utilizando uma aplicação tripla de álcool (70% v/v) e Betadine[®]. Foi administrado subcutaneamente a nível medial do couro cabeludo 0,3 ml de lidocaína a 1% (*B Braun*, Melsungen, Alemanha) com o objectivo de induzir analgesia local. Os animais anestesiados foram fixados num aparelho estereotáxico utilizando barras interauriculares, e foi feita uma incisão rostro-caudal. O tecido conectivo foi

afastado de forma a expor a superfície do osso que foi limpo com peróxido de hidrogénio. Após esse passo, foram abertos orifícios para a colocação de quatro parafusos para a posterior sustentação da matriz de eléctrodos. Para inserção da matriz de eléctrodos foi feita uma craniotomia expondo uma área de 3 x 3 mm.

Cada matriz de eléctrodos transporta oito filamentos de tungsténio revestidos com isonel (35 μm diâmetro) (*California Fine Wire Company*, Grover Beach, CA, EUA), com uma impedância entre 0,5 e 0,7 $\text{M}\Omega$ a 1 kHz. As matrizes foram construídas numa arquitectura de 4 x 2, com um espaçamento entre linhas de 250 μm e entre colunas de 400 μm ⁴⁴. As matrizes de eléctrodos foram orientadas rostro-caudalmente e montadas num microposicionador hidráulico (*FHC Inc.*, Bowdoin, ME, EUA) e após remoção da dura-máter conduzidas lentamente (50 $\mu\text{m}/\text{min}$) até à área CA1 do hipocampo, monitorizando simultaneamente a actividade neuronal. Foram utilizadas as seguintes coordenadas em milímetros relativas ao bregma⁴⁵ para centrar as matrizes de eléctrodos: -3,2 rostro-caudal, +2,2 médio-lateral e -2,6 dorso-ventral. Depois de os eléctrodos atingirem a sua posição final, a craniotomia foi selada com uma camada de agar (4% em solução salina) e a matriz fixa ao crânio utilizando cimento dental acrílico. No final da cirurgia o animal foi transferido para uma caixa de recobro e foi administrada uma dose do analgésico carprofeno (7,5 mg/kg) (*Rimadyl*[®], *Pfizer Animal Health*, Lisboa, Portugal) e do antibiótico amoxicilina (6,0 mg/kg) (*Clamoxyl*[®], *Pfizer Animal Health*, Lisboa, Portugal) subcutaneamente a cada 24 horas durante os três primeiros dias após a cirurgia. Os ratos foram deixados em recobro durante um período de uma semana até voltarem a iniciar as sessões de treino na tarefa comportamental.

Registo da actividade neuronal

A actividade neuronal registada a partir dos eléctrodos implantados foi processada utilizando um sistema *Multineuron Acquisition Processor* (16-MAP, *Plexon Inc.*, Dallas, TX, EUA). A identificação das curvas dos potenciais de acção dos neurónios foi efectuada utilizando janelas de selecção com delimitação de voltagem e tempo. Os sinais neuronais diferenciados foram pré-amplificados (10.000-25.000x) e digitalizados a 40 kHz. Cada canal de registo permitiu a identificação de um ou dois potenciais de acção diferentes em tempo-real (*SortClient 2008*, *Plexon Inc.*, Dallas, TX, EUA), validados posteriormente por análise em *offline* (*Offline Sorter*, *Plexon Inc.*, Dallas, TX, EUA) de acordo com os seguintes critérios acumulativos: oscilação em voltagem superior a dois desvios-padrão da amplitude média do sinal, razão sinal/ruído superior a 2,5x, menos de 1% dos disparos com intervalo interdisparo (ISI) inferior a 1,5 mseg, e estabilidade da curva do potencial de acção determinada

por um algoritmo de ajuste e por análise de componentes principais (PC). Foi utilizado ainda o software *WaveForm Tracker* (Plexon Inc., Dallas, TX, EUA) para verificar se neurónios registados se mantêm estáveis ao longo das várias sessões de registo. Este *software* assegura que o mesmo neurónio é registado ao longo das sessões através da análise da projecção da sua curva do potencial de acção num plano 3D obtido por análise de PC. A localização espacial do animal na arena de comportamento foi monitorizada utilizando um sistema de vídeo (*CinePlex*, Plexon Inc., Dallas, TX, EUA). Este sistema permitiu a sincronização do comportamento em vídeo com os sinais neuronais adquiridos.

Análise dos dados

Os sinais neuronais foram pré-processados utilizando o software *NeuroExplorer 4* (NEX, Plexon Inc., Dallas, TX, EUA) e exportados para ambiente MatLab para a utilização de rotinas desenhadas para análises complementares (*MathWorks*, Natick, MA, EUA). As comparações estatísticas dos grupos experimentais foram efectuadas por análise de variância (*Repeated Measures* – análise de variância [ANOVA], dois factores) e sempre que apropriado foi aplicado um teste *post hoc* do tipo Bonferroni (*Prism 5.0*, *GraphPad*, San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi fixado em 5%. Os resultados são expressos como média e erro-padrão da média.

Classificação das células

Foram classificados como potenciais *place cells* todos os neurónios com um pico na curva de potencial de acção com duração superior a 450 μ seg e razão sinal/ruído superior a 3:1. Este tipo de células é caracterizado por possuir disparos complexos, sendo que a célula pode conter entre dois a cinco disparos com um ISI de aproximadamente 5 mseg. Os disparos complexos foram identificados pela função de autocorrelação do *software Neuroexplorer* (NEX, Plexon Inc., Dallas, TX, EUA), que calcula o intervalo entre todos os pares de disparos, permitindo distinguir os padrões de disparo das *place cells* dos das células θ (interneurónios putativos)⁴⁶. Os dados referentes às células θ não foram incluídos neste estudo. As *place cells* apresentam uma frequência média de disparo típica inferior a 5 Hz e dentro do *spatial field* inferior a 30 Hz. Devido ao facto da maior parte dos parâmetros analisados ser afectado por taxas de disparo muito baixas, todas as células que apresentaram uma taxa média inferior a 0,1 Hz não foram analisadas.

Propriedades de disparo

Os mapas de disparo de cada neurónio foram preparados dividindo o meio ambiente de teste numa matriz de 32 por 32 quadrículas,

correspondendo cada quadrícula a uma resolução de 20 por 20 píxeis no vídeo. A média da taxa de disparo de cada neurónio foi calculada para cada quadrícula dividindo o número de disparos registados pelo tempo passado em cada quadrícula. Foram classificados como *spatial fields* todos os conjuntos de quadrículas adjacentes (5-20 quadrículas) com taxa média de disparo superior a dois desvios-padrão em relação à taxa média global do neurónio em toda a arena⁴⁷. O tamanho de cada *spatial field* foi calculado somando o número de quadrículas adjacentes que partilham o critério anterior.

Em termos de propriedades básicas de disparo foram calculados os seguintes parâmetros:

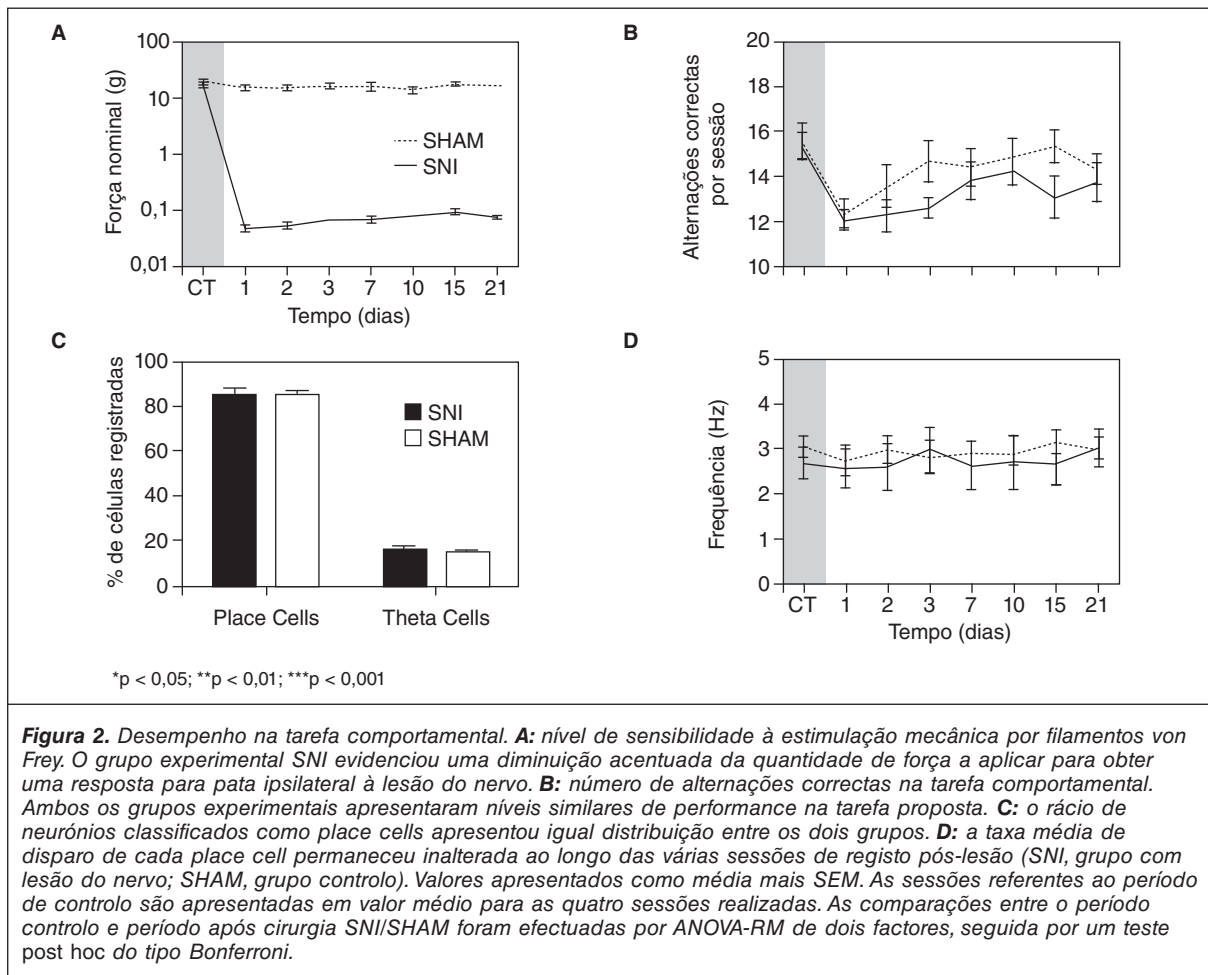
- Taxa média de disparo na arena de comportamento.
- Taxa média de disparo dentro do *spatial field*.
- Pico máximo de disparo dentro do *spatial field*.
- Índice de capacidade de discriminação espacial, razão entre a taxa média de disparo dentro e fora do *spatial field*.
- A coerência de disparo dentro do *spatial field*, que correspondente à autocorrelação entre a taxa de disparo de cada quadrícula do *spatial field* e a taxa média em todas as quadrículas da arena comportamental (*NeuroExplorer*, Plexon Inc., Dallas, TX, EUA).

A actividade espacial das células foi caracterizada utilizando o índice de informação espacial (I, especificidade)^{48,49}. A especificidade ou índice de informação espacial de cada *place cell* foi calculado em termos de quantidade de informação espacial (em *bits*) que cada disparo singular consegue aportar acerca da localização do animal, sendo determinado pela seguinte equação: $I = \sum P_i (R_i / R) \cdot \log_2(R_i / R)$, onde i corresponde ao número de quadrículas de resolução, P_i é a probabilidade de ocupação da quadrícula i , R_i é a taxa média de disparo na quadrícula i , e R é a taxa global média de disparo da célula. Um valor igual a 0 indica que a célula não codifica informação espacial, enquanto no caso de se tratar de uma *place cell* o seu valor poderá ser igual a um ou superior.

A posição média de cada *spatial field* na tarefa comportamental foi calculada pelo centro de massa (centróide) da distribuição da taxa de disparo dentro do *spatial field*⁵⁰. Para avaliar mecanismos de expansão dos *spatial fields*, foi calculado o tamanho médio (em quadrículas) de cada *spatial field*. Para avaliar oscilações de posição, foi calculada a distância euclidiana (em píxeis) dos centróides de cada *spatial field* entre as sessões de registo.

Histologia

No final das experiências, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina e os locais de registo marcados por injeção de corrente (10-20 μ A durante 10-20 seg) através



de um dos microelétrodos implantados. Após este passo, os cérebros foram removidos para posterior corte e coloração com o objectivo de se proceder à identificação ao microscópio dos locais de registo.

Resultados

Avaliação da sensibilidade mecânica após lesão do nervo

Todos os animais do grupo experimental SNI desenvolveram alodinia mecânica. Neste grupo, foi observada uma redução substancial da quantidade de força necessária a aplicar para obter uma resposta da pata posterior ipsilateral à lesão, o mesmo não acontecendo na pata contralateral (Bonferroni, $p < 0,001$). No grupo SHAM, não foram encontradas diferenças significativas entre as sessões de registo pré e pós-cirurgia (Fig. 2 A).

Actividade comportamental na tarefa

A actividade dos ratos ao longo das sessões de treino não evidenciou variações comportamentais, e também não foram observados sinais de saciedade no decorrer nos 15 min de cada sessão de registo. A ANOVA revelou não existirem diferenças no número de alterações correctas

entre os grupos experimentais (ANOVA-RM, $F_{(7,154)} = 1,33$, $p = 0,2421$) (Fig. 2 B). No entanto, foi observado um efeito ao longo das sessões de registo (ANOVA-RM, $F_{(7,154)} = 8,33$, $p < 0,0001$), provavelmente associado a uma diminuição do número de alterações correctas observado em ambos os grupos durante os três primeiros dias após a cirurgia lesão SHAM/SNI. Estes resultados comprovam que a indução do modelo de dor crónica não causa alterações significativas na performance dos grupos experimentais.

Actividade neuronal durante a execução da tarefa comportamental

Neste estudo foram utilizados um total de 117 neurónios registados na área CA1, repartidos por seis ratos com lesão (SNI, $n = 58$ células) e seis ratos-controlo (SHAM, $n = 59$ células). Algumas das células foram excluídas das análises seguintes por não exibirem os critérios que acima foram enunciados (18 células, presumivelmente células θ). Assim sendo, apenas 49/58 (84,48%) das células do grupo SNI e 50/59 (84,75%) das células do grupo SHAM foram consideradas como *place cells* (Fig. 2 C).

A taxa média de disparo foi calculada para cada *place cell* durante a execução da tarefa

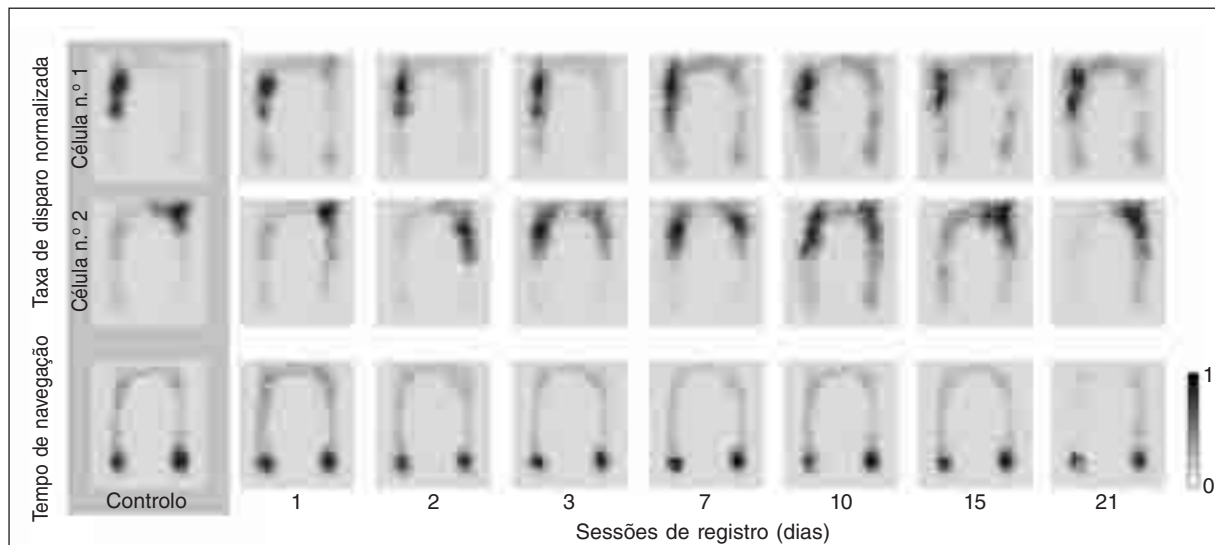


Figura 3. Efeito da condição de dor no remapeamento dos *spatial fields*. As ilustrações das duas primeiras linhas representam a taxa de disparo normalizada de duas células registadas simultaneamente no mesmo rato durante a execução da tarefa de alternância. No caso do primeiro neurónio, é possível observar um padrão constante de disparo espacial ao longo das sessões de registo, em constante o segundo neurónio apresenta instabilidade na codificação do *spatial field* nos dias subsequentes à lesão do nervo. Na última linha, as ilustrações apresentam o tempo médio passado em cada quadrícula durante o tempo total de cada sessão.

comportamental. Uma análise de dois factores ANOVA-RM foi utilizada para comparar as taxas de disparo das células do grupo SNI e SHAM durante as sessões pré e pós-cirurgia (Fig. 2D). Não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 0,99$, $p = 0,4466$) e ao longo das sessões de registo (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 1,03$, $p = 0,4225$).

Codificação de *spatial fields*

As células piramidais da área CA1 do grupo SNI apresentaram um aumento significativo do número de *spatial fields* codificados. Este aumento foi observado célula a célula e não é evidenciado por todas as células registadas em simultâneo de cada animal (Fig. 3). A análise ANOVA-RM revelou existirem diferenças entre os dois grupos experimentais ($F_{(7,70)} = 5,87$, $p < 0,0001$) e ao longo do tempo ($F_{(7,70)} = 3,27$, $p = 0,0460$). Pelo seu lado, a análise *post hoc* revelou que o número de *spatial fields* codificados no grupo SNI é superior ao grupo SHAM (Bonferroni, $p < 0,01$ para o dia 7 após cirurgia SNI, e $p < 0,001$ para o dia 10) (Fig. 4A).

Uma análise de dois factores ANOVA-RM foi utilizada para comparar a actividade de disparo no *spatial field* das células do grupo SHAM e do grupo com lesão do nervo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos na taxa média de disparo dentro do *spatial field* ($F_{(7,70)} = 1,03$, $p = 0,4201$) e a nível do pico máximo de disparo dentro do *spatial field* ($F_{(7,70)} = 0,66$, $p = 0,7059$) (Figs. 4B e C). No entanto, ao longo das sessões de registo existe um efeito significativo (taxa média de disparo: $F_{(7,70)} = 6,99$, $p < 0,0001$; e pico de disparo: $F_{(7,70)} = 4,26$, $p = 0,0006$).

Os registos efectuados revelaram ainda que a coerência interna dos *spatial fields* codificados pelas *place cells* foi afectada após a lesão periférica do nervo, aumentando significativamente a partir do dia 7 após lesão (Fig. 4D). A ANOVA revelou existirem diferenças entre os grupos experimentais (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 5,45$, $p < 0,0001$) e ao longo das sessões de registo (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 4,74$, $p = 0,0002$). A análise de *post hoc* demonstrou que os valores de coerência dentro dos *spatial fields* após lesão do nervo é superior à observada no grupo controlo (dias 7 e 10, Bonferroni, $p < 0,05$).

Em termos de tamanho dos *spatial fields* após lesão do nervo, foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 3,57$, $p = 0,0025$) e ao longo das sessões de registo (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 2,63$, $p = 0,0179$) (Fig. 4E). A análise *post hoc* revelou que no grupo SNI o tamanho médio dos *spatial fields* aumentou para todas as sessões de registo após lesão do nervo. No entanto, não foram encontradas diferenças em termos de deslocamento do centróide dos *spatial fields* (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 1,38$, $p = 0,2275$), apesar de ambos os grupos apresentarem diferenças ao longo das sessões de registo (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 13,10$, $p < 0,0001$) (Fig. 4F).

Informação espacial

A quantidade de informação espacial (*bits/disparo*) das células registadas no grupo SNI revelou ser significativamente inferior ao observado no grupo controlo (SHAM) (Fig. 4G). A análise ANOVA-RM revelou existirem diferenças

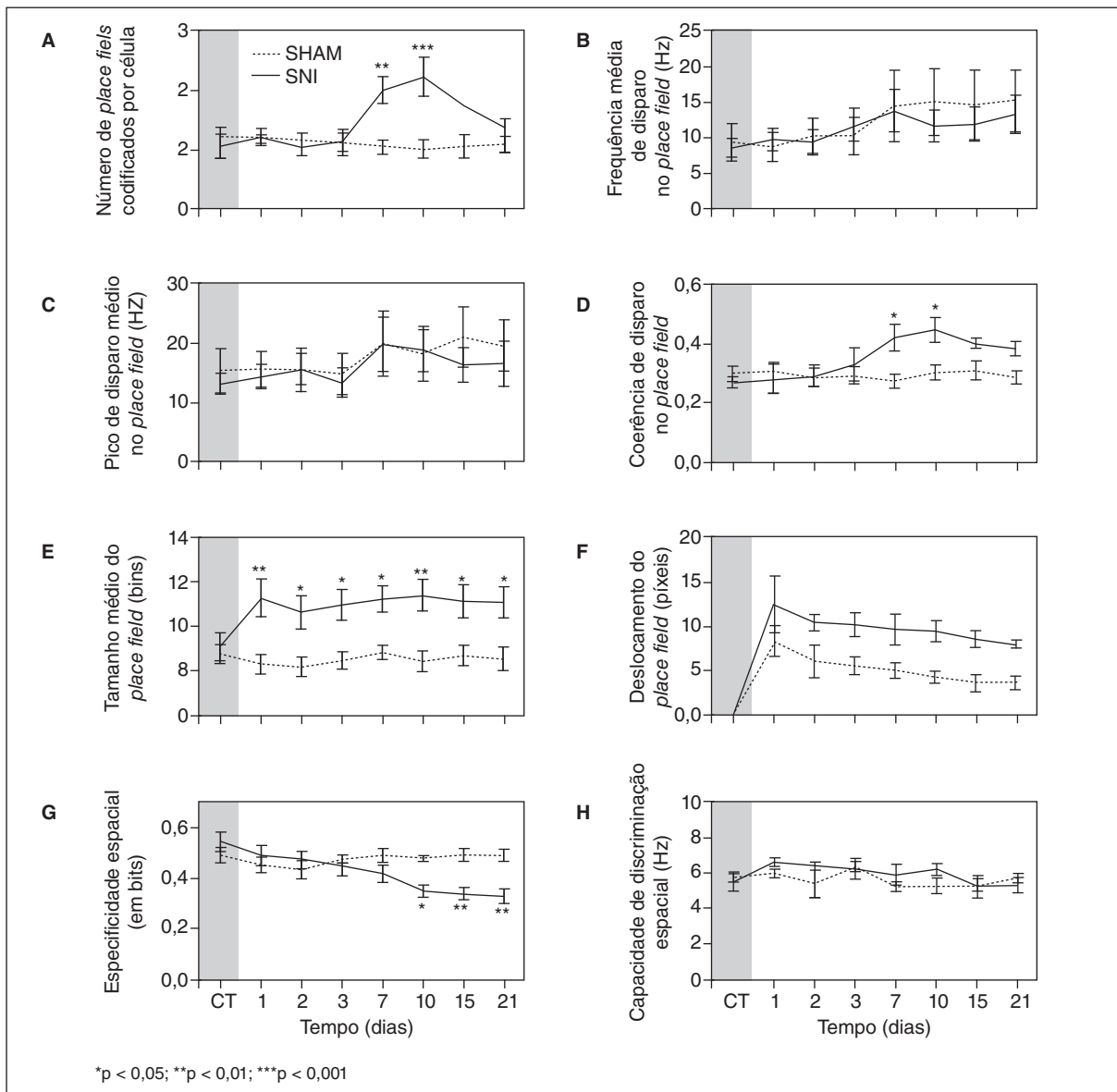


Figura 4. Propriedades dos spatial fields ao longo das sessões de registo. **A:** número de spatial fields codificados por célula. **B:** coerência de disparo no spatial field. **C:** taxa média de disparo e **(D)** pico máximo de disparo no spatial field; **E:** tamanho médio (em quadrículas) de cada spatial field; **F:** localização do centróide; **G:** índice de informação espacial (em bits); **H:** capacidade de discriminação espacial (SNI, grupo com lesão do nervo; SHAM, grupo controlo). Valores apresentados como média mais SEM. As sessões referentes ao período de controlo são apresentadas em valor médio para as quatro sessões realizadas. As comparações entre o período controlo e período após cirurgia SNI/SHAM foram efectuadas por ANOVA-RM de dois factores, seguida por um teste post hoc do tipo Bonferroni.

entre grupos ($F_{(7,70)} = 16,06$, $p < 0,0001$) e ao longo das sessões de registo ($F_{(7,70)} = 10,44$, $p < 0,0001$). A análise *post hoc* revelou uma diminuição significativa da informação espacial codificada pelas células do grupo SNI 10 dias após a lesão do nervo (Bonferroni, $p < 0,05$).

Capacidade de discriminação espacial

A capacidade de discriminação espacial ou razão entre a taxa média de disparo dentro e fora do *spatial field* é apresentada na figura 4 H. Os dados experimentais indicam não existir diferenças

entre os grupos experimentais (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 1,13$, $p = 0,3565$), tal como ao longo das sessões de registo (ANOVA-RM, $F_{(7,70)} = 1,79$, $p = 0,1037$).

Discussão

O objectivo principal deste estudo foi analisar se as propriedades de codificação da informação espacial das células piramidais da área CA1 hipocampal são afectadas pela introdução de uma condição de dor crónica de cariz neuropático. Este tipo de células tem um papel crucial

de integração e actualização da informação espacial. No entanto, este tipo de informação é apenas uma das várias características armazenadas e processadas pela rede hipocampal^{51,52}, sendo de primordial interesse por esta razão determinar quais os factores, incluindo a dor, que poderão contribuir para a perturbação das estabilidade das *place cells*.

Em termos de *performance* na tarefa experimental, os animais apresentaram apenas uma redução residual nos primeiros dias a seguir à cirurgia de lesão, sendo que este efeito foi partilhado pelo grupo de controlo e pelo grupo de dor. Estes resultados estão de acordo com dados publicados em estudos prévios, nos quais é demonstrado que não existem alterações na *performance* causadas pela dor em tarefas espaciais simples ou em tarefas não espaciais de memória⁵³⁻⁵⁵, todavia em tarefas mais complexas de memória foram observados défices causados por dor^{56,57}. Por outro lado, o efeito temporário na *performance* (Fig. 2 B) não está temporalmente correlacionado com o pico de instabilidade das *place cells* (Fig. 4 A), sugerindo que a instabilidade observada nos *spatial fields* não é causada por défice motor ou diminuição do nível de motivação dos animais.

Todavia, é importante referir que a tarefa utilizada neste estudo não é específica ou está dependente do funcionamento hipocampal. Outros estudos também utilizaram tarefas não dependentes do hipocampo, como por exemplo tarefas de escolha forçada para examinar as características dos *spatial fields*, demonstrando que as *place cells* podem desenvolver mecanismos de remapeamento espacial mesmo em tarefas não dependentes do hipocampo^{4,46,58}.

Actividade das *place cells* da área CA1 após indução de dor crónica

As propriedades básicas de disparo das *place cells* da área CA1 permaneceram estáveis após lesão periférica do nervo. Estas propriedades incluem a taxa média de disparo e o índice de capacidade de discriminação espacial que permaneceu inalterada entre ambos os grupos. Tal facto implica que ambos os grupos evidenciaram uma actividade de disparo proporcional. Por outro lado, a análise do índice de especificidade⁴⁹, uma medida de avaliação da actividade espacial de disparo que não requer que uma região específica seja definida como *spatial field*, revelou uma diminuição significativa no grupo de animais com lesão, indicando que a actividade dos neurónios deste grupo de animais aporta menor informação acerca da localização espacial.

A dor crónica afecta a estabilidade dos *spatial fields*

As características espaciais, como o número de *spatial fields* codificados e coerência de disparo

dentro do *spatial field* sofreram alterações após lesão do nervo, tendo sido observado um pico nessas alterações a partir do dia 7 após lesão (codificação em média de dois *spatial fields* por célula). Curiosamente, 21 dias após a lesão do nervo a maioria das células voltaram a codificar em média apenas um *spatial field*, tal como foi observado durante o período controlo. Uma possível hipótese que pode explicar este efeito transitório é uma redução do nível de dor nos animais com lesão, no entanto não existem diferenças estatísticas entre os dias 15 e 21 após lesão na avaliação com o teste de von Frey. Por outro lado, o segundo *spatial field* codificado ocupa uma localização não adjacente ao primeiro, o que sugere que o remapeamento induzido pela dor e a expansão do campo são fenómenos diferentes. Alguns estudos publicados demonstraram que os *spatial fields* podem sofrer modificações entre cada sessão de registo e que esse facto pode estar associado a uma contínua actualização da informação espacial^{50,59}. Esta hipótese não se aplicada aos resultados apresentados neste estudo, devido ao facto das sessões de registo do período de controlo apenas serem iniciadas após várias sessões prévias de treino na tarefa. Por outro lado, a avaliação estatística das sessões de controlo demonstrou não existirem diferenças entre as várias sessões e entre os grupos experimentais.

Além dos estudos envolvendo lesões do hipocampo ou de áreas interconectadas ao hipocampo^{15,17}, não existem estudos a nível da avaliação da estabilidade de campos espaciais na ausência de alterações no meio ambiente de teste. Em modelos de *stress*, a estabilidade da actividade das *place cells* a nível do *spatial field* é alterada, mas não a localização dos *spatial fields*⁶⁰. Por outro lado, ratos expostos a um ambiente familiar evidenciaram não existirem alterações na estabilidade dos *spatial fields* ao longo do ciclo menstrual⁴².

Vários estudos demonstraram que a instabilidade dos *spatial fields* é acompanhada por um aumento do número de *spatial fields*, o mesmo fenómeno foi observado no presente estudo. A expansão dos *spatial fields* é reduzida em ratos de idade avançada^{61,62} e pode ser bloqueada selectivamente a nível dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA)⁶³. Todavia, ainda são escassos os dados a nível da interacção entre o hipocampo e a dor crónica. Alguns estudos provaram existir alterações nos mecanismos de LTP hipocampal^{35,36}. A administração de antagonistas do receptor NMDA (NMDAr) no hipocampo interfere com os mecanismos de LTP e também medeia mecanismos de neuroplasticidade induzidos por dor no hipocampo³² ou na medula espinal⁶⁴⁻⁶⁶. Por outro lado, quando aplicados a nível do sistema nervoso central (SNC), atenuam comportamentos dolorosos em modelos de dor neuropática⁶⁷⁻⁶⁹ e de dor inflamatória^{65,66}. Para além

destes mecanismos, é conhecido também o papel crucial dos processos dependentes de NMDA na manutenção da estabilidade dos *spatial fields*^{11,70}.

Por último, alguns estudos sugeriram que o remapeamento hipocampal pode ser o reflexo de interferências entre experienciais concorrentes⁷¹. Esta ideia explica em parte o facto da dor poder perturbar as funções cognitivas^{72,73}, alterando os processos de atenção que são cruciais na aprendizagem e memória^{74,75}.

Em sumário, os dados presentes neste estudo sugerem que a lesão periférica do nervo (SNI) induz uma instabilidade relativa das propriedades espaciais das *place cells* da área CA1 do hipocampo. Os dados comprovam uma redução clara do índice de especificidade espacial das *place cells*, indicando que essas células providenciam menor informação espacial acerca da localização do animal após a lesão. Foram observadas ainda perturbações na codificação dos *spatial fields*, nomeadamente no seu número, tamanho e coerência de disparo no seu interior. Estas alterações foram provavelmente causadas por mecanismos adaptativos do hipocampo que ocorrem durante a instalação da condição de dor crónica, os quais poderão perturbar os processos mnemónicos associados à integração e consolidação da memória espacial de referência.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT): FCT/SFRH/42500/2007, FCT PTDC/SAU-NEU/100733/2008; e pela Fundação BIAL: Projecto BIAL 126/08.

Bibliografia

1. Fox SE, Ranck JB Jr. Electrophysiological characteristics of hippocampal complex-spike cells and theta cells. *Exp Brain Res.* 1981;41:399-410.
2. O'Keefe J, Dostrovsky J. Hippocampus as A Spatial Map - Preliminary Evidence from Unit Activity in Freely-Moving Rat. *Brain Res.* 1971;34:5.
3. O'Keefe J, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon; 1978.
4. Muller RU, Kubie JL. The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J Neurosci.* 1987;7:1951-68.
5. Thompson LT, Best PJ. Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain Res.* 1990;509:299-308.
6. Kobayashi T, Nishijo H, Fukuda M, Bures J, Ono T. Task-dependent representations in rat hippocampal place neurons. *J Neurophysiol.* 1997;78:597-613.
7. Markus EJ, Qin YL, Leonard B, Skaggs WE, McNaughton BL, Barnes CA. Interactions between location and task affect the spatial and directional firing of hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1995;15:7079-94.
8. Moita MA, Rosis S, Zhou Y, LeDoux JE, Blair HT. Putting fear in its place: remapping of hippocampal place cells during fear conditioning. *J Neurosci.* 2004;24:7015-23.
9. Wood ER, Dudchenko PA, Robitsek RJ, Eichenbaum H. Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron.* 2000;27:623-33.
10. Dragoi G, Harris KD, Buzsaki G. Place representation within hippocampal networks is modified by long-term potentiation. *Neuron.* 2003;39:843-53.
11. Kentros C, Hargreaves E, Hawkins RD, Kandel ER, Shapiro M, Muller RV. Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade. *Science.* 1998;280:2121-6.
12. Rotenberg A, Abel T, Hawkins RD, Kandel ER, Muller RU. Parallel instabilities of long-term potentiation, place cells, and learning caused by decreased protein kinase A activity. *J Neurosci.* 2000;20:8096-102.
13. Leutgeb S, Mizumori SJY. Excitotoxic septal lesions result in spatial memory deficits and altered flexibility of hippocampal single-unit representations. *J Neurosci.* 1999;19:6661-72.
14. Liu X, Muller RU, Huang LT, et al. Seizure-induced changes in place cell physiology: relationship to spatial memory. *J Neurosci.* 2003;23:11505-15.
15. McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J, Sutherland RJ. Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res.* 1989;76:485-96.
16. Mizumori SJY, Miya DY, Ward KE. Reversible Inactivation of the Lateral Dorsal Thalamus Disrupts Hippocampal Place Representation and Impairs Spatial-Learning. *Brain Res.* 1994;644:168-74.
17. Muir G, Bilkey D. Instability in the place field location of hippocampal place cells after lesions centered on the perirhinal cortex. *J Neurosci.* 2001;21:4016-25.
18. Khanna S, Sinclair J. Responses in the CA1 region of the rat hippocampus to a noxious stimulus. *Exp Neurol.* 1992;117:28-35.
19. Khanna S, Chang LS, Jiang F, Koh HC. Nociception-driven decreased induction of Fos protein in ventral hippocampus field CA1 of the rat. *Brain Res.* 2004;1004:167-76.
20. Soleimannejad E, Semnani S, Fathollahi Y, Naghdi N. Microinjection of ritanserin into the dorsal hippocampal CA1 and dentate gyrus decrease nociceptive behavior in adult male rat. *Behavioural Brain Res.* 2006;168:221-5.
21. Delgado JMR. Cerebral Structures Involved in Transmission and Elaboration of Noxious Stimulation. *J Neurophysiol.* 1955;18:261-75.
22. Halgren E, Walter RD, Cherlow DG, Crandall PH. Mental Phenomena Evoked by Electrical-Stimulation of Human Hippocampal Formation and Amygdala. *Brain.* 1978;101:83-117.
23. Khanna S. Dorsal hippocampus field CA1 pyramidal cell responses to a persistent versus an acute nociceptive stimulus and their septal modulation. *Neuroscience.* 1997;77:713-21.
24. Tai SK, Huang FD, Mochhala S, Khanna S. Hippocampal theta state in relation to formalin nociception. *Pain.* 2006;121:29-42.
25. Wei F, Xu ZC, Qu Z, Milbrandt J, Zhuo M. Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J Cell Biology.* 2000;149:1325-33.
26. Zheng F, Khanna S. Intra-hippocampal tonic inhibition influences formalin pain-induced pyramidal cell suppression, but not excitation in dorsal field CA1 of rat. *Brain Res Bull.* 2008;77:374-81.
27. Bingel U, Quante M, Knab R, Bromm B, Weiller C, Buchel C. Subcortical structures involved in pain processing: evidence from single-trial fMRI. *Pain.* 2002;99:313-21.
28. Ploghaus A, Narain C, Beckmann CF, et al. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci.* 2001;21:9896-903.
29. Ploghaus A, Tracey I, Clare S, Gati JS, Rawlins JNP, Matthews PM. Learning about pain: The neural substrate of the prediction error for aversive events. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:9281-6.
30. Goll A, Faibish GM. Effects of human hippocampal ablation. *J Neurosurgery.* 1967;26:390-8.
31. McKenna JE, Melzack R. Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus. *Pain.* 1992;49:105-12.
32. McKenna JE, Melzack R. Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test. *Exp Neurol.* 2001;172:92-9.
33. Carter JL, Lubahn C, Lorton D, et al. Adjuvant-induced arthritis induces c-Fos chronically in neurons in the hippocampus. *J Neuroimmunol.* 2011;230:85-94.
34. Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Massafra C, Aloisi AM. The behavioral and neuronal effects induced by repetitive nociceptive stimulation are affected by gonadal hormones in male rats. *Pain.* 2003;104:35-47.
35. Kodama D, Ono H, Tanabe M. Altered hippocampal long-term potentiation after peripheral nerve injury in mice. *Eur J Pharmacol.* 2007;574:127-32.
36. Zhao XY, Liu MG, Yuan DL, et al. Nociception-induced spatial and temporal plasticity of synaptic connection and function in the hippocampal formation of rats: a multi-electrode array recording. *Mol Pain.* 2009;5:55.
37. Lutz J, Jager L, de Quervain D, et al. White and gray matter abnormalities in the brain of patients with fibromyalgia: a diffusion-tensor and volumetric imaging study. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3960-9.
38. Younger JW, Shen YF, Goddard G, Mackey SC. Chronic myofascial temporomandibular pain is associated with neural abnormalities in the trigeminal and limbic systems. *Pain.* 2010;149:222-8.
39. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2000;87:149-58.

40. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16:109-10.
41. Aguiar P, Mendonça L, Galhardo V. OpenControl: a free open source software for video tracking and automated control of behavioral mazes. *J Neurosci Methods*. 2007;166:66-72.
42. Tropp J, Figueiredo CM, Markus EJ. Stability of hippocampal place cell activity across the rat estrous cycle. *Hippocampus*. 2005;15:154-65.
43. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994;53:55-63.
44. Silva A, Cardoso-Cruz H, Silva F, Galhardo V, Antunes L. Comparison of anesthetic depth indexes based on thalamocortical local field potentials in rats. *Anesthesiology*. 2010;112:355-63.
45. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press; 1998.
46. Markus EJ, Barnes CA, McNaughton BL, Gladden VL, Skaggs WE. Spatial information content and reliability of hippocampal CA1 neurons: effects of visual input. *Hippocampus*. 1994;4:410-21.
47. Muller RU, Kubie JL. The firing of hippocampal place cells predicts the future position of freely moving rats. *J Neurosci*. 1989;9:4101-10.
48. Skaggs WE, McNaughton BL. Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience. *Science*. 1996;271:1870-3.
49. Skaggs WE, McNaughton BL, Gothard KM, Markus EJ. An information-theoretic approach to deciphering the hippocampal code. In: Hanson SJ, Cowan JD, Giles CL, eds. *Advances in neural information processing*. San Mateo: Morgan Kaufmann; 1993. p. 1030-7.
50. Mehta MR, Barnes CA, McNaughton BL. Experience-dependent, asymmetric expansion of hippocampal place fields. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:8918-21.
51. Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron*. 1999;23:209-26.
52. Leutgeb S, Leutgeb JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL, Moser MB. Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science*. 2005;309:619-23.
53. Apkarian AV, Sosa Y, Krauss BR, et al. Chronic pain patients are impaired on an emotional decision-making task. *Pain*. 2004;108:129-36.
54. LaBuda CJ, Fuchs PN. A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp Neurol*. 2000;163:490-4.
55. Leite-Almeida H, Almeida-Torres L, Mesquita AR, et al. The impact of age on emotional and cognitive behaviours triggered by experimental neuropathy in rats. *Pain*. 2009;144:57-65.
56. Dick BD, Rashid S. Disruption of attention and working memory traces in individuals with chronic pain. *Anesth Analg*. 2007;104:1223-9.
57. Millecamps M, Etienne M, Jourdan D, Eschalier A, Ardid D. Decrease in non-selective, non-sustained attention induced by a chronic visceral inflammatory state as a new pain evaluation in rats. *Pain*. 2004;109:214-24.
58. Ranck JB Jr. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol*. 1973;41:461-531.
59. Mehta MR, Quirk MC, Wilson MA. Experience-dependent asymmetric shape of hippocampal receptive fields. *Neuron*. 2000;25:707-15.
60. Kim J, Lee H, Welday A, et al. Stress-induced alterations in hippocampal plasticity, place cells, and spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:18297-302.
61. Barnes CA, Suster MS, Shen JM, McNaughton BL. Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature*. 1997;388:272-5.
62. Shen J, Barnes CA, McNaughton BL, Skaggs WE, Weaver KL. The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. *J Neurosci*. 1997;17:6769-82.
63. Ekstrom AD, Meltzer J, McNaughton BL, Barnes CA. NMDA receptor antagonism blocks experience-dependent expansion of hippocampal "place fields". *Neuron*. 2001;31:631-8.
64. Dickenson A, Sullivan AF. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of rat deep dorsal horn nociceptive neurons in the rat. *Neuropharmacology*. 1987;26:1235-8.
- 65.Coderre TJ, Van EI. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. *Pain*. 1994;59:345-52.
66. Coderre TJ, Van EI. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. II. Assessment of the antinociceptive activity of combinations of competitive and non-competitive NMDA antagonists with agents acting at allosteric-glycine and polyamine receptor sites. *Pain*. 1994;59:353-9.
67. Seltzer Z, Cohn S, Ginzburg R, Beilin BZ. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain*. 1991;45:69-75.
68. Yamamoto T, Yaksh TL. Effects of intrathecal capsaicin and an NK-1 antagonist, CP,96-345, on the thermal hyperalgesia observed following unilateral constriction of the sciatic nerve in the rat. *Pain*. 1992;51:329-34.
69. Yamamoto T, Yaksh TL. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. Excitatory amino acid antagonists. *Pain*. 1992;49:121-8.
70. Shapiro ML, Eichenbaum H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus*. 1999;9:365-84.
71. Colgin LL, Moser EI, Moser MB. Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends Neurosci*. 2008;31:469-77.
72. Moriarty O, McGuire BE, Finn DP. The effect of pain on cognitive function: A review of clinical and preclinical research. *Prog Neurobiol*. 2011;93(3):385-404.
73. Seminowicz DA, Davis KD. Interactions of pain intensity and cognitive load: the brain stays on task. *Cerebral Cortex*. 2007;17:1412-22.
74. Boyette-Davis JA, Thompson CD, Fuchs PN. Alterations in attentional mechanisms in response to acute inflammatory pain and morphine administration. *Neuroscience*. 2008;151:558-63.
75. Pais-Vieira M, Lima D, Galhardo V. Sustained attention deficits in rats with chronic inflammatory pain. *Neurosci Letters*. 2009;463:98-102.

Os Efeitos da Neuropatia Diabética em Componentes Centrais do Sistema de Modulação da Dor

Carla Morgado e Isaura Tavares

Resumo

A diabetes é uma doença metabólica cuja prevalência tem aumentado de forma alarmante. A diabetes associa-se a complicações tardias que interferem de forma marcada na qualidade de vida dos doentes diabéticos. Uma dessas complicações é a neuropatia diabética dolorosa (NDD). A NDD deve-se a alterações morfofuncionais do sistema nervoso e manifesta-se através de dor espontânea, alodinia e hiperalgesia. O estudo dos mecanismos responsáveis pela NDD tem-se direcionado maioritariamente para as suas causas periféricas. Contudo, o efeito analgésico de fármacos com atuação central (ex: antidepressivos e anticonvulsivantes) e as alterações encefálicas observadas em indivíduos diabéticos sugerem um envolvimento de componentes centrais do sistema endógeno de controlo da dor na etiologia da NDD. De facto, estudos recentes demonstraram que a NDD é acompanhada por alterações neuronais em áreas centrais envolvidas na modulação da transmissão nociceptiva, nomeadamente na medula espinhal e em diversas áreas encefálicas, como o bolbo rostroventromedial (RVM), grupos de neurónios noradrenérgicos da ponte, substância cinzenta periaqueductal (PAG) e tálamo. A diabetes induz hiperatividade e hiperexcitabilidade dos neurónios nociceptivos da medula espinhal, para as quais parece contribuir o aumento dos mecanismos excitatórios e a perda de inibição local, em particular a perda de inibição mediada pelo ácido γ -aminobutírico (GABA). A alteração da ação pós-sináptica do GABA de inibitória para excitatória é mediada por redução na expressão de KCC2, a qual é provavelmente induzida por ativação da microglia e por stress oxidativo, que ocorrem na medula espinhal durante a NDD. Estes mecanismos deverão contribuir para aumentar quer a atividade basal dos neurónios da medula espinhal, quer as suas respostas a estímulos inócuos e tóxicos. Esta hiperatividade deverá aumentar a transmissão de informação nociceptiva para áreas supraespinhais, incrementando a atividade de neurónios da PAG e recrutando as vias descendentes envolvidas na modulação da dor, por ativação dos neurónios serotoninérgicos do RVM e noradrenérgicos do grupo A₅ da ponte. Coletivamente, os achados apresentados nesta revisão abrem novas linhas de investigação no tratamento da NDD e apontam para a necessidade de desenvolver fármacos que previnam as alterações neurobiológicas encontradas no sistema nervoso central.

Palavras-chave: Diabetes. Neurónios nociceptivos. Medula espinhal. Substância cinzenta periaqueductal. Bolbo rostroventromedial. Grupos de neurónios noradrenérgicos da ponte.

Abstract

Diabetes is a metabolic disease with an alarmingly increasing prevalence. The disease is associated with late-onset complications, which affect dramatically the quality of life of diabetic patients. Painful diabetic neuropathy (PDN) is one of these complications, which is caused by structural and functional changes of the somatosensory system and characterized by spontaneous pain, allodynia, and hyperalgesia. Most of the studies have focused on the peripheral causes of PDN, but the analgesic effects of central-acting drugs (like antidepressants and anticonvulsants) and the changes occurring at brain areas of diabetic patients suggest the involvement of central components of the pain control system in the etiology of PDN. In fact, recent studies showed that PDN is associated with neuronal changes at central areas involved in pain control, such as the spinal dorsal horn, rostroventromedial medulla (RVM), A5 pontine noradrenergic neuronal group, periaqueductal

gray (PAG) and thalamus. Diabetes induces hyperactivity and hyperexcitability of spinal nociceptive neurons, which are probably due to local potentiation of facilitatory mechanisms and decreased inhibition, namely mediated by γ -aminobutyric acid (GABA). The shift in the post-synaptic role of GABA from inhibitory to excitatory mediated by the reduction in the expression of KCC2, which is induced by spinal microglial activation and oxidative stress, was shown to contribute to the spinal hyperactivity. The hyperactivity of the spinal nociceptive neurons detected during PDN is likely to increase the neuronal activation at the PAG and to recruit descending pain pathways by activating serotonergic RVM neurons and noradrenergic A5 neurons. Altogether, these findings open new lines of research in the treatment of PDN and show that it is necessary to develop drugs that prevent the neurobiological changes detected in the central nervous system. (Dor. 2012;20(2):35-40)

Corresponding author: Carla Morgado, cmorgado@med.up.pt

Key words: Diabetes. Nociceptive neurons, Spinal cord. Periaqueductal gray. Rostroventromedial medulla. Pontine noradrenergic neurons.

Introdução

A diabetes é uma doença crónica de elevada e crescente prevalência que, segundo a Federação Internacional da Diabetes, afeta 366 milhões de pessoas em todo o mundo. Esta doença é já considerada pela Organização Mundial da Saúde uma pandemia do século XXI.

A diabetes associa-se, frequentemente, a diversas complicações tardias, dado afetar vários sistemas orgânicos¹, incluindo o sistema nervoso. Estudos experimentais e clínicos demonstram a ocorrência de alterações morfofuncionais no sistema nervoso periférico somatossensitivo, assim como em áreas do sistema nervoso central envolvidas na cognição/memória (ex.: hipocampo e córtex). Das áreas envolvidas na transmissão e modulação da informação nociceptiva, estudos recentes revelaram efeitos da neuropatia diabética na medula espinhal e em áreas encefálicas, como o bolbo rostroventromedial (RVM), grupos de neurónios noradrenérgicos da ponte, substância cinzenta periaqueductal (PAG) e tálamo²⁻⁹. As alterações verificadas em componentes centrais do sistema somatossensitivo durante a neuropatia diabética têm sido alvo de estudo nos últimos anos. Estudos recentes sugerem que tais alterações podem contribuir para a condição de dor neuropática crónica associada à diabetes, condição denominada por neuropatia diabética dolorosa (NDD). A NDD afeta cerca de 1/5 da população diabética e associa-se a elevada morbidade e baixa qualidade de vida¹⁰. Esta revisão aborda os efeitos da diabetes nas áreas do sistema nervoso central envolvidas na modulação da transmissão nociceptiva e discute as suas implicações para a génese da NDD.

A dor é um mecanismo de proteção natural do organismo quando em resposta a estímulos dolorosos agudos. Um estímulo periférico nóxico induz a ativação dos neurónios localizados no corno posterior da medula espinhal, os quais enviam informação para áreas supraespinhais, como a PAG e o tálamo, sendo posteriormente encaminhada para o córtex somatossensitivo, córtex

pré-frontal e córtex cingulado¹¹. Após receção dessa informação é desencadeado um conjunto de ações que visam promover uma resposta adequada ao estímulo e que incluem mecanismos inibitórios e facilitatórios de modulação da dor¹². A medula espinhal é suprida localmente de sistemas que lhe permitem modular a transmissão nociceptiva e que englobam mecanismos excitatórios (facilitadores da transmissão nociceptiva) e inibitórios (redutores da transmissão nociceptiva)^{11,13}. É o equilíbrio destes mecanismos, em conjunto com influências supraespinhais, que permite o controlo da transmissão da informação nociceptiva. No que respeita aos mecanismos supraespinhais de modulação da dor, sabe-se que a PAG exerce um papel chave, recebendo informação nervosa de estruturas corticais e subcorticais e encaminhando-a para núcleos localizados no tronco cerebral, como o RVM^{12,14,15} e os grupos de neurónios noradrenérgicos da ponte (A5, A6 e A7)^{16,17} (Fig. 1). O RVM envia projeções para o corno posterior da medula espinhal, libertando localmente serotonina. A ação deste neurotransmissor na modulação da dor na medula espinhal é complexa, visto terem sido documentados efeitos inibitórios e facilitatórios, que parecem depender do tipo de recetor ao qual a serotonina se liga¹². Os neurónios noradrenérgicos da ponte enviam projeções para a medula espinhal com consequente libertação local de noradrenalina¹⁸. A noradrenalina inibe a atividade dos aferentes primários e dos neurónios de projeção por ligação aos recetores adrenérgicos α_2 e ativa os interneurónios inibitórios GABAérgicos por ligação aos recetores adrenérgicos α_1 , tendo como efeito global uma inibição da neurotransmissão na medula espinhal¹⁸. Quando a sintomatologia dolorosa persiste por longos períodos, ocorre uma disfunção marcada a vários níveis do sistema somatossensitivo que se associa frequentemente a dor espontânea,

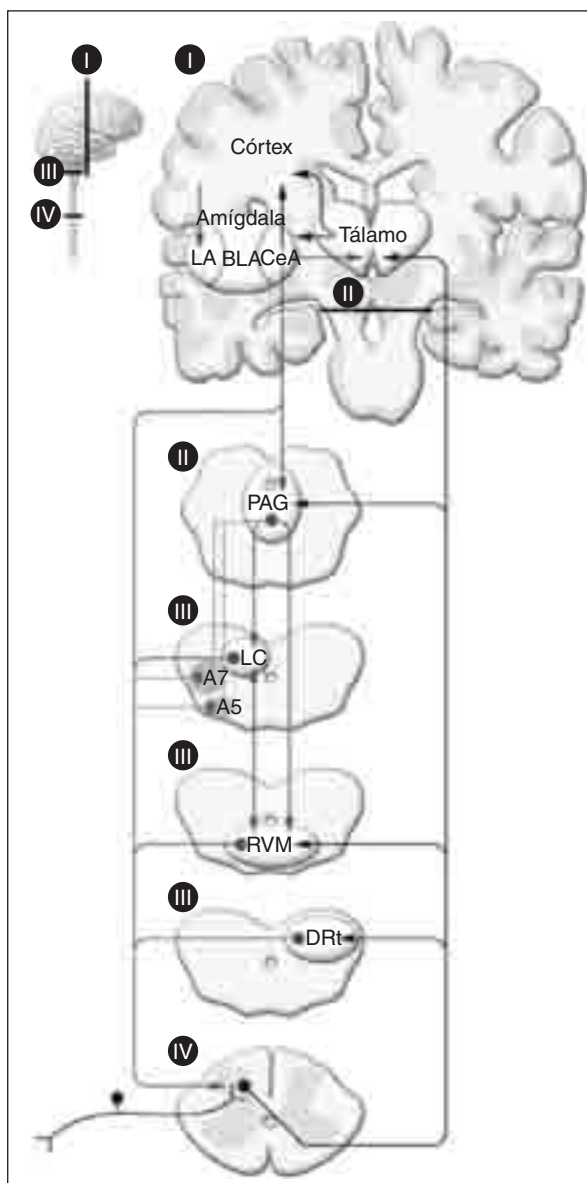


Figura 1. Representação esquemática das vias de transmissão da informação nociceptiva. A informação nociceptiva é trazida pelos aferentes primários até ao corno posterior da medula espinhal. A informação ascende pelo feixe espinho-talâmico até ao tálamo, sendo enviadas projeções colaterais para diversas áreas como a PAG, o RVM e o núcleo reticular dorsal. As regiões encefálicas superiores (tálamo, amígdala e córtex) ativam as vias de modulação descendente da dor. As vias descendentes projetam para a PAG, que usa o RVM e os grupos de neurónios noradrenérgicos da ponte (A5-A7) como estações de retransmissão, para modular a transmissão nociceptiva da medula espinhal. As áreas i-iv no diagrama pequeno correspondem aos níveis do neuroeixo apresentados no diagrama maior (adaptado de Ossipov, et al.³⁷).

BLA: amígdala basolateral; CeA: núcleo central da amígdala; DRt: núcleo reticular dorsal; LA: amígdala lateral; LC: locus coeruleus; PAG: substância cinzenta periaqueductal; RVM: bolbo rostroventromedial.

normalmente utilizados no tratamento de outras situações de dor crónica¹⁹. As opções terapêuticas atuais baseiam-se sobretudo na utilização de antidepressivos que atuam na inibição da recaptação da serotonina e noradrenalina (duloxetina e venlafaxina), anticonvulsivantes (gabapentina e pregabalina) e antidepressivos tricíclicos (amitriptilina e nortriptilina)²⁰. No entanto, estes fármacos apresentam muitos efeitos adversos e a eficácia do tratamento é, em geral, modesta, uma vez que um alívio de dor na ordem dos 50% é conseguido em apenas 30% dos casos¹⁹. A baixa eficácia dos fármacos frequentemente usados no tratamento da dor na NDD sugere a existência de alterações específicas induzidas pela diabetes no sistema somatossensitivo.

Alterações na medula espinhal

Os neurónios nociceptivos da medula espinhal apresentam maior excitabilidade e atividade durante a NDD. Estudos em modelos animais de diabetes demonstraram hiperatividade espontânea dos neurónios localizados no corno posterior da medula espinhal, assim como ativação exacerbada destes neurónios após estimulação inócua e nóxica⁶⁻⁹. O aumento da atividade dos neurónios nociceptivos da medula espinhal na NDD pode dever-se a um aumento da chegada de informação vinda da periferia, devido a hiperexcitabilidade e atividade ectópica dos aferentes primários^{21,22}, mas também a alterações nos mecanismos espinhais e supraespinhais de modulação da transmissão nociceptiva.

Alterações nos mecanismos espinhais de modulação da transmissão nociceptiva parecem contribuir para a hiperexcitabilidade dos neurónios nociceptivos da medula espinhal em situações de dor crónica²³. Os mecanismos excitatórios têm sido amplamente estudados na NDD, tendo sido detetada uma exacerbação da ação do glutamato e da substância P (SP), dois neurotransmissores excitatórios fundamentais no controlo da transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal^{24,25}. No que respeita aos neurotransmissores inibitórios, alguns dados mostram alterações nos mecanismos de controlo opioidérgico e GABAérgico que poderão contribuir para a NDD. Na medula espinhal de ratos diabéticos, detetou-se uma redução na libertação de opióides endógenos e na expressão dos receptores opióides do tipo μ ^{26,27}. No que respeita ao GABA, estudos recentes demonstram diminuição da ação inibitória deste neurotransmissor a nível espinhal²⁸. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório da medula espinhal, que reduz a atividade neuronal e a libertação de neurotransmissores excitatórios. Em condições normais, o GABA atua pós-sinápticamente em interneurónios e neurónios de projeção, por ligação aos receptores ionotrópicos GABA_A, induzindo polarização da membrana neuronal e consequente diminuição da atividade. A sua ligação

hiperalgesia e alodinia, instalando-se um quadro patológico de dor crónica. O tratamento da NDD é difícil dada a reduzida eficácia dos fármacos

pré-sináptica aos recetores metabotrópicos GABA_B inibe a libertação de neurotransmissores excitatórios, reduzindo, desta forma, a transmissão nociceptiva²⁹. A ação do GABA por ligação aos recetores GABA_A é dependente da concentração intracelular de Cl⁻, a qual é determinada, nos neurónios do sistema nervoso adulto, pela atividade do KCC2, um importante cotransportador de cloro e potássio. O KCC2 tem como função enviar o Cl⁻ para o meio extracelular, mantendo a concentração de Cl⁻ inferior no meio intracelular. A ligação do GABA ao recetor ionotrópico GABA_A induz entrada de Cl⁻, que se desloca do meio de maior concentração para o de menor concentração, e resulta em polarização da membrana neuronal. Desta forma, verifica-se um bloqueio do impulso nervoso mediado pela ação pós-sináptica do GABA. Em situações de dor neuropática, epilepsia e durante o desenvolvimento embrionário, condições caracterizadas por uma redução na expressão e funcionalidade do KCC2 e, conseqüentemente, um aumento da concentração intracelular de Cl⁻, o GABA exerce efeitos excitatórios ao ligar-se ao recetor GABA_A, uma vez que promove a saída de Cl⁻, induzindo despolarização da membrana e ativação neuronal³⁰. Com base nestes dados, as alterações no sistema GABA/KCC2 detetadas no rato com NDD^{28,31} podem estar na base da hiperatividade neuronal e sintomatologia dolorosa associada à diabetes. De facto, embora se tenha verificado que a expressão de GABA se encontra significativamente aumentada na medula espinal de animais diabéticos³¹, a diminuição de expressão de KCC2 nestes animais^{28,31} parece comprometer a ação inibitória pós-sináptica deste neurotransmissor, tendo sido demonstrado que o GABA exerce efeitos excitatórios²⁶. A corroborar esta hipótese, há estudos que demonstram que a normalização da expressão de KCC2 na medula espinal de ratos diabéticos reverte a hiperatividade dos neurónios nociceptivos da medula espinal e reduz a dor^{34,35}. A redução na expressão de KCC2 e o consequente efeito na neurotransmissão espinal GABAérgica poderá dever-se ao aumento de ativação microglial e ao *stress* oxidativo detetados na medula espinal de ratos diabéticos (Fig. 2). De facto, a inibição da microglia com minociclina e o tratamento antioxidante com ácido α -lipóico melhora a expressão de KCC2, reverte a hiperatividade espinal e apresenta efeitos antinociceptivos^{32,33}. Tal como o GABA, a ação pós-sináptica da glicina, outro neurotransmissor inibitório da medula espinal, depende das concentrações de Cl⁻ e, conseqüentemente, da expressão de KCC2³⁴. Assim, é provável que a diminuição da expressão de KCC2 durante a NDD reduza o efeito inibitório da glicina, contribuindo ainda mais para a facilitação da transmissão nociceptiva espinal. O papel pré-sináptico do GABA parece também estar diminuído durante a diabetes, uma vez que o efeito inibitório do agonista dos

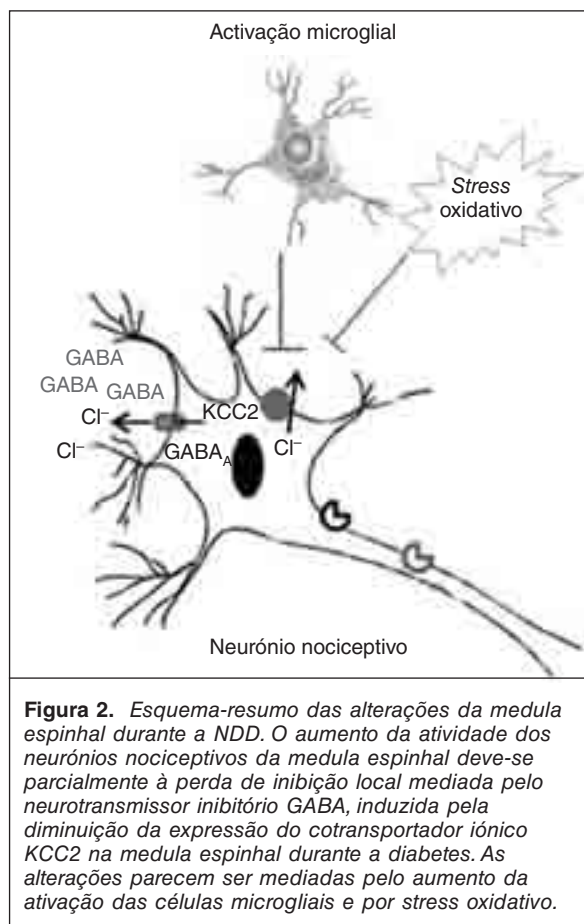


Figura 2. Esquema-resumo das alterações da medula espinal durante a NDD. O aumento da atividade dos neurónios nociceptivos da medula espinal deve-se parcialmente à perda de inibição local mediada pelo neurotransmissor inibitório GABA, induzida pela diminuição da expressão do cotransportador iónico KCC2 na medula espinal durante a diabetes. As alterações parecem ser mediadas pelo aumento da ativação das células microgliais e por stress oxidativo.

recetores GABA_B, baclofeno, se mostrou significativamente reduzido na medula espinal de animais diabéticos³⁵, o que parece dever-se à diminuição da expressão da subunidade B do referido recetor³⁶. Coletivamente, as alterações neuroquímicas identificadas na medula espinal durante a NDD deverão contribuir para aumentar a transmissão da informação nociceptiva para centros mais altos do neuroeixo.

Alterações supraespinhais

A informação nociceptiva é controlada a nível encefálico por circuitos neuronais complexos, que se encontram profundamente interconectados e ligados a áreas envolvidas na modulação de parâmetros cognitivos e afetivos, e que condicionam as respostas à dor¹¹. Considerando a sua relação anatómica e funcional, é provável que alterações na transmissão nociceptiva a nível espinal se reflitam na atividade do tálamo e PAG e, conseqüentemente, na atividade dos núcleos envolvidos na modulação descendente da dor que são alvo da ação da PAG, nomeadamente do RVM e dos grupos de neurónios noradrenérgicos da ponte (A5-A7) (Fig. 1). Por sua vez, a ativação das vias descendentes deverá modular a atividade dos neurónios nociceptivos da medula espinal.

De facto, a atividade neuronal do tálamo e PAG, áreas que recebem informação proveniente da medula espinhal, encontra-se significativamente aumentada em animais com NDD^{4,6,9}. É provável que o aumento da atividade neuronal no tálamo contribua também, de forma indireta, para o aumento da ativação neuronal na PAG, uma vez que o tálamo comunica com áreas corticais e subcorticais que ativam vias de modulação descendente da transmissão nociceptiva que projetam para a PAG³⁷. Dessa forma, verifica-se um aumento no recrutamento dos neurónios da PAG, concordante com a hiperatividade neuronal na PAG dos animais diabéticos^{6,9}, que utilizando o RVM e os grupos noradrenérgicos da ponte como estações de retransmissão, modulam a atividade espinhal. O aumento da atividade dos neurónios serotoninérgicos do RVM e noradrenérgicos do A5, bem como os níveis aumentados de serotonina e noradrenalina na medula espinhal detetados em animais diabéticos, reforçam a hipótese dum aumento de ativação das vias serotoninérgicas e noradrenérgicas de modulação descendente da dor⁹. A demonstração de que este recrutamento de mecanismos de modulação descendente não se traduz em inibição da transmissão nociceptiva na medula espinhal aponta para a existência de comprometimento da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica espinhal na NDD. É, assim, importante avaliar os mecanismos associados às alterações das ações mediadas pela noradrenalina e serotonina nesta condição de dor crónica.

Conclusões

A dor associada à neuropatia diabética não se resume apenas às alterações dos nervos periféricos, mas engloba um conjunto de alterações funcionais que afetam componentes centrais do sistema de controlo da dor. A diabetes induz hiperatividade e hiperexcitabilidade dos neurónios nociceptivos da medula espinhal que podem explicar a dor espontânea, alodinia e hiperalgesia características da NDD. Para tal alteração funcional parece contribuir a potenciação dos mecanismos excitatórios locais, mediados pelo glutamato e SP^{24,25}, conjuntamente com a perda de inibição local mediada pelo GABA, glicina e opióides^{26,31,35-38}. As alterações do papel inibitório do GABA durante a NDD poderão dever-se à diminuição da expressão de KCC2 na medula espinhal induzida pelo aumento da ativação microglial e pelo *stress* oxidativo³¹⁻³³. A administração de minociclina, um inibidor específico da microglia, e o tratamento com ácido α -lipóico, um potente antioxidante, normaliza ou melhora a expressão de KCC2 na medula espinhal de animais diabéticos, apresentando efeitos benéficos na nociceção^{32,33}. Assim, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de fármacos direcionados para a prevenção/correção dos fatores fisiopatológicos da NDD, em

particular de moléculas terapêuticas que previnam ou corrijam a ativação microglial e o *stress* oxidativo na medula espinhal.

Possivelmente em consequência da hiperatividade neuronal na medula espinhal durante a NDD, verifica-se um aumento significativo na atividade dos neurónios da PAG. Como a PAG está envolvida na transmissão rostral de informação nociceptiva e na modulação descendente da mesma, o aumento da informação nociceptiva provinda da medula espinhal deverá, por sua vez, recrutar neurónios da PAG que projetam para o RVM e para o A5. Efetivamente, a atividade dos neurónios serotoninérgicos do RVM e dos noradrenérgicos do A5, que projetam para o corno posterior da medula espinhal esta aumentada, com incremento dos níveis de serotonina e noradrenalina na medula espinhal^{6,9}. Contudo, a ação da serotonina e noradrenalina parece estar alterada durante a diabetes, uma vez que o aumento dos níveis destes neurotransmissores não induz alívio da dor. De facto, seria de esperar que um aumento de serotonina e noradrenalina a nível espinhal induzisse analgesia, o que não se verifica durante a NDD. A ausência de efeitos analgésicos pode dever-se:

- À reduzida disponibilidade dos neurotransmissores na sinapse por alterações no processo de exocitose.
- Ao facto da serotonina poder estar a atuar preferencialmente em recetores que despoletam uma ação excitatória e este efeito sobrepor-se aos desencadeados pelos efeitos inibitórios da noradrenalina.
- Ao facto das alterações locais nos mecanismos excitatórios e inibitórios, como as evidenciadas para o sistema GABAérgico, afetarem a ação inibitória destes neurotransmissores.

No que respeita a este último ponto, é importante salientar que uma das vias de ação da noradrenalina é por ligação aos adrenorreceptores $\alpha 1$ e consequente libertação de GABA¹⁸. Considerando o efeito excitatório do GABA durante a NDD, conforme dados acima revistos, os altos níveis de noradrenalina podem estar a exercer um efeito excitatório de forma indireta, via ação pós-sináptica do GABA.

Coletivamente, os achados apresentados nesta revisão apontam para a necessidade de desenvolver novos fármacos que previnam as alterações neurobiológicas encontradas no sistema nervoso central durante a diabetes.

Apoio: trabalho realizado com apoio financeiro do Projeto PTDC/SAL-NSC/110954/2009 e do Projeto de investigação científica na pré-graduação IJUP/UNICER.

Bibliografia

1. Holt R, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein B, eds. Textbook of Diabetes. 4.ª ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010.
2. Malik R, Veves A. Pathogenesis of human diabetic neuropathy. Em: Veves A, Malik R, eds. Diabetic neuropathy: clinical management. 2.ª ed. Humana Press; 2007.

3. Biessels G. Diabetic encephalopathy. Em: Veves A, Malik R, eds. Diabetic neuropathy: clinical management. 2.^a ed. Humana Press; 2007.
4. Fischer TZ, Tan AM, Waxman SG. Thalamic neuron hyperexcitability and enlarged receptive fields in the STZ model of diabetic pain. *Brain Res.* 2009;1268:154-61.
5. Morgado C, Tavares I. C-fos expression at the spinal dorsal horn of streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23:644-52.
6. Morgado C, Terra PP, Tavares I. Neuronal hyperactivity at the spinal cord and periaqueductal grey during painful diabetic neuropathy: Effects of gabapentin. *Eur J Pain.* 2010;14:693-9.
7. Pertovaara A, Wei H, Kalmari J, Ruotsalainen M. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. *Exp Neurol.* 2001;167:425-34.
8. Chen SR, Pan HL. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol.* 2002;87:2726-33.
9. Morgado C, Silva L, Pereira-Terra P, Tavares I. Changes in serotonergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: the preventive action of IGF1. *Neurobiol Dis.* 2011;43: 275-84.
10. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, et al.; Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care.* 2010;33:2285-93.
11. Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron.* 2007;55:377-91.
12. Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev.* 2004;46:295-309.
13. Ribeiro da Silva A. Substantia gelatinosa of the spinal cord. Em: Paxinos G, ed. The rat nervous system. 3.^a ed. Elsevier Academic Press; 2004.
14. Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol.* 1995;46:575-605.
15. Keay KA, Bandler R. Periaqueductal gray. Em: Paxinos G, ed. The rat nervous system. 3.^a ed. Elsevier Academic Press; 2004.
16. Bajic D, Proudfit HK. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *J Comp Neurol.* 1999;405:359-79.
17. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev.* 2009;60:214-25.
18. Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol.* 2006;80:53-83.
19. Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TD. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain.* 2010;150:573-81.
20. Tesfaye S. Advances in the management of diabetic peripheral neuropathy. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2009;3:136-43.
21. Burchiel KJ, Russell LC, Lee RP, Sima AA. Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats. A possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain. *Diabetes.* 1985;34:1210-3.
22. Ahlgren SC, Levine JD. Protein kinase C inhibitors decrease hyperalgesia and C-fiber hyperexcitability in the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol.* 1994;72:684-92.
23. D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth.* 2008;101:8-16.
24. Li N, Young MM, Bailey CJ, Smith ME. NMDA and AMPA glutamate receptor subtypes in the thoracic spinal cord in lean and obese-diabetic ob/ob mice. *Brain Res.* 1999;849:34-44.
25. 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.
26. Chen SR, Sweigart KL, Lakoski JM, Pan HL. Functional mu opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats. *Anesthesiology.* 2002;97:1602-8.
27. Williams J, Haller VL, Stevens DL, Welch SP. Decreased basal endogenous opioid levels in diabetic rodents: effects on morphine and delta-9-tetrahydrocannabinoid-induced antinociception. *Eur J Pharmacol.* 2008;584:78-86.
28. Jolivald CG, Lee CA, Ramos KM, Calcutt NA. Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride cotransporters. *Pain.* 2008;140:48-57.
29. Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17:457-62.
30. Payne J, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride cotransporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci.* 2003;26:199-206.
31. Morgado C, Pinto-Ribeiro F, Tavares I. Diabetes affects the expression of GABA and potassium chloride cotransporter in the spinal cord: a study in streptozotocin diabetic rats. *Neurosci Lett.* 2008;438:102-6.
32. Morgado C, Pereira-Terra P, Cruz CD, Tavares I. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13:150-9.
33. Morgado C, Pereira-Terra P, Tavares I. Alpha-lipoic acid normalizes nociceptive neuronal activity at the spinal cord of diabetic rats. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13:736-41.
34. Price T, Cervero F, De Koninck Y. Role of cation-chloride cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem.* 2005;5:547-55.
35. Wang XL, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. *J Physiol.* 2007;579:849-61.
36. Wang XL, Zhang Q, Zhang YZ, et al. Downregulation of GABAB receptors in the spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathy. *Neurosci Lett.* 2011;490:112-5.
37. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* 2010;120:3779-87.