



UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

**ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO DA MODULAÇÃO DA
DOR OROFACIAL PELOS RECEPTORES DE NMDA**

CARLOS AMÍLCAR PARADA

Campinas, 1998

P212e

34790/BC



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Fisiologia e Biofísica

ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO DA MODULAÇÃO DA DOR OROFACIAL PELOS RECEPTORES DE NMDA

POR

CARLOS AMÍLCAR PARADA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
a obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, área de Fisiologia e Biofísica.

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone
Co-orientador: Prof. Dr. Alain Woda

Campinas, 1998

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Carlos Amílcar Parada
e aprovada pela Comissão Julgadora
31/03/98 *[assinatura]*



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
☐ Unicamp	
☐ P. 2. 2. e.	
V. Ex.	
Tel. 011 / 34790	
Plano 395/98	
C. 0	☒
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 12/08/98	
N.º CPD	

CM-00115309-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Parada, Carlos Amílcar

P212e Estudo eletrofisiológico da modulação da dor orofacial pelos receptores de NMDA / Carlos Amílcar Parada. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
115f.: ilus.

Orientador: Francesco Langone

Co-orientador: Alain Woda

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Rato. 2. Dor. 3. Trigêmeo. 4. Sistema nervoso central.*

I. Langone, Francesco. II. Woda, Alain. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

PROF. DR. LUIZ G. BRITTO



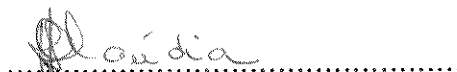
.....

PROF. DR. JARBAS ARRUDA BAUER



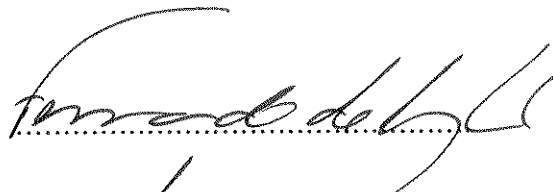
.....

PROFA. DRA. CLAUDIA H. TAMBELI



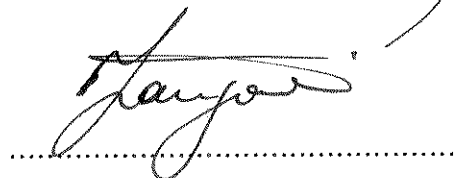
.....

PROF. DR. FERNANDO Q. CUNHA



.....

PROF. DR. FRANCESCO LANGONE



.....

SUPLENTES

PROF. DR. JOSÉ A. GONTIJO

.....

PROF. DR. ANTÔNIO ARI GONÇALVES

.....

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Orofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade D'Auvergne-Clermont I, Clermont-Ferrand, França. Sua execução teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francesco Langone, pela amizade, orientação, confiança e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alain Woda, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório e pelos ensinamentos de eletrofisiologia.

Aos Profs. Drs. Dominique Roux e Fernando Sierralta, pela amizade e ótima convivência no laboratório.

Aos colegas Phellipe Lucarini e Jean-Loui Molat pelo auxílio técnico e colaboração durante o trabalho no laboratório.

À Anne-Marie Gaydier, por sua amizade e dedicação durante os anos que convivemos no laboratório.

E a todos que, se não foram citados, não serão esquecidos por terem, de uma forma ou de outra, ajudado neste trabalho,

Obrigado.

.....
**POIS SE NA TERRA O FRUTO QUE COLHEMOS
NÃO COMPENSA O CANSAÇO QUE SENTIMOS
A VIDA VALE PELO QUE FAZEMOS,
na proporção DO AMOR QUE LHE IMPRIMIMOS,
E NÃO DO QUE DELA RECEBEMOS.**

(Sra. Lurdes Fávero, professora do meu primeiro grau)

CONTEÚDO

Abreviaturas, símbolos e simplificações.....	iii
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. EVIDÊNCIA DA SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL NAS HIPERALGESIAS.....	2
I.2. O FENÔMENO DO WIND-UP DAS FIBRAS C.....	4
I.3. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE NMDA NA ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS.....	7
I.4. PROPRIEDADES DOS RECEPTORES DE NMDA.....	13
I.5. DIVERSIDADE MOLECULAR DOS RECEPTORES DE NMDA E SUA DISTRIBUIÇÃO NO SISTEMA TRIGEMINAL.....	16
I.6. CONSIDERAÇÕES ANATÔMICAS E FUNCIONAIS DO NÚCLEO ESPINHAL DO TRIGÊMEO.....	19
I.6.1. OS AFERENTES TRIGEMINAIS.....	21
I.6.2. O SUBNÚCLEO CAUDAL.....	21
I.6.3. O SUBNÚCLEO INTERPOLAR.....	23
I.6.4. O SUBNÚCLEO ORAL.....	24
I.7. NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DOS NÚCLEOS SENSORIAIS DO TRIGÊMEO.....	26
I.7.1. NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS ESPECÍFICOS.....	27
I.7.2. NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS NÃO-ESPECÍFICOS.....	27
I.8. OS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	29
II. OBJETIVOS.....	31
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
III.1. ANIMAIS.....	33
III.2. ANESTESIA E CONTROLE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	33
III.3. REGISTRO DA ATIVIDADE ELETROFISIOLÓGICA DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	34
III.5. CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS CONVERGENTES DO SUBNÚCLEO ORAL.....	37
III.6. DROGAS.....	38
III.7. PREPARAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	39
III.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	42
III.8.1. EFEITO DE DOSES CUMULATIVAS DE MK-801 NAS RESPOSTAS DOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	43
III.8.2. CARACTERIZAÇÃO DO WIND-UP NOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	44
III.8.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANUCLEAR DE MK-801 NO WIND-UP DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	45
III.9. CÁLCULO DO WIND-UP.....	47
III.10. ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	48
III.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48

IV. RESULTADOS.....	51
IV.1. EFEITO DE DOSES CUMULATIVAS DE MK-801 NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	53
IV.2. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE NMDA NA RESPOSTA BASAL NO WIND-UP E NA PÓS-DESCARGA DOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	56
IV.3. CARACTERIZAÇÃO DO WIND-UP NOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	58
IV.4. PAPEL DO SUBNÚCLEO CAUDAL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL.....	63
V. DISCUSSÃO.....	77
VI. RESUMO E CONCLUSÕES.....	91
VII. SUMMARY.....	93
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	95

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIMPLIFICAÇÕES

α	— coeficiente angular
$[Ca^{2+}]_i$	— concentração intracelular de cálcio
μg	— micrograma
μl	— microlitro
AMPA	— 4-propeinato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxalona
ANA.	— analógico
AP4	— 2-amino-4-fosfonobutirato
AP-5	— 2-amino-5-fosfonovalerato
Asp	— aspartato
C(1-4)	— segmentos cervicais
c-fos	— gene de expressão rápida progenitor da proteína Fos
CGS1975	— carboxilato de cis-4-fosfonometil-2-piperidina
c-jun	— gene de expressão rápida progenitor da proteína Jun
COMP.	— computador
CPP	— propil-1-fosfato de 3,3-(2-carboxipiperazina-4- γ)
DAG	— diacilglicerol
DIG.	— digital
DNIC	— controle inibitório nociceptivo difuso
E	— estimulação
enantiômero	— forma isomérica óptica de uma substância
Glu	— glutamato
Gly	— glicina
GMPc	— guanina monofosfato cíclica
GTP	— guanina trifosfato
Hz	— Hertz (unidade de frequência, corresponde a 1/s)
i.n.	— intranuclear
i.v.	— intravenosa
IP3	— inositol 1,4,5-trifosfato
KA	— quainato (ou kainato)
latência	— intervalo de tempo entre o estímulo (periférico) e a resposta emitida pelo neurônio
limiar	— intensidade mínima de estimulação (elétrica) capaz de desencadear um potencial-de-ação no mínimo
Ln	— logaritmo neperiano
LTP	— potencialização a longo prazo
mA	— miliampere (Ampere = unidade de corrente elétrica)

mg/Kg	— concentração: miligrama de droga por quilograma de
MK-801	— (+)-5-metil-10,11-di-hidro-5H-dibenzo[a,b] ciclo- heptamo-5,10-imina
ms	— milisegundo
mV	— milivolts (Volt = unidade de potencial elétrico)
n. IX	— nervo glossofaríngeo
n. X	— nervo vago
n. V	— nervo trigêmeo
n. VII	— nervo facial
NE	— neurônio nociceptivo específico
NET	— núcleo espinhal do trigêmeo
NK	— neuroquinina
NMDA	— N-metil-D-aspartato
NO	— óxido nítrico
NR(1-2,A-D)	— subunidades de canais iônicos acoplados aos receptores de NMDA
ODC	— ornitina descarboxilase
OSCILOSC.	— osciloscópio
PA	— potenciais-de-ação
PCP	— fenciclidina
PD	— pós descarga
PEPS	— potenciais excitatórios pós-sinápticos
PIP2	— fosfato-inusitol-bi-fosfato
PKC	— proteína quinase C
PLC	— fosfolipase C
PSH	— histograma pós estímulos
R	— coeficiente de regressão (logarítmica)
seg	— segundo
SNC	— sistema nervoso central
SP	— substância P
Sp50	— subnúcleo oral
Sp5C	— subnúcleo caudal
Sp5I	— subnúcleo interpolar
tail-flick	— flexão da cauda
TET	— trato espinhal do trigêmeo
WDR	— neurônio convergente ou polireceptivo

I. INTRODUÇÃO

A dor é uma sensação complexa difícil de definir. A pluralidade de termos usados para adjetivar a dor (“lancinante”, “fulgurante”, “queimação”, etc.) dão uma idéia da variedade de sensações percebidas e da dificuldade de descrevê-la com precisão (MELZACK & THORGERSON, 1971). A Associação internacional para o estudo da dor (International Association for the Study of Pain -IASP-) a define como “uma sensação desagradável e uma experiência emocional em resposta a um atentado tecidual real ou potencial, ou descrito nestes termos” (WALL, 1989).

Neste trabalho nós nos limitaremos à dor aguda, ou seja, àquela desencadeada por estimulações nociceptivas. As estimulações nociceptivas têm em comum a capacidade de pôr em risco a integridade do corpo e desencadear respostas comportamentais e reflexas (somáticas ou vegetativas) variadas, geralmente associadas às sensações dolorosas (REY, 1993).

A dor ocupa um lugar particular no sistema sensorial, que tem a função de informar os centros nervosos a respeito das condições nas quais se encontram o meio externo e interno do organismo. Como veremos, o caráter doloroso de um estímulo não é definido apenas pela sensação que ele produz. Na realidade, não existe necessariamente uma relação estreita entre o estímulo causal e a sensação resultante. A dor pode mesmo ser percebida na ausência aparente ou real de estimulações corporais (dor fantasma ou dor neurológica de origem central). Na presença de processos inflamatórios, por exemplo, um estímulo mecânico de pouca intensidade pode desencadear uma reação dolorosa intensa. Os fenômenos de alodínia (dor produzida por um estímulo não nociceptivo) e hiperalgesia (aumento das sensações dolorosas) fazem parte do campo de estudos da fisiologia das sensações dolorosas.

Apesar da dor ter uma função protetora do organismo, muitas vezes, alterações plásticas nos neurônios que a transmitem, podem provocar modificações nas sensações dolorosas (CODERRE ET AL., 1993). A partir do momento que se instala, a dor crônica, a hiperalgesia ou a alodínia, o efeito protetor fisiológico da dor dá lugar a um estado “patológico”, que é, não apenas inútil, mas deletério para o organismo. Atualmente acredita-se que as hiperalgesias possuam duas origens distintas: uma periférica e outra central. No tecido periférico, a hiperalgesia está relacionada sobretudo com a sensibilização dos nociceptores. Vários mecanismos periféricos, dentre eles a inflamação do tecido, podem provocar uma diminuição do limiar de ação dos nociceptores e conseqüentemente um estado de hiperalgesia e alodínia (DRAY , 1994 e GUIRIMAND & LE BARS, 1996). Entretanto, muitas vezes, mesmo após a reparação tecidual, a hiperalgesia pode persistir diante da aplicação de um estímulo nociceptivo no tecido previamente injuriado. Isto sugere que a resposta nociceptiva mediada pelos neurônios do sistema nervoso central (SNC), pode ser modificada após estímulos nociceptivos prolongados decorrentes da injúria previamente instalada no tecido, fenômeno conhecido por sensibilização central (CODERRE ET AL., 1993).

1.1. EVIDÊNCIAS DA SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL NAS HIPERALGESIAS

Vários autores têm sugerido que o processo de sensibilização central, caracterizado pelo aumento da excitabilidade dos neurônios do SNC envolvidos na transmissão da informação dolorosa, seja um dos principais fatores responsáveis pelas hiperalgesias (CODERRE ET AL., 1993 ; WILCOX, 1993 ; DAHL, 1994). O teste da formalina, por exemplo, tem sido usado como um modelo de sensibilização central induzida pela inflamação do tecido periférico. A injeção

subcutânea de formalina diluída produz uma resposta nociceptiva bifásica, observada tanto nos estudos¹ comportamentais (CADET ET AL., 1993) como nos estudos eletrofisiológicos (RABOISSON ET AL., 1995). A primeira fase ocorre imediatamente após a injeção e é caracterizada por uma resposta nociceptiva intensa que dura de 5 a 10 minutos. A segunda fase, que ocorre aproximadamente 20 minutos após a aplicação da formalina, é caracterizada por uma resposta nociceptiva moderada que dura de 20 a 60 minutos (resposta nociceptiva tônica). Vários autores demonstraram que injeções no SNC de agonistas de opióides- μ e anestésicos (DICKENSON & SULLIVAN, 1987 ; VACCARINO & MELZACK, 1992), ou injeção subcutânea de lidocaína (CODERRE ET AL., 1990), inibem a resposta nociceptiva tônica apenas se estas injeções forem aplicadas anteriormente à formalina e não após a primeira fase da resposta nociceptiva. Estes resultados sugerem que a segunda fase do teste da formalina depende da ativação dos neurônios do corno dorsal espinhal, a qual ocorre logo após a injeção de formalina, evidenciando o papel do SNC nas hiperalgesias.

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que estímulos mecânicos intensos, aplicados nos campos receptivos² de neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal, produzem uma hiperatividade destes neurônios se o tecido periférico for injuriado por injeção intradérmica de capsaicina. A hiperalgesia, permanece mesmo após a recuperação do tecido, mas pode ser evitada se a região for anestesiada previamente à injúria tecidual (LA MOTTE ET AL., 1991 ; TOREBJÖRK ET AL., 1992). Também foi observado um aumento na extensão dos campos receptivos periféricos após aplicação repetitiva de estímulos nociceptivos (WOOLF & KING, 1990 ; HU ET AL., 1992).

¹ A maior parte dos estudos citados neste trabalho foram realizados em ratos. Do contrário, a espécie referida será citada.

² Campo receptivo é a área da pele, mucosa, ou tecidos profundos, normalmente menor que 1mm², a partir da qual uma fibra nervosa aferente ou um neurônio central e seus receptores associados podem ser estimulados.

Recentemente, FERREIRA ET AL. (1994, 1996) demonstraram a existência de uma sensibilização retrógrada dos neurônios sensoriais de primeira ordem, induzida pela liberação de glutamato no corno dorsal da medula espinhal e conseqüente ativação dos receptores de NMDA. Os resultados obtidos por estes autores, apesar de não descartarem a possibilidade dos neurônios do SNC estarem também sensibilizados, sugerem que os terminais pré-sinápticos dos neurônios sensoriais primários são um importante sítio de sensibilização periférica.

Contudo, o envolvimento do SNC nas hiperalgesias, pode ser explicado pelo aumento progressivo do número de potenciais-de-ação dos neurônios nociceptivos do corno dorsal, após estimulações repetitivas das fibras C. Este fenômeno foi inicialmente descrito e definido por MENDELL (1966) como “wind-up”³. Atualmente, o wind-up tem sido considerado um importante modelo de estudos da sensibilização central, relacionada com a atividade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (REN, 1994; POCKETT, 1995 ; ARENDT-NIELSEN & PETERSEN-FELIX, 1995). Ele tem permitido estudar os mecanismos centrais da hiperalgesia independentemente dos mecanismos periféricos.

1.2. O FENÔMENO DO WIND-UP DAS FIBRAS-C

Wind-up corresponde ao aumento progressivo do número de potenciais-de-ação pós-sinápticos (PEPS) dos neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal, que ocorre após uma série de estimulações elétricas das fibras C (WOOLF & THOMPSON, 1991; SULLIVAN ET AL., 1992 ; FRASER E COLL, 1992).

³ O termo “wind-up” é mantido na sua versão original em inglês, por não haver um termo técnico adequado e correspondente na língua portuguesa. Em textos especializados, é comum também, encontrar a expressão “wind-up das fibras C” . utilizada por vários autores, para designar este fenômeno provocado pela ativação das fibras C. Na língua inglesa, o complemento “das fibras C” dá uma conotação técnica apropriada ao termo wind-up que significa “dar corda” (relógio).

Ele pode também ser observado nas preparações nociceptivas reflexas ligadas aos neurônios motores do corno ventral (THOMPSON ET AL., 1990 ; XU, ET AL., 1995). Este fenômeno representa um tipo de somação temporal resultante da estimulação elétrica de fibra C com alta intensidade e frequência entre 0,2 e 1 Hz (DAVIES & LODGE, 1987; DICKENSON & SULLIVAN, 1990 ; JEFTINJA & URBAN, 1994).

Investigações experimentais realizadas em humanos têm confirmado os vários estudos em animais que demonstram que o wind-up é um potente mecanismo de somação central tanto em condições normais como em condições de extrema excitabilidade (KRISTENSEN ET AL., 1992 ; REN, 1994 ; ARENDT-NIELSON ET AL., 1995 ARENDT-NIELSON & PETERSEN-FELIX, 1995). Como não é possível registrar a atividade dos neurônios do corno dorsal em humanos, técnicas psicofísicas (ARENDT-NIELSON ET AL., 1995) e eletrofisiológicas (KRISTENSEN ET AL., 1992) têm sido desenvolvidas para registrar estas somações temporais no homem. Isto tem permitido a transferência de informações do estudo em animais para o humano e aumentar o interesse clínico na investigação dos mecanismos envolvidos no fenômeno do wind-up.

Do ponto de vista eletrofisiológico, a sucessão de estímulos aferentes pode ser traduzida por despolarizações cada vez maiores, pelo fato dos potenciais pós-sinápticos gerados pela ativação das fibras-C serem lentos. Isto faz com que uma nova onda de potenciais aferentes produza seu efeito antes do neurônio retornar ao seu potencial de repouso. Por este motivo, a indução do wind-up é possível dentro de uma determinada faixa de frequências de estimulações das fibras amielínicas (HAMBA ET AL., 1994). Uma característica importante do wind-up é que este fenômeno aparece em segundos, a partir da segunda estimulação, e seu efeito pode durar até alguns poucos minutos. Alguns autores chamam de “pós-

descarga” as respostas com latências⁴ maiores de 300ms (DAVIES & LODGE, 1987 ; DICKENSON & SULLIVAN, 1990 ; JEFTINJA & URBAN, 1994). Apesar desta resposta tardia ser observada em um contingente menor de neurônios, a divisão entre “wind-up” e “pós-descarga” fundamenta-se basicamente no comportamento temporal das duas respostas. Assim sendo, é provável que correspondam ao mesmo fenômeno fisiológico, uma vez que, aparentemente, estão sujeitas aos mesmos mecanismos.

O fenômeno do wind-up é observado em um grande número de fibras nociceptivas. Acredita-se que este fenômeno de somação temporal origine-se nas vias de transmissão polissinápticas, a partir da ativação dos neurônios de associação situados, sobretudo, na camada gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal (DICKENSON & SULLIVAN, 1990 ; SULLIVAN ET AL., 1992 ; FRASER ET AL., 1992). Tem sido demonstrado que a maioria das fibras nociceptivas do subnúcleo caudal do sistema sensorial trigeminal exibe o wind-up com características bem semelhantes às dos neurônios da medula espinhal (HAMBA ET AL., 1994). No entanto, apesar da incontestável participação das porções mais rostrais do núcleo espinhal do trigêmeo, como os subnúcleos interpolar e oral, na transmissão da dor orofacial, o fenômeno do wind-up não foi demonstrado nestas estruturas.

Atualmente considera-se que os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), encontrados em grandes quantidades na camada gelatinosa da medula espinhal e do subnúcleo caudal (PETRALIA ET AL., 1994 ; DOHRN & BEITZ, 1994), estejam, pelo menos parcialmente, envolvidos no mecanismo do wind-up das fibras C (WOOLF & THOMPSON, 1991; CHAPMAN & DICKENSON, 1994 ;

⁴ Latência é definida como o intervalo de tempo que ocorre entre a aplicação de um estímulo e a resposta emitida em decorrência deste estímulo.

CHAPMAN E COL., 1994 ; ARENDT-NIELSON ET AL., 1995 ; XU ET AL., 1995 ; LIU & SANDKÜHLER, 1995).

I.3. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE NMDA NA ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS.

A grande maioria das sinapses excitatórias do sistema nervoso central é mediada por L-glutamato e L-aspartato. As respostas sinápticas produzidas pelos amino-ácidos glutamato e aspartato ⁵ são mediadas por diferentes grupos de receptores categorizados em metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos estão associados ao sistema de segundo mensageiro e os ionotrópicos a canais iônicos acoplados às suas estruturas.

Os receptores metabotrópicos atuam através de uma proteína G acoplada ao sítio interior do receptor, a qual ativa a fosfolipase C que, por sua vez, promove a hidrólise do fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP₂), produzindo os segundos mensageiros celulares diacilglicerol e inositol trifosfato (PIN & DUVOISIN, 1995 ; KYROZIS ET AL., 1995).

Os receptores de glutamato associados a canais-iônicos são classificados segundo seus agonistas mais específicos em: N-metil-D-aspartato (NMDA), propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalone (AMPA), kainato e L-2-amino-4-fosfonobutirato (AP4). Todos estes receptores já foram clonados. Na medula espinhal, os receptores de glutamato tipo NMDA, AMPA, kainato e metabotrópicos localizam-se principalmente nos terminais pós-sinápticos, já os receptores AP4 localizam-se preferencialmente na membrana pré-sináptica, exercendo um papel de autoreceptor, ou seja, controlam a liberação de glutamato (MONAGHAN ET AL., 1989 ; WATKINS ET AL., 1990).

⁵ Neste trabalho, o termo Glutamato, ou sua abreviação Glu e Aspartato, ou sua abreviação Asp, referem-se sempre ao seus isômeros na forma levôgera L-Glutamato e L-Aspartato.

Os receptores AMPA são encontrados em grandes quantidades no SNC dos vertebrados (HOLLMANN & HEINEMANN, 1994) e são os mais abundantes no núcleo do trato espinhal do trigêmeo. (TALLAKSEN-GREENE ET AL., 1992 ; KONDO ET AL., 1995). Os receptores AMPA são responsáveis pelas transmissões sinápticas rápidas. Tais transmissões são desencadeadas pela interação do glutamato com um único complexo macromolecular, o qual, promove uma mudança conformacional e imediata no receptor. Este processo requer alguns poucos milissegundos para ocorrer e o potencial excitatório pós-sináptico resultante é evocado imediatamente após mudança da capacitância da membrana pela abertura de canais permeáveis a Na^+ e K^+ (WILCOX, 1991 ; BETTLER & MULLE, 1993 ; EDMONDS ET AL., 1995).

Os receptores de NMDA, por outro lado, são ativados posteriormente e possuem um tempo de ativação maior que os receptores AMPA (WILCOX, 1991). Eles estão relacionados principalmente com as respostas sinápticas tardias, como, por exemplo, as potencializações de longa durações (COLLINGRIDGE & BLISS, 1987 ; MALENKA & NICOLL, 1993) e o wind-up provocado pela ativação das fibras-C (DAVIES & LODGE, 1987 ; REN, 1994 ; CHAPMAN & DICKENSON, 1994). Considerando seu papel na modulação destas respostas neuronais, eles têm sido associados aos mecanismos de plasticidade sináptica envolvidos no processo de hiperalgesia (WILCOX, 1993 ; CODERRE E COL., 1993). Atualmente não restam dúvidas de que a percepção da dor envolve os vários receptores de glutamato. Contudo, os receptores de NMDA parecem estar envolvidos particularmente na nocicepção relacionada com as vias polissinápticas (FARKAS & ONO, 1995), uma vez que é justamente a ativação destas vias que promove a sensibilização dos neurônios nociceptivos da medula espinhal ocasionando o wind-up e conseqüentemente, as hiperalgesias relacionadas ao SNC (DAHL, 1994 ; WILCOX, 1993). Vários trabalhos têm evidenciado a participação dos receptores NMDA

nos mecanismos centrais da hiperalgesia (KLEPSTAD ET AL., 1990 ; CODERRE & MELZACK, 1991; FERREIRA & LORENZETTI, 1994 ; ELLIOTT E COL., 1995). Estudos realizados em primatas demonstraram que, enquanto os receptores não-NMDA participam na transmissão de todas as informações que passam pelo trato espinotalâmico, os receptores de NMDA atuam mais especificamente na transmissão das respostas nociceptivas, sobretudo nas hiperalgesias de origem inflamatória (DOUGHERTY & WILLIS, 1991 ; DOUGHERTY ET AL., 1992). Vários modelos de nocicepção parecem ser dependentes dos receptores de NMDA. A síndrome da dor crônica segmentar (ZOCHODNE ET AL., 1994), a hiperalgesia provocada por inflamação articular aguda (NEUGEBAUER ET AL., 1993), a alodínia observada nos modelos de neuropatias periféricas (CARLTON & HARGETT, 1995), as hiperalgesias decorrentes de estímulos nociceptivos térmicos e mecânicos prolongados (CODERRE & EMPEL, 1994) e a segunda fase do teste da formalina (NÄSSTRÖM ET AL., 1992) são inibidos por várias classes de antagonistas específicos de receptor de NMDA. Em humanos, tem sido demonstrado que a quetamina, um antagonista específico de receptores de NMDA, inibe as hiperalgesias e a alodínia normalmente observadas em pacientes com neuropatias (NEUGEBAUER ET AL., 1993 a ; EISENBERG ET AL., 1995 ; MAX ET AL., 1995).

Apenas as estimulações prolongadas e de alta intensidade parecem ser capazes de ativar os receptores de NMDA (CODERRE ET AL., 1993). Apesar dos mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica decorrentes da ativação dos receptores de NMDA, ainda não estarem totalmente esclarecidos, eles provavelmente envolvem um influxo de Ca^{2+} através da abertura dos canais iônicos acoplados a estes receptores (SCATON, 1993 ; MORI & MISHINA, 1995 ; EDMONDS ET AL., 1995). O influxo do íon Ca^{2+} nos terminais pós sinápticos, via receptores de NMDA, viabiliza uma série processos biológicos no meio intracelular (FIGURA 1). Estes processos, apesar de não serem específicos da

nocicepção, modulam a transmissão nociceptiva, além de induzirem modificações plásticas nos neurônios pós sinápticos. O aumento da concentração de cálcio intracelular estimula a síntese de uma série de substâncias endógenas capazes de alterar o mecanismo de ação dos próprios receptores de NMDA e, aumentar conseqüentemente, a atividade neuronal. Neste sentido, o aumento da síntese de poliaminas pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), ativa os sítios modulatórios do receptor NMDA, os quais facilitando assim a abertura dos canais acoplados a este receptor (ROCK & MACDONALD, 1995).

O aumento de Ca^{2+} intracelular também estimula a formação de proteína quinase C (PKC). Esta, por sua vez, promove fosforilação dos receptores de NMDA nas células nociceptivas (CERNE ET AL., 1993) aumentando assim a probabilidade de abertura dos canais de cálcio acoplados aos receptores de NMDA (CHEN & HUANG, 1992). A estimulação da síntese de PKC pode, portanto, desencadear um processo de retroalimentação positiva que aumenta o influxo de Ca^{2+} , sustentando as respostas celulares. Provavelmente, este mecanismo, desempenha um importante papel no fenômeno do wind-up das fibras C.

Ainda com relação ao fenômeno do wind-up, tem sido sugerido que a substância P (SP) potencializa a atividade dos receptores de NMDA durante a nocicepção (SKILLING ET AL., 1990 ; CODERRE & MELZACK, 1991 ; MURRAY ET AL., 1991 ; RUSIN ET AL., 1993 a). A SP é um peptídeo pertencente ao grupo das neuroquininas, da família das taquiquininas, que atua preferencialmente nos receptores de neuroquinina tipo NK1. É freqüentemente encontrada nos terminais das fibras de pequeno diâmetro, juntamente com neurotransmissores, e liberada após estímulos nociceptivos intensos (KANGRGA & RANDIC, 1990 ; CODERRE & MELZACK, 1991; RUSIN ET AL., 1993 b ; COGGESHALL & CARLTON, 1997).

Foi observado que a co-administração intratecal de SP e N-metil-D-Aspartato aumenta as respostas evocadas nas fibras A δ e o wind-up das fibras C (CHAPMAN ET AL., 1994), além de intensificar as respostas nociceptivas durante a segunda fase do teste da formalina (MJELLEM-JOLY ET AL., 1992). A SP parece ter um papel fundamental no fenômeno do wind-up das fibras C por facilitar também o influxo de Ca^{2+} nos neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal, via receptores de NMDA (RUSIN ET AL., 1993 b). Acredita-se que a interação entre o receptor NK1 e o receptor de NMDA ocorra pela ativação da proteína G acoplada aos receptores NK (URBAN ET AL., 1994). A proteína G favorece a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e, consequentemente, a ativação da PKC. Como descrito anteriormente, a fosforilação dos receptores de NMDA pelo PKC provoca alterações na cinética dos sítios de ligação dos íons Mg^{2+} , favorecendo o influxo de Ca^{2+} através do canal iônico ligado ao receptor de NMDA. Isto potencializa a despolarização do neurônio, e possibilita o fenômeno de wind-up (CHEN & HUANG, 1992 ; CERNE ET AL., 1993).

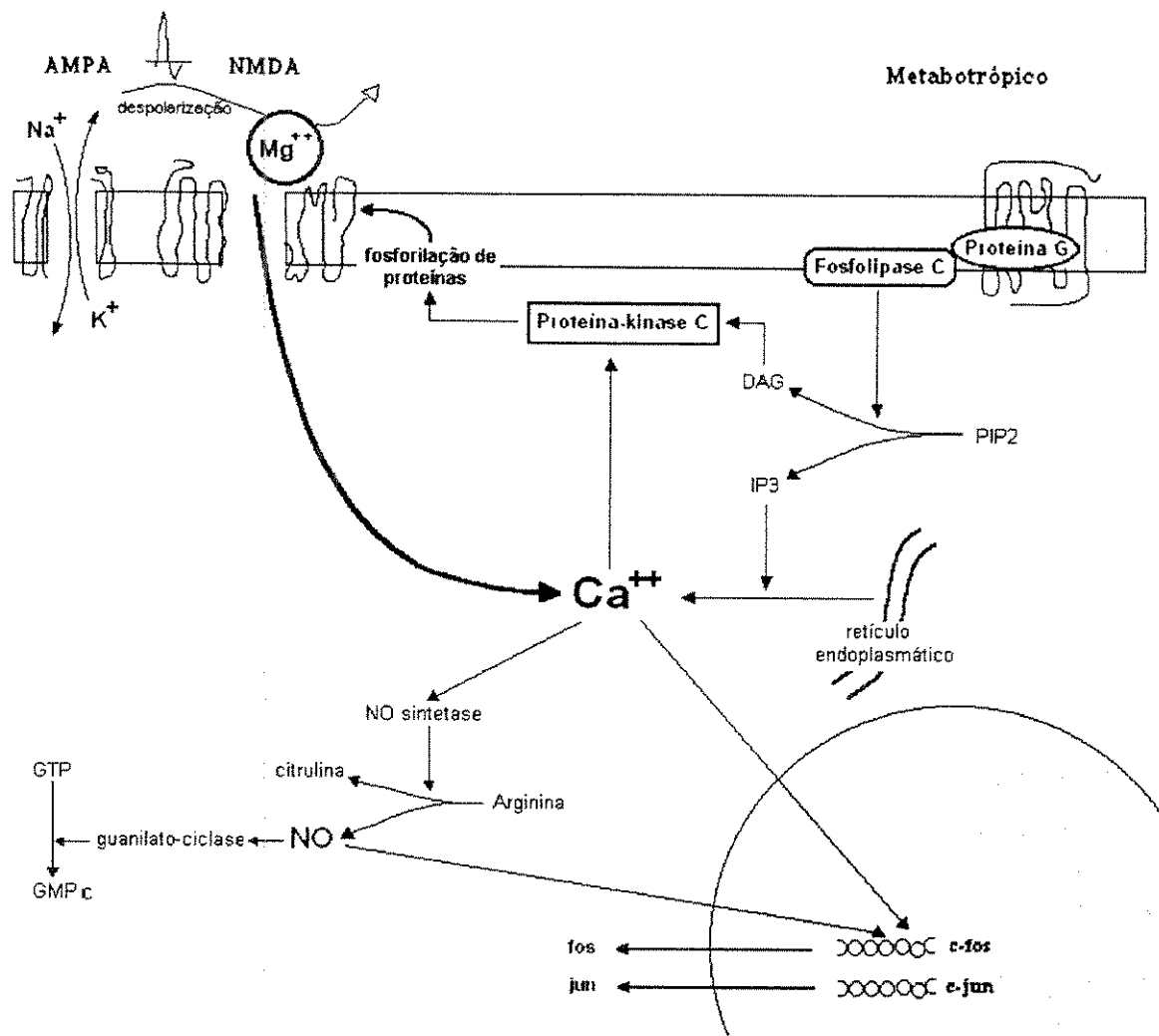


FIGURA1. Mecanismos intracelulares em resposta a estimulações nociceptivas intensas e prolongadas. A liberação de glutamato, nos terminais pré-sinápticos das fibras C promove a ativação dos receptores AMPA/kainato, NMDA e metabotrópicos. A intensa despolarização da membrana do neurônio pela entrada dos íons Na^+ e saída dos íons K^+ pelos canais acoplados aos receptores AMPA/kainato libera o íon Mg^{2+} , que bloqueia os canais iônicos acoplados aos receptores de NMDA, provocando uma maciça entrada de Ca^{2+} no meio intracelular. A ação do glutamato no receptor metabotrópico ativa, via proteína G, uma fosfolipase C, responsável pela formação de diacilglicerol (DAG) e inositol-tri-fosfato (IP_3). O DAG ativa uma proteína quinase-C (PKC), responsável pela fosforilação dos receptores de NMDA. A ativação dos receptores NK1 pela substância P provoca o mesmo efeito nos receptores de NMDA, também via PKC. O IP_3 mobiliza as reservas de Ca^{2+} estocadas no retículo endoplasmático. A alta concentração de Ca^{2+} intracelular ativa a NO sintetase, a qual estimula a via L-arginina-NO- GMP_c . O NO aumenta as taxas de GMP_c pela ativação da guanilato ciclase. O NO pode também difundir pela membrana pré-sináptica ou para as células gliais (transmissor retrógrado), ou ainda agir como um neurotransmissor clássico sobre os receptores de NO encontrados na membrana. Juntamente com o Ca^{2+} , ele contribui também na expressão dos pro-oncogenes *c-fos* e *c-jun*. A síntese da proteína fos é importante para a expressão dos genes da dinorfina e das encefalinas.

I.4. PROPRIEDADES DOS RECEPTORES DE NMDA

Os receptores de NMDA possuem acoplados à sua estrutura molecular, canais de permeabilidade aos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , estruturalmente semelhante aos outros canais iônicos associados a neurotransmissores (SCATTON, 1993). Os receptores de NMDA são constituídos de subunidades formadas por quatro segmentos hidrofóbicos (M1-M4). Cada subunidade possui sítios de reconhecimento de ligantes endógenos e exógenos, que favorecem o controle da abertura e fechamento do canal. Tanto a região externa (receptora) como a região transmembrânica (canal-iônico) estão sujeitas a modulações alostéricas (MORI & MISHIMA, 1995). Na região receptora existem três sítios de reconhecimento: o sítio do glutamato, o sítio da glicina e o sítio das poliaminas. **i:** O sítio do glutamato é o local de reconhecimento dos agonistas endógenos L-glutamato e L-aspartato, que ativam os receptores NMDA. Alguns antagonistas dos receptores de NMDA bloqueiam especificamente estes receptores por competirem diretamente com o glutamato ou com o N-metil-D-aspartato, como é o caso do 2-amino-fosfonovalerato (2-AP5), CPP e CGS19755. Os efeitos destes antagonistas são reversíveis na presença do glutamato ou do N-metil-D-aspartato (OLNEY ET AL., 1991; BENEVENISTE & MAYER, 1991 a ; b). **ii:** O sítio da glicina, é considerado um sítio modulatório cuja ativação promove um aumento probabilidade de abertura do canal iônico. A glicina desempenha um papel de co-agonista do receptor de NMDA (DICKENSON & AYDER, 1991 ; CLEMENTS & WESTBROOK, 1991). **iii:** os sítios das poliaminas constituem os sítios de regulação alostérica, os quais têm sido identificados tanto na região receptora como na região transmembrânica (ROCK & MACDOLNALD, 1995).

Na região transmembrânica, além dos sítios de ligação de poliaminas, existem sítios de ligação dos anestésicos dissociativos, dos íons Zn^{2+} e dos íons

Mg^{2+} . i: os anestésicos dissociativos, como a quetamina e a fenciclidina, impedem o influxo de íons pelo canal e portanto não competem com o glutamato. Neste sítio ligam-se também outros potentes bloqueadores dos canais de Ca^{2+} acoplados aos receptores de NMDA, tais como, memantina e MK-801 (dizocilpina). A ação destes antagonistas é dependente da ativação dos receptores de NMDA (bloqueadores uso-dependentes), isto é, quanto maior a liberação de glutamato, maior é a ação antagonista destes agentes (OLNEY ET AL., 1991 ; YAMAMOTO & YAKSH, 1992 a ; b ; IVERSEN, 1994). ii: tem sido sugerido que o Zn^{2+} exerce um papel modulatório dos receptores de NMDA, determinado pelo bloqueio voltagem-independente do canal iônico acoplado ao receptor (XIE & SMART, 1991). iii: os sítios de ligação para íons magnésio conferem aos canais acoplados ao receptor de NMDA uma importante característica fisiológica que o distingue de todos os demais canais acoplados aos receptores de glutamato. O Mg^{2+} mantém bloqueado o canal iônico, mesmo quando o glutamato se encontra ligado ao receptor. Bloqueio este que depende do potencial de membrana do neurônio. Altas concentrações de Mg^{2+} no meio extracelular têm-se mostrado altamente eficaz no bloqueio de influxo de íons, sobretudo de Ca^{2+} , pelos canais dos receptores de NMDA (SAKURADA ET AL., 1993).

Dados da literatura têm demonstrado que antagonistas dos receptores AMPA inibem a atividade dos receptores de NMDA ao bloquear a despolarização inicial da membrana pós-sináptica (NEUGEBAUER ET AL., 1993 b ; CODERRE & EMPEL, 1994 ; FARKAS & ONO, 1995). O bloqueio dos canais do receptor NMDA pelos íons Mg^{2+} , impede o influxo de Ca^{2+} mesmo havendo ativação dos receptores de NMDA. Admite-se que a liberação dos íons Mg^{2+} , e a conseqüente abertura dos canais acoplados aos receptores de NMDA, seja dependente de uma despolarização prévia da membrana pós-sináptica (WILCOX, 1991 ; EDMONDS ET AL., 1995). Normalmente esta despolarização inicial ocorre sobretudo pela

ativação imediata dos receptores AMPA (WILCOX, 1993). Todavia, recentemente foi demonstrado que é possível haver influxo de Ca^{2+} através dos receptores de NMDA dos neurônios do corno dorsal, *in vitro*, mesmo na ausência de uma despolarização inicial da membrana pós-sináptica, desde que a concentração de íons Mg^{2+} no meio extracelular esteja dentro dos níveis fisiológicos (REICHLING & MACDERMOTT, 1996). De qualquer modo, em condições fisiológicas normais, a despolarização prévia da membrana pós-sináptica é considerada importante para que haja influxo de Ca^{2+} na célula, através dos receptores de NMDA.

Ao contrário dos receptores de NMDA, os demais receptores de glutamato são considerados pouco permeáveis a cátions bivalentes, apesar de uma subpopulação de receptores AMPA [GluR2(R)] exibirem, *in vitro*, uma permeabilidade relativamente alta ao cálcio quando os receptores de NMDA estão desensibilizados (KYROZIS ET AL., 1995).

Vários trabalhos também têm demonstrado que a co-ativação de receptores de neuroquininas, principalmente SP, aumenta a probabilidade de abertura dos canais de NMDA pela diminuição da afinidade destes pelos íons Mg^{2+} , o que resulta em um aumento do influxo de Ca^{2+} nos neurônios nociceptivos do corno dorsal (RUSIN ET AL., 1993 b ; THOMPSON ET AL., 1994 ; CHAPMAN ET AL., 1994 ; URBAN ET AL., 1994).

Não resta dúvida de que uma das principais propriedades dos receptores de NMDA é permitir um influxo de Ca^{2+} no terminal pós-sináptico. Estudos baseados nos efeitos comportamentais de agentes que afetam o influxo de Ca^{2+} nos neurônios, mostraram que este é mais crítico nos processos de hiperalgesia envolvendo neurônios do SNC e plasticidade sináptica. Estes estudos mostraram que estímulos nociceptivos fásicos e breves, tais como os observados nos testes de “tail-flick” e placa-quente, não são afetados por modificações na concentração de Ca^{2+} intracelular (BENEDECK & SIKSZAY, 1984 ; CONTRERAS ET AL., 1988). Ao

contrário dos estímulos fásicos, os estímulos tônicos, tal como o teste da formalina e do ácido-acético, são sensíveis às variações de Ca^{2+} . O aumento da concentração de Ca^{2+} no meio extracelular incrementa as respostas relacionadas com a segunda fase do teste da formalina, ao passo que antagonistas de receptores de NMDA reduzem esta resposta nociceptiva (CODERRE & MELZACK, 1992 ; MIRANDA ET AL., 1992).

1.5. DIVERSIDADE MOLECULAR DOS RECEPTORES DE NMDA E A DISTRIBUIÇÃO NO SISTEMA TRIGEMINAL.

De acordo com a sequência de amino-ácidos e seus resíduos, foram determinadas duas famílias de subunidades de canais acoplados aos receptores de NMDA no rato: NR1 e NR2. As formas homoméricas dos receptores de NMDA com subunidades NR1, têm-se mostrado sensíveis tanto a glutamato e glicina, quanto a NMDA e glicina. Entretanto, um elevado influxo de Ca^{2+} somente é observado quando a subunidade NR1 é expressa junto com a subunidade NR2 (MORI & MISHIMA, 1995).

As formas heteroméricas com subunidades NR1/NR2 também mostraram-se altamente receptivas ao glutamato e à glicina, além de exibirem uma corrente de íons Na^+ e K^+ quando perfundidos por solução de Ringer contendo Ca^{2+} , o que indica uma alta permeabilidade a estes íons (MORI & MISHIMA, 1995). Suas respostas são suprimidas por antagonistas de receptores de NMDA seletivos ao sítio transmembrânico como Mg^{2+} , Zn^{2+} e MK-801, (BENVENISTE & MAYER, 1991a).

A subunidade NR2 dos canais de Ca^{2+} acoplados aos receptores de NMDA é encontrada em quatro formas distintas identificadas como NR2A, NR2B, NR2C e NR2D. As formas heteroméricas NR1/NR2A e NR1/NR2B são as mais sensíveis ao bloqueio de Mg^{2+} , enquanto que as formas heteroméricas NR1/NR2C

e NR1/NR2D são fracamente bloqueadas por Mg^{2+} (SCATTON, 1993 ; MORI & MISHIMA, 1995). Do ponto de vista farmacológico, as formas heteroméricas NR1/NR2A e NR1/NR2B também são mais facilmente bloqueadas pelo MK-801 que as formas heteroméricas NR1/NR2C e NR1/NR2D (BENVENISTE & MAYER, 1991 a ; b).

A permeabilidade ao Ca^{2+} é considerada similar nas quatro formas heteroméricas do canal NMDA (MONYER ET AL., 1994). Contudo, alguns estudos mostraram que o Ca^{2+} extracelular parece determinar distintamente o limiar de resposta nas diferentes formas heteroméricas, sendo a forma NR1/NR2B potencializada pelo aumento do Ca^{2+} extracelular e as demais, dessensibilizadas pelo aumento de Ca^{2+} extracelular (CHAZOT ET AL., 1994).

Os canais associados aos receptores de NMDA são caracterizados por possuírem uma abertura lenta, de 10 a 30 ms (EDMONDS ET AL., 1995). O tempo de fechamento é longo também. A forma NR1/NR2A possui um tempo de fechamento de aproximadamente 120 ms, enquanto as formas NR1/NR2B e NR1/NR2C aproximadamente 400 ms. Já a forma NR1/NR2D apresenta um tempo de fechamento ainda mais longo, de aproximadamente 5000 ms (MORI & MISHIMA, 1995). De certa forma, esta diferença no tempo de fechamento das diferentes subunidades de canais de NMDA poderia estar relacionada com as diferenças temporais observadas entre o wind-up e a pós-descarga.

Com relação à localização das subunidades dos receptores de NMDA ao longo da medula espinhal, é interessante notar que as subunidades NR1, NR2A e NR2B concentram-se nas porções cervicais da medula espinhal, enquanto que as subunidades NR1, NR2C e NR2D concentram-se na medula lombar (BULLER ET AL., 1994 ; PETRALIA ET AL., 1994 a ; b ; KUS E COL., 1995). Considerando os segmentos cervicais da medula espinhal, estudos imunocitoquímicos demonstraram que as subunidades NR1, NR2A e NR2B concentram-se

principalmente nas camadas superficiais do corno dorsal da medula cervical e nos motoneurônios das lâminas IX (KUS E COL., 1995 WANG ET AL., 1995 ; COGGESHALL & CARLTON, 1997).

Apesar da literatura apresentar controvérsias quanto à distribuição dos receptores de NMDA no núcleo espinhal e poucos trabalhos que revelassem as subunidades destes canais nos núcleos trigeminais, alguns estudos utilizando métodos imunocitoquímicos, constataram que, comparavelmente à medula cervical, os núcleos do complexo trigeminal também contêm grandes quantidades de subunidades NR1, NR2A e NR2B. Tanto o núcleo espinhal, quanto os núcleos mesencefálico, motor e principal do trigêmeo são ricos em receptores NMDA. A porção caudal do núcleo espinhal possui a maior concentração destes receptores, sobretudo na zona marginal onde há uma alta densidade de NR1 (PETRALIA ET AL., 1994 a ; b ; DOHRN & BEITZ, 1994).

As camadas gelatinosa e magnocelular do subnúcleo caudal, o subnúcleo interpolar e o subnúcleo oral, possuem quantidades aproximadamente equivalentes de receptores de NMDA, situados, contudo, em neurônios pertencentes a vias diferentes. Identificados pela subunidade NR1 (DOHRN & BEITZ, 1994 ; PETRALIA ET AL., 1994 a), os receptores de NMDA do subnúcleo interpolar são encontrados principalmente no trato trigeminocerebelar e trato trigeminotalâmico. No subnúcleo caudal estes receptores estão envolvidos principalmente no trigeminotalâmico e trigeminoespinhal. Finalmente, foi observado que a expressão da subunidade NR1 dos receptores de NMDA no subnúcleo oral está relacionada principalmente ao trato trigeminoespinhal e, provavelmente, participam do controle e modulação das informações que se dirigem para as porções mais caudais do núcleo espinhal do trigêmeo (DOHRN & BEITZ, 1994). Em suma, esta diferença na densidade dos receptores de NMDA nas vias trigeminocerebelar, trigeminotalâmico, ligadas aos subnúcleos interpolar,

caudal e oral, respectivamente, provavelmente determina uma importância funcional diferente para cada uma destas porções.

I.6. CONSIDERAÇÕES ANATÔMICAS E FUNCIONAIS DO NÚCLEO ESPINHAL DO TRIGÊMEO

A sensibilidade da face e das cavidades bucal e nasal é assegurada essencialmente pelos três ramos do nervo trigêmeo (V). Alguns aferentes somáticos dos nervos facial (VII), glossofaríngeo (IX) e vago (X) participam da inervação de uma pequena região cutânea do pavilhão auricular. As fibras nervosas que enervam a mucosa oral e a região cutânea da face se projetam no complexo sensorial trigeminal do tronco cerebral, que constitui, então, a primeira via de acesso ao sistema nervoso central para as informações somestésicas orofaciais. Os núcleos sensoriais trigeminais se estendem através do tronco cerebral, dos primeiros segmentos cervicais da medula espinhal até o limite caudal do mesencéfalo. No sentido caudo-rostral, este complexo nuclear sensorial é constituído pelo núcleo do trato espinhal, núcleo principal e seus dois satélites: o núcleo supratrigeminal e intertrigeminal e núcleo mesencefálico do trigêmeo (SESSLE, 1987).

A seguinte descrição anatômica focalizará o núcleo espinhal por estar mais diretamente relacionado ao presente trabalho.

O núcleo do trato espinhal é um prolongamento do corno dorsal da medula espinhal, no sentido rostral. Atravessa o bulbo e penetra no terço inferior da Ponte, fazendo limite com a parte caudal do núcleo Principal. Em 1950, foi subdividido por OLSZEWSKI em três porções anatômicas e funcionalmente distintas que, no sentido caudo-rostral, correspondem aos subnúcleos caudal, interpolar e oral.

Estudos eletrofisiológicos, realizados no complexo trigeminal de diferentes espécies de mamíferos, revelaram a existência de neurônios das camadas superficiais e profundas do subnúcleo caudal, e da formação reticular adjacente, que respondem à estimulações nociceptivas dos dentes e dos revestimentos cutâneo e mucoso orofacial (HILL & SALT, 1982 ; AMANO ET AL., 1986 ; HU & SESSLE, 1989 ; KOJIMA, 1990 ; HU, 1990 ; CAHUSAC ET AL., 1990).

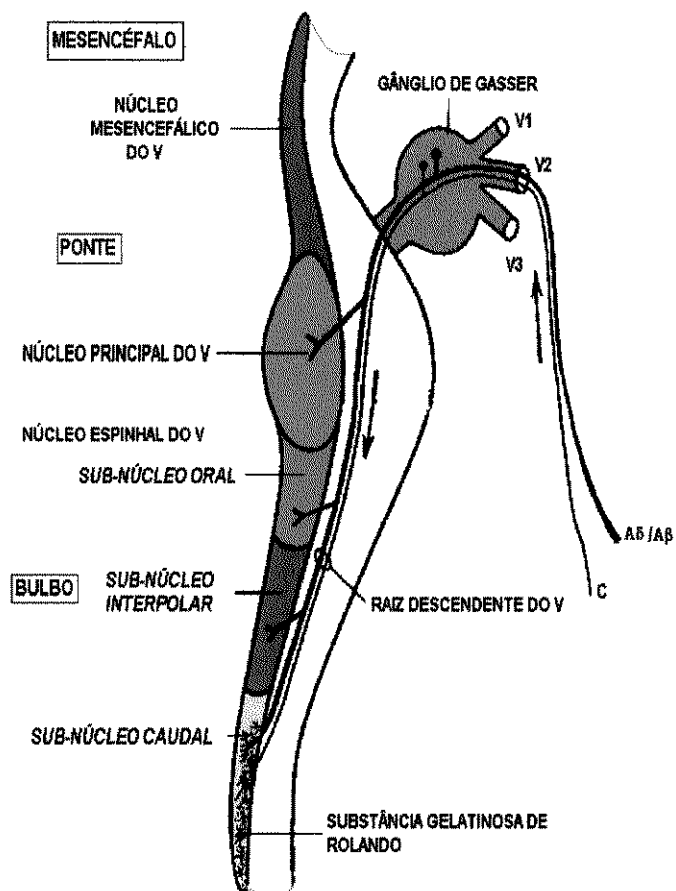


FIGURA 2. Representação esquemática dos núcleos do complexo sensorial do nervo trigêmeo

I.6.1. OS AFERENTES TRIGEMINAIS

O nervo trigêmeo (V) penetra no tronco cerebral na altura da porção medial da Ponte, próximo ao ângulo ventrolateral, através de duas raízes : uma raiz motora (medial) e uma raiz sensitiva (lateral) mais calibrosa.

A raiz sensitiva dirige-se ao núcleo principal e divide-se em dois ramos, um ascendente, formado pelo conjunto de prolongamentos axonais dos neurônios do gânglio trigeminal, que se dirige para o núcleo principal, e um descendente que constitui o trato espinhal do nervo trigêmeo (TET) o qual emite ramificações para o núcleo espinhal do trigêmeo (NET).

O TET é composto por um feixe pouco denso de finas fibras mielínicas (fibras A δ e A β) e de vários grupos de fibras amielínicas (fibras C). O diâmetro das fibras mielínicas varia de 1,0 μ m a 10 μ m. As fibras com mais de 6 μ são raras, sendo que a maioria mede menos que 2 μ m. As fibras amielínicas, são encontradas sobretudo na parte caudal do TET (SESSLE, 1986 ; KOJIMA, 1990 ; HU, 1990). O diâmetro destas últimas varia de 0,1 μ m a 0,7 μ . Fazendo parte do TET, encontra-se também, numerosas fibras de pequeno diâmetro (< 0,5 μ), geradas por corpos celulares nucleares, que na sua maioria, ascende em direção às porções mais rostrais do NET (NASUTION & SHIGENAGA, 1987 ; JACQUIN ET AL., 1990).

I.6.2. O SUBNÚCLEO CAUDAL:

O subnúcleo caudal prolonga-se na direção rostral, sem interrupção, a partir do corno dorsal da medula espinhal e parece apresentar as mesmas características morfofuncionais que este (SESSLE & GREENWOOD, 1976 ; PHELAND & FALLS, 1989). Provavelmente ele fixa seu limite caudal entre os segmentos cervicais C2 e C3 da medula espinal (MARFURT & RAJCHERT, 1991).

O subnúcleo caudal apresenta forma semicircular com uma concavidade medial e faz limite com o subnúcleo reticular dorsal e com a raiz descendente do trigêmeo. Após coloração de Golgi ou Nissl, aparece como uma versão alargada do corno dorsal (BARTES & KILLACKEY, 1985) e apresenta uma laminação em três camadas:

- a parte marginal ou zona marginal : a mais externa
- a parte gelatinosa ou substância gelatinosa
- a parte magnocelular ou núcleo próprio

Esta divisão foi proposta inicialmente por OLZEWSKI (1950) para o homem e observada posteriormente em todos os mamíferos e aves.

A parte marginal está situada entre o TET e a parte correspondente à lâmina I de Rexed descrita para o corno dorsal da medula espinal (BATES & KILLACKEY, 1985).

A parte gelatinosa corresponde a um prolongamento rostral da substância gelatinosa de Rolando, descrita no corno dorsal da medula espinhal. Ela corresponde, segundo os autores, com a camada II, ou com as camadas II e III de Rexed (AMANO ET AL., 1986). Na sua porção dorso-medial, ela apresenta um espessamento em forma de bulbo que se prolonga mais que o resto do subnúcleo. A este nível, é parcialmente laminada de modo que porções de substância gelatinosa podem ser encontradas na parte dorsal do TET, caracterizando assim uma área conhecida como núcleo paratrigeminal ou núcleo intersticial (AMANO ET AL., 1986 ; HU ET AL., 1986 ; PHÉLAND & FALLS, 1989).

A parte magnocelular ou núcleo próprio forma o corpo do subnúcleo. É uma estrutura relativamente homogênea, onde os neurônios das porções mais profundas são os de maior tamanho e os mais isolados. Esta região corresponde, às camadas IV e V de Rexed. Seus limites mediais com a formação reticular

parvocelular são indistinguíveis (HOCKFIELD & GOBEL, 1982 ; PHÉLAND & FALLS, 1989).

A **formação reticular** pode ser evidenciada a partir do nível C1 na medula, ventralmente ao subnúcleo caudal e medialmente à extremidade rostral do núcleo cervical lateral. Neste nível, pode-se observar uma região onde os corpos celulares confundem-se com as fibras nervosas, formando um emaranhado de fibras e corpos celulares. Esta região, contínua às porções ventromediais do subnúcleo (parte magnocelular), corresponde às camadas V e/ou VI de Rexed (PHÉLAND & FALLS, 1989). Vale a pena ressaltar que a parte lateral da camada V de Rexed apresenta, em todos os níveis da medula, um aspecto reticular.

As fibras nociceptivas aferentes A δ e C terminam no subnúcleo caudal. De forma semelhante ao corno dorsal da medula espinhal, as camadas I/II e V/VI do subnúcleo caudal são ricas em fibras nociceptivas que respondem a estímulos orofaciais, muitas das quais projetam-se diretamente ao tálamo posterior (AMANO ET AL., 1986 ; HU ET AL., 1986 ; DAVIS & LODGE, 1987 ; HU & SESSLE, 1989 ; HU 1990 ; CAHUSAC ET AL., 1990 ; DICKENSON & SULLIVAN, 1990).

I.6.3. O SUBNÚCLEO INTERPOLAR:

O subnúcleo interpolar limita-se lateralmente com a raiz descendente do nervo trigêmeo e com a formação reticular parvocelular. Situa-se entre os subnúcleos oral e caudal (FIGURA 2).

Sua junção com o subnúcleo caudal é complexa. A parte ventrolateral do subnúcleo interpolar estende-se mais no sentido caudal que o restante da estrutura, de maneira que os dois subnúcleos se encontram sobre um eixo rostro-caudal. Ele é descrito como a estrutura mais homogênea do complexo sensitivo trigeminal (PHELAN & FALLS, 1989). O subnúcleo interpolar parece participar dos

processos de transmissão da dor orofacial, contudo seu papel nestes processos não foi ainda esclarecido (DALLEL ET AL., 1988 ; 1989 ; YOUNG, 1982 ; BEREITER, 1993).

I.6.4. O SUBNÚCLEO ORAL:

Mais estreito que o núcleo principal, o subnúcleo oral é limitado lateralmente pela raiz descendente do trigêmeo e pela formação reticular parvocelular (FIGURA 2).

Sua porção dorsomedial estende-se até um plano que passa pelo polo caudal do núcleo motor do trigêmeo (FALLS ET AL., 1985). O subnúcleo oral estende-se quase que sobre toda altura do núcleo motor do nervo facial (BATES & KILLACKEY, 1985 ; YOSHIDA ET AL. 1991).

Segundo alguns autores, considerando-se sua citoarquitetura e organização somatotópica, o subnúcleo oral poderia ser considerado uma unidade nervosa funcional individual e única no sistema sensorial trigeminal (BATES & KILLACKEY, 1985 ; FALLS & ALBAN, 1986 ; FALLS, 1988 ; JACQUIM & RHOADES, 1990). Similarmente aos outros subnúcleos do NET, o subnúcleo oral também pode ser distinguido do núcleo principal pela presença de feixes intranucleares, os feixes profundos (deep bundles) que se estendem no sentido longitudinal (FALLS, 1986 ; JACQUIM & RHOADES, 1990 ; JACQUIN ET AL., 1993)

Apesar dos componentes mais rostrais do núcleo do trato espinhal estarem comprovadamente envolvidos nos mecanismos de transmissão dos estímulos nociceptivos, ainda não está bem esclarecido o papel destes subnúcleos na transmissão da dor orofacial (DALLEL ET AL., 1988 ; 1989 ; BEREITER, 1993 ; RABOISSON ET AL., 1991 ; 1995). Não há dados na literatura que esclareçam se os subnúcleos oral e interpolar atuam apenas como uma estrutura de transmissão

nervosa ou se estão envolvidos na modulação e regulação das sensações dolorosas orofaciais.

Os aferentes primários relacionados à nocicepção e que chegam ao subnúcleo oral são originários do tecido mucoso oral, da pele perioral e sobretudo da polpa dentária (JACQUIN ET AL., 1993 ; TORNECK ET AL., 1996). Estes aferentes primários terminam principalmente na zona marginal ou na porção ventrolateral do subnúcleo oral e são, quase totalmente, constituídos de fibras de pequeno diâmetro, na sua maioria mielínicas (KWAN ET AL., 1993 ; JACQUIN ET AL., 1993 ; SHORTLAND ET AL., 1995). Observa-se também uma pequena população de axônios primários amielínicos que penetra diretamente na zona marginal a qual emite ramificações internas, tanto para sua porção ventrolateral, como para sua porção dorsomedial (JACQUIN ET AL., 1993).

O núcleo do trato espinhal é caracterizado pela presença de uma rede neuronal interna. Os neurônios de associação que constituem esta rede, são responsáveis pela comunicação entre os três segmentos, transportando as informações ascendentes e descendentes (HOCKIFIELD & GOBEL, 1982 ; NASUTION & SHIGENAGA, 1987 ; JACQUIN ET AL., 1990). Além de emitir projeções para todas as porções do núcleo espinhal, o subnúcleo oral também emite projeções para o Tálamo, o Cerebelo e núcleo Principal do trigêmeo (JACQUIN ET AL., 1993). Vários trabalhos anatômicos têm demonstrado a existência de interneurônios ascendentes e descendentes no subnúcleo oral, criando um circuito de intercomunicação com os segmentos mais caudais, sobretudo com o subnúcleo caudal (JACQUIN ET AL., 1990 ; JACQUIN & RHOADES, 1990 ; 1993 ; SHORTLAND ET AL., 1995 ;). Apesar de sua existência, pouco se sabe sobre o papel destes interneurônios na organização funcional do núcleo do trato espinhal e, conseqüentemente, sobre as suas implicações na transmissão da

dor orofacial no tronco cerebral. A rede neuronal do subnúcleo oral pode ser esquematizada como na FIGURA3.

I.7. NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DOS NÚCLEOS SENSORIAIS DO TRIGÊMEO

Para ser considerado nociceptivo, um neurônio deve satisfazer os seguintes critérios (MEYER ET AL., 1994 ; RANG ET AL., 1994):

1. Deve responder exclusivamente ou de maneira diferente às estimulações nociceptivas, ou seja, deve discriminar as estimulações nociceptivas das outras estimulações.
2. Deve ser capaz de transmitir as informações para os centros superiores, seja diretamente ou por vias polissinápticas.
3. Todas as manipulações que promovem um aumento ou redução das respostas destes neurônios às estimulações nociceptivas devem poder estar relacionadas às manifestações comportamentais ou clínicas de hipo ou hiperalgisia. Este último critério refere-se aos mecanismos de controle nas transferências de informações no tronco cerebral.

Similarmente ao corno dorsal da medula espinhal, os resultados de inúmeros trabalhos não deixam dúvida quanto a legitimidade da participação de duas categorias de neurônios na transmissão das informações nociceptivas no núcleo espinhal do trigêmeo, sobretudo no subnúcleo caudal: são os neurônios nociceptivos específicos (NE) e os neurônios nociceptivos não-específicos (WDR-*wide dynamic range*), (SESSLE 1987).

I.7.1. NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS ESPECÍFICOS (NE)

Os neurônios nociceptivos específicos são ativados exclusivamente por estimulações mecânicas ou térmicas intensas que excitam as fibras A δ e/ou C. A classificação de BURGESS & PERL (1973) distingue as fibras mielínicas de grande diâmetro (A α,β com velocidade de condução = 30-100m/s), das de pequeno diâmetro (A δ com velocidade de condução = 4-30m/s) e as fibras amielínicas (C com velocidade de condução = 0,4-2 m/s).

As características de suas descargas, as dimensões reduzidas de seus campos receptivos e sua distribuição central organizada de modo somatotópico, lhes conferem a capacidade de transmissão das informações nociceptivas com características espaço-temporais bem precisas. Devido sua especificidade de ativação, supõe-se que estes neurônios estejam implicados na discriminação dos estímulos de alta intensidade. Estes neurônios se projetam intensamente para centros superiores (tálamo), principalmente pela via trigeminotalâmica (DALLEL ET COL., 1990 ; CRAIG, 1995)

I.7.2. NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS NÃO-ESPECÍFICOS (WDR)

A população de neurônios nociceptivos não-específicos constitui uma das maiores do corno dorsal da medula espinal, do subnúcleo caudal e também do subnúcleo oral do complexo sensorial trigeminal (DALLEL ET AL., 1990 ; KOJIMA, 1990 ; HU, 1990).

A primeira característica que permite reconhecer estes neurônios é a capacidade de serem ativados por estímulos mecânicos não-nociceptivos e nociceptivos tais como tato, pressão ou pinçamento. Aparentemente suas respostas resultam da ativação de uma série de mecanoreceptores, que podem ser

mecanorreceptores de baixo limiar associados a fibras mielínicas de grande ($A\alpha,\beta$) ou de pequeno ($A\delta$) diâmetro, ou mesmo a fibras amielínicas (C), e parte por mecanorreceptores de alto limiar acoplado a fibras do tipo $A\delta$ e C (YOKOTA & NISHIKAWA., 1979 ; WOOLF & KING, 1989 ; WILLIS & COGGESHALL, 1991 ; GRAIG, 1994). Aumentando-se a intensidade da estimulação mecânica estes neurônios aumentam a frequência e a duração de suas descargas (GRAIG, 1994). Por este motivo são chamados de « neurônios de larga faixa de atividade » (wide dynamic range neurones). São igualmente designados como neurônios convergentes ou de convergência, polimodais, multimodais ou multirreceptivos.

Tais neurônios apresentam campos receptivos cutâneos geralmente maiores que os dos neurônios nociceptivos específicos, e com organização somatotópica similar (YOKOTA & NISHIKAWA, 1979 ; WILLIS & COGGESHALL, 1991). É comum existir um gradiente de sensibilidade entre o centro e a periferia : a região central é normalmente ativada por estímulos de baixa e alta intensidade, ao passo que a região periférica, apenas por estimulações nociceptivas. A maior parte destes neurônios possui campos inibitórios adjacentes ao campo receptivo excitatório ou próximo deste, que é ativado, mais frequentemente, por neurônios não-nociceptivos (GUIRIMAND & LE BARS, 1996).

A aplicação de estimulações elétricas de intensidades crescentes nos campos receptivos de neurônios nociceptivo não-específico ou no nervo cutâneo associado, desencadeia sucessivas respostas correspondentes aos tipos de fibras aferentes primárias estimuladas (fenômeno de convergência). Inicialmente observa-se uma resposta relativa à ativação de fibras $A\alpha$, seguida as fibras $A\delta$ (respostas de latência curta) e finalmente as fibras C (respostas de longa latência e longa duração).

A exemplo da medula espinhal, este tipo de neurônio nociceptivo é frequentemente encontrado nas camadas mais profundas do subnúcleo caudal,

correspondentes à região magnocelular e à formação reticular adjacente, podendo ocasionalmente ser identificado nas camadas mais superficiais (SESSLE ET AL. 1986 e DICKENSON & SULLIVAN, 1990).

1.8. OS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL.

Os neurônios nociceptivos do subnúcleo oral possuem as mesmas propriedades eletrofisiológicas gerais já descritas na literatura nos neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal e do corno dorsal da medula espinhal (DAVIES & LODGE, 1987 ; DALLEL ET AL., 1990 ; KOJIMA, 1990 ; HAMBAL ET AL., 1992).

Os campos receptivos excitatórios dos neurônios nociceptivos do subnúcleo oral estendem-se, quase na totalidade dos casos, ipsilateralmente ao local do registro. Segundo DALLEL ET AL., (1990), 64% dos neurônios nociceptivos não-específicos (WDR) e 80% dos neurônios nociceptivos específicos (NE) possuem campos receptivos associados a um só ramo do trigêmeo. A porcentagem mais elevada da quantidade nos neurônios WDR que possuem seus campos receptivos ligados a dois ou três ramos do trigêmeo, se deve ao fato da superfície dos campos receptores destes neurônios serem geralmente maiores que dos neurônios tipo NE.

A análise da distribuição topográfica dos campos receptivos dos neurônios nociceptivos encontrados no subnúcleo oral demonstra que a maior parte destes está localizada estritamente no interior das regiões intraoral e perioral. O subnúcleo oral é um sítio de projeções privilegiado por aferentes nociceptivos e não-nociceptivos provenientes especialmente das cavidades bucal e nasal (KWAN ET AL., 1992; JACQUIN ET AL., 1993). Com relação aos neurônios nociceptivos, tanto os do tipo NE como do tipo WDR, apresentam campos receptivos localizados na região intraoral (35%), na região perioral (27%), e apenas 4% na

região facial, segundo critérios adotados por DALLEL ET AL. (1990). Os neurônios do subnúcleo oral também estão organizados topograficamente. O campo receptivo intraoral é representado por fibras nervosas encontradas na porção dorsomedial do subnúcleo, ao passo que o campo receptivo perioral está mais representado mais na porção ventrolateral (DALLEL ET AL., 1990 ; JACQUIN ET AL., 1993).

Apesar da comprovada existência de neurônios nociceptivos no subnúcleo oral do núcleo do trato espinhal, ainda não se conhece o papel destes neurônios na modulação e controle das informações nociceptivas oriundas dos tecidos orais e periorais.

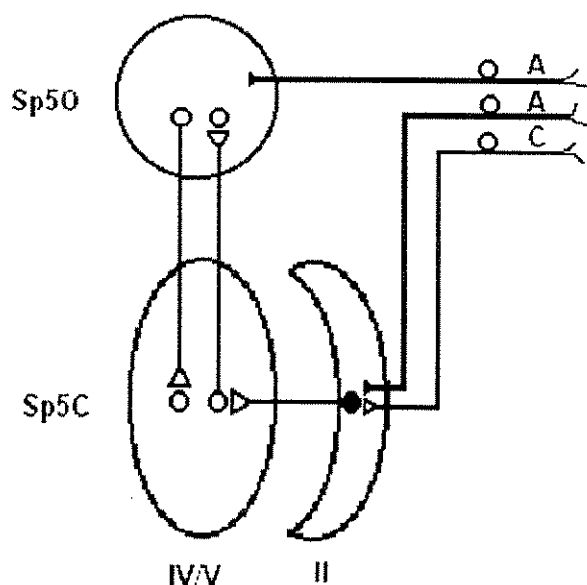


FIGURA.3 Modelo das prováveis conexões neurais entre o subnúcleo oral (Sp5O) e o subnúcleo caudal (Sp5C). Fibras A δ e A β chegam ao Sp5O e na camada II do Sp5C, chegam tanto as fibras mielínicas A como as fibras amielínicas C. Neurônios de associação asseguram a comunicação entre as camadas II e IV/V do Sp5C e entre os dois subnúcleos. Os receptores de NMDA são encontrados em alta densidade nos neurônios da camada II (gelatinosa) (preto), nos neurônios do Sp5O relacionados à via trigêminoespinal e nos neurônios das camadas V e IV do Sp5C, são encontrados receptores de NMDA, porém com uma densidade menor que na camada II do Sp5C (cinza). Nos demais neurônios do Sp5O parece pouco provável a existência de receptores de NMDA (branco). Os mecanismos implicados na intercomunicação entre Sp5O e Sp5C ainda são desconhecidos.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Investigar a existência do fenômeno do wind-up nos neurônios nociceptivos convergentes do subnúcleo oral do núcleo espinhal do trigêmeo.
2. Caracterizar por meios eletrofisiológicos as respostas associadas às fibras C dos neurônios do subnúcleo oral (resposta basal, wind-up e pós-descarga).
3. Analisar o papel dos receptores de N-metil-D-aspartato na ocorrência do wind-up nos neurônios do subnúcleo oral.
4. Estudar os mecanismos de controle das respostas nociceptivas dependentes dos receptores de N-metil-D-aspartato que ocorrem no subnúcleo oral.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em 60 ratos *Sprague-Dawley* pesando entre 250 e 300gr. O limite de peso foi escolhido em função da utilização das coordenadas estereotáticas especificadas no atlas de Paxinos e Watson (1986).

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola), contendo palha macia, armazenados em armários apropriados, com controle de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade, ventilação com ar filtrado e ciclo de luz de 12/12 horas. As gaiolas eram trocadas semanalmente e os animais tinham livre acesso à água e alimentação.

III.2. ANESTESIA E CONTROLE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Todos os procedimentos cirúrgicos no animais foram realizados sob efeito de anestesia geral, induzida com uma mistura de $\text{O}_2\text{-N}_2\text{O}$ (1/3-2/3) e halotano (2%). Após anestesiado, o animal foi submetido a uma tricotomia da região ventral do pescoço e da parte superior da cabeça. Após a injeção intraperitoneal de 100 μg de sulfato de atropina, aplicada para diminuir a secreção e facilitar os procedimentos cirúrgicos, realizou-se traqueotomia e flebotomia, para inserção de uma cânula na traquéia e uma outra na veia jugular do animal. Os animais foram paralisados pela perfusão constante de 0,6mg/h de pancurônio bromida (PAVILON) através de uma bomba adaptada à cânula introduzida na jugular. Uma vez paralisados (curarizados), a respiração dos animais foi mantida por um sistema de

ventilação artificial volume-controlado (54-55 respirações por minuto). Os níveis de halotano, O_2 , N_2O e CO_2 (3,5-4,5%) foram monitorizados por um aparelho monitor de gás com absorção infravermelha (ARTEMA MM200) durante todo o período experimental. Após os procedimentos cirúrgicos, descritos adiante, o nível de halotano foi mantido a 0,5% durante todo o período de registro eletrofisiológico. Esta porcentagem anestésica mantém os critérios éticos da experimentação animal sem deprimir as respostas neuronais no tronco cerebral aos estímulos nociceptivos (BENOIST E COLL., 1984 e LE BARS E COLL., 1980).

A temperatura dos animais foram mantidas entre 36 e 38°C, durante toda experimentação, por meio de uma almofada térmica, sobre a qual o animal era posicionado. O controle da temperatura era realizado automaticamente através de um termômetro introduzido no reto do animal e ligado a um relé termostático que controlava a temperatura da almofada.

III.4. REGISTRO DA ATIVIDADE ELETROFISIOLÓGICA DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL.

A atividade eletrofisiológica dos neurônios do subnúcleo oral (Sp5O) foi observada através de registros extracelulares unitários, empregando-se microeletrodos de vidro (7-10 Ω) preenchidos com solução de NaCl (5%) contendo o corante "pontamina sky-blue". A presença do corante na solução do microeletrodo teve a finalidade de, ao final do experimento, marcar a região da célula registrada. Para a introdução do microeletrodo, realizou-se primeiramente a craniotomia do animal, tomando-se como referência as coordenadas estereotáticas da região de interesse, no tronco cerebral. A seguir fez-se a remoção das meninges e passou-se à introdução do microeletrodo, utilizando-se

um micromanipulador eletrônico. A velocidade de introdução do microeletrodo durante a exploração do subnúcleo foi de 1 a 0,2mm/min. O tronco cerebral foi explorado de 2,4 a 3,0 mm lateralmente à linha média e entre os planos frontais P-1,1 e P-2,6 os quais correspondem, segundo PAXINOS & WATSON (1986), ao subnúcleo oral do rato. A atividade elétrica de uma única célula foi amplificada e a seguir filtrada, respectivamente por um amplificador e um filtro ligados em série. Esta atividade corresponde à variação do potencial elétrico, foi observada em um osciloscópio analógico o qual estava conectado a um seletor de faixa de voltagem. Com isso, possibilitou ao experimentador selecionar a faixa de diferença-de-potenciais (ddp) que correspondia exclusivamente à atividade neuronal (FIGURA 4). Após este procedimento, chamado de integração do sinal, o número de potenciais elétricos emitidos pelo neurônio era transformado em valores digitais por uma interface analógico-digital (*CED 1401- CAMBRIDGE ELECTRONIC DESIGN*). A integração do sinal garante também que apenas os potenciais-de-ação (PA) disparados por uma única célula sejam analisadas em um sistema computadorizado de discriminação de sinais (FIGURA 4). Os sinais disparados pela estimulação neuronal foram agrupados em um histograma pós-estímulo (PSH) que relaciona a somatória dos PA disparados durante uma série de estimulações com o tempo de latência destas respostas, no intervalo de 0 a 1500 milisegundos. O PSH considera como unidade o PA que atinge a faixa de voltagem (mV) estabelecida durante a integração do sinal. Esta faixa de voltagem era estabelecida pelo experimentador e dependeu da d.d.p. dos emitidos pelos neurônios. Em todas as respostas celulares a integração dos sinais foram realizadas acima das d.d.p. emitidas pela atividade elétrica basal, considerada como um ruído do sistema (FIGURA 4).

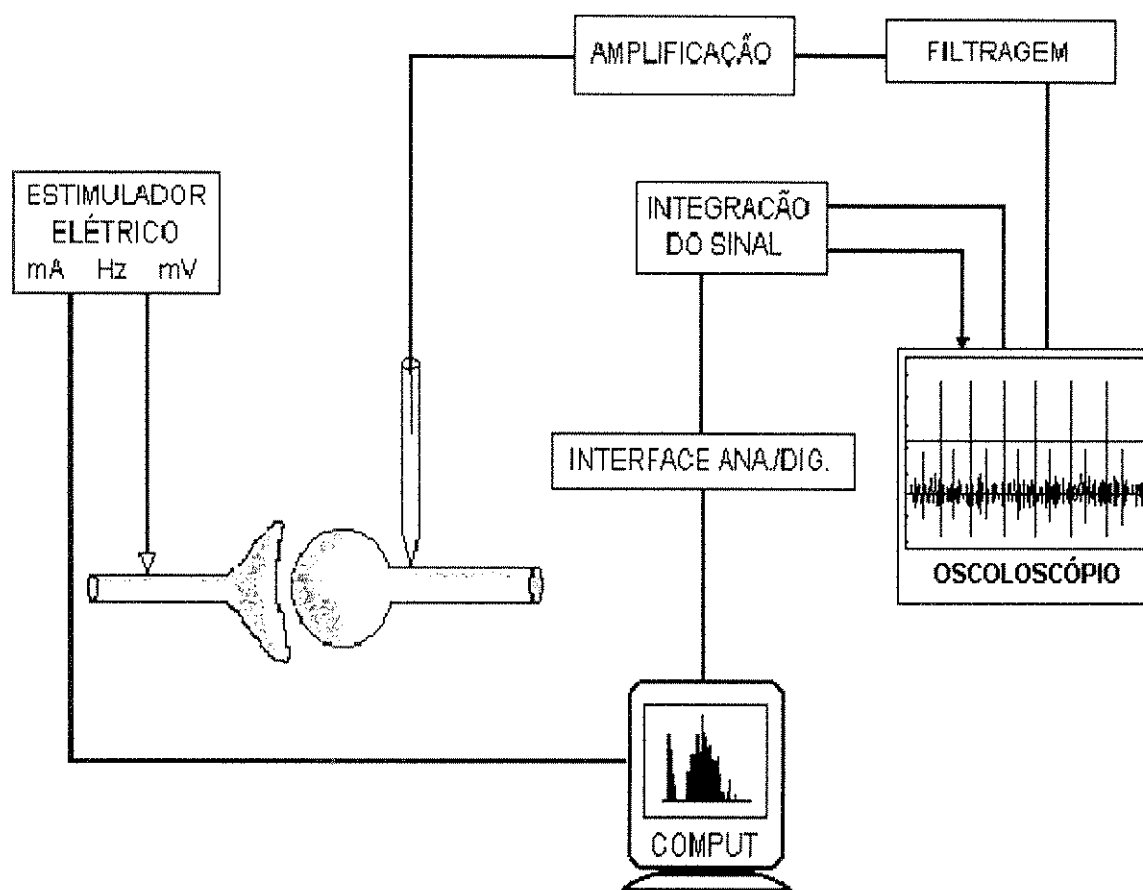


FIGURA 4. Esquema da rede de equipamentos eletrofisiológicos utilizados para estimulação e registro das respostas neuronais unicelulares emitidas. Os sinais elétricos registrados no osciloscópio foram selecionados a partir de uma faixa alta de voltagem (cor cinza) evitando assim que o ruído do sistema ou que os PA de mais de uma célula fossem registrados.

III.5. CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS CONVERGENTES DO SUBNÚCLEO ORAL.

Este estudo foi realizado em neurônios convergentes com características eletrofisiológicas homogêneas, e que apresentavam o fenômeno de wind-up, segundo critérios descritos para as células nociceptivas convergentes do corno dorsal da medula (veja DAVIES & LODGES, 1987 e DICKENSON & SULLIVAN, 1990), sendo considerados apenas os registros unitários (DALLEL ET AL., 1990). Os neurônios foram classificados em convergentes com base em suas respostas às estimulações mecânicas e elétricas percutâneas aplicadas em seus campos periféricos (veja capítulo I). Ainda para caracterizar os neurônios nociceptivos convergentes, também foi testada sistematicamente, a susceptibilidade das respostas celulares ao “Controle Inibitório Nociceptivo Difuso” (DNIC - LE BARS ET AL., 1979). Assim, obedecendo tais critérios, todos os neurônios utilizados nas experimentações responderam gradativamente tanto a estímulos inócuos como a estímulos nociceptivos mecânicos.

As respostas induzidas por estimulações elétricas apresentavam latências correspondentes a fibras A e fibras C. Os estímulos inócuos aplicados na pele perioral ou mucosa oral foram jatos de ar, pinceladas macias, toques brandos e pressões leves com uma sonda rombuda. Os estímulos nociceptivos consistiram de pressões fortes com sonda fina (filamentos de Von Frey), toques vigorosos com instrumento contundente e pinçamento com fórceps fino. Após a identificação de um neurônio, a extensão de seu campo receptivo foi mapeada e o envolvimento de uma ou mais divisões dos ramos do trigêmeo foi determinado de acordo com as localizações dos campos receptivos intra-orais, periorais ou faciais previamente determinada por DALLEL ET AL. (1990).

Estímulos elétricos em forma de ondas retangulares com duração de 2ms. foram aplicados através de um par de eletrodos de aço inoxidável inseridos na camada subcutânea do centro do campo receptivo previamente delimitado. Os limiares de respostas das fibras A e C foram determinados a partir da intensidade mínima de corrente elétrica capaz de emitir, no mínimo, um PA a cada estimulação. As fibras A e C foram diferenciadas através das latências dos PA disparados pelas mesmas e das suas velocidades de condução, segundo a classificação de BURGESS E PERL (1973). Para o cálculo das latências considerou-se, além das velocidades de condução das fibras, o tempo de 1 ms. de retardo para cada sinapse central e uma distância de 40 a 50 mm entre os campos periféricos e o subnúcleo oral. Com base considerou-se as respostas com latências menores que 2 ms. eram conduzidas por fibras A β e entre 5 e 15 ms. pelas fibras A δ . As respostas transmitidas por fibras C teriam latências maiores que 30 ms. Na maioria dos protocolos utilizados no presente trabalho, foram aplicados estímulos elétricos com intensidade igual a 3 vezes o limiar da fibra C posta em jogo. Em um único protocolo foi também aplicado estímulos que correspondiam a 3 vezes o limiar da fibra A δ .

III.6. DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- (+)-5-metil-10,11-di-hidro-5H-dibenzo[a,b]ciclo-heptano-5,10-imina [(+)-MK-801, nome comercial: Dizocilpina maleato)], um antagonista não-competitivo de receptores de NMDA, fornecida pela RESEARCH BIOCHEMICALS INCORPORATED (RBI - 9, Erie Drive Natick, Massachusetts - U.S.A) com o

objetivo de estudar o grau de participação destes receptores nas respostas emitidas pelos neurônios do subnúcleo oral.

- Enantiômero do MK-801, um isômero óptico do (+)MK-801 hidrogênio maleato o qual não é reconhecido pelo sítio dos anestésicos dissociativos onde se liga a forma ativa do MK-801 .

- carboxilato de cis-4-fosfonometil-2-piperidina (CGS 19755), um antagonista competitivo de receptores de NMDA, fornecido pela RESEARCH BIOCHEMICALS INCORPORATED (RBI - 9, Erie Drive Natick, Massachusetts - U.S.A).

III.7. PREPARAÇÕES EXPERIMENTAIS

Os registros eletrofisiológicos foram realizados apenas nos neurônios convergentes do Sp5O. Porém os antagonistas de receptor de NMDA foram administrados por três vias distintas em três preparações experimentais realizadas (FIGURA 5).

i). Injeção sistêmica de MK-801: Nesta preparação experimental a droga foi administrada na veia jugular previamente canulada.

ii). Injeção intranuclear (subnúcleo oral) de MK-801: Nesta preparação experimental a craniotomia, normalmente realizada para a introdução do microeletrodo, foi estendida no sentido caudal para a introdução também de uma micropipeta de 60µm de diâmetro. Esta micropipeta foi fixada a uma torre estereotática e acoplada a uma seringa de 1,0µl (tipo HAMILTON). Introduziu-se a micropipeta no tecido nervoso, entre a porção marginal do Sp5O e o trato

espinhal do trigêmeo, seguindo-se os parâmetros estipulados por PAXINOS & WATSON (1986). Foi observada uma inclinação de 20^0 entre a micropipeta e o plano sagital com para facilitar a introdução do microeletrodo.

iii). Injeção intranuclear (subnúcleo caudal) de MK-801 e CGS19755:

Para o acesso ao subnúcleo caudal (Sp5C) foi necessária a exposição da medula oblonga. Para isso, um procedimento cirúrgico foi realizado. Após a adaptação do animal no aparelho estereotáxico, realizou-se uma incisão na pele (sagital e mediana) das regiões occipital e posterior do pescoço. A seguir, os músculos superficiais foram seccionados (elevador da orelha e platisma) e os músculos profundos (esplênio, semi-espinhal e trapézio) afastados para a exposição da membrana atlanto-ocipital e do tronco cerebral (óbex e peri-obex). O sítio de injeção correspondente à região central do Sp5C localiza-se 2,0 mm abaixo da região do óbex, 1,5 a 2,0 mm medialmente à borda direita do bulbo e a 1mm de profundidade. Uma micropipeta de 60 μ l de diâmetro, fixada a uma torre estereotáxica e acoplada a uma seringa de 1,0 μ l (tipo HAMILTON), foi introduzida no sítio de injeção, a qual foi realizada lentamente, durante um período de 5 minutos, com auxílio de um aparelho microinjeter.

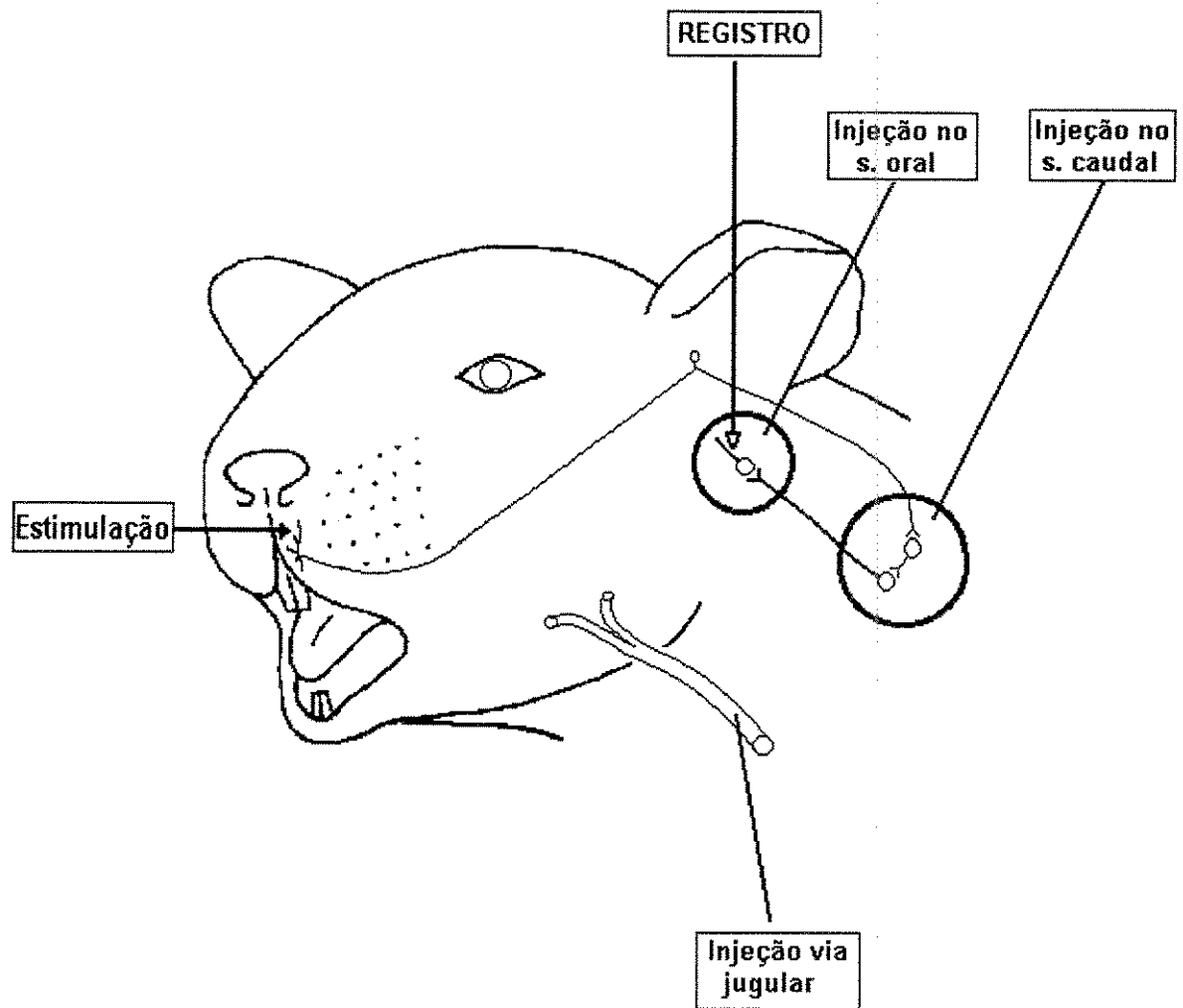


FIGURA 5. Esquema mostrando as três preparações experimentais nas quais o registro da atividade eletrofisiológica de neurônios convergentes do subnúcleo oral foi realizado: i.) administração da droga via jugular. ii.) injeção intranuclear da droga no subnúcleo oral e iii) injeção intranuclear de droga no subnúcleo caudal.

III.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Em cada experimento apenas uma célula do Sp5O foi testada e apenas uma única dose administrada em cada animal.

Para cada célula estudada foram aplicadas séries de estimulações em condições fisiológicas normais a fim de que as respostas emitidas fossem utilizadas como controle. A média de duas respostas celulares emitidas em condições fisiológicas normais foi o controle utilizado para o tratamento realizado nas próprias células. As respostas consideradas controle corresponderam às somatórias dos PA agrupados em um histograma (PSH), após duas sequências de estimulações separadas por um intervalo de 5 minutos. Foram considerados apenas as médias de dois controles sucessivos cuja variabilidade foi menor que 10%. Este controle foi adotado para garantir que os ensaios fossem realizados sob condições de resposta neuronal estável.

Todas as estimulações elétricas efetuadas para observação das respostas das fibras C foram em forma de ondas retangulares com duração de 2ms e intensidade três vezes o limiar de resposta deste tipo de fibra. O limiar de intensidade foi considerado a menor intensidade de estimulação elétrica em milivolts, capaz de disparar, no mínimo, um PA com latência constante a cada estimulação, durante cinco estimulações seguidas. As latências das respostas foram observadas em osciloscópio analógico.

Estas estimulações são consideradas suficientes para desencadear uma resposta intensa e estável do neurônio. Contudo, tais respostas foram observadas apenas em fibras de longa latência ou seja, fibras C, e dificilmente em fibras de latência curta (fibras A δ e A β) em decorrência da interposição do artefato de estimulação nas respostas de curta latência (menor que 15ms). Assim, com este

grau de estimulação apenas as respostas emitidas pelas fibras C foram consideradas.

III.8.1. EFEITO DE DOSES CUMULATIVAS DE MK-801 NAS RESPOSTAS DOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL.

O objetivo deste experimento foi determinar a melhor relação dose/efeito do MK-801, que pudesse caracterizar a participação dos receptores de NMDA nas respostas nociceptivas dos neurônios convergentes do Sp5O.

Para isso, aplicou-se nos campos receptores dos neurônios, uma seqüência de 20 estímulos elétricos a uma frequência de 0,2 Hz, seguida após 5 minutos de intervalo, de outra seqüência de 50 choques elétricos a uma frequência de 0,66 Hz. Neste experimento analisaram-se as respostas neuronais emitidas entre as latências de 30 a 300ms, 10 minutos após a injeção de NaCl ou das diferentes doses de MK-801.

Após duas seqüências de respostas favoráveis (respostas-controle adotada neste trabalho), foi administrada, através da veia jugular canulada, solução fisiológica de NaCl (1ml/kg de peso) e o PSH registrado após 10 minutos. Imediatamente seguido do registro do PSH após a injeção de salina, iniciou-se a administração das doses cumulativas de 0,05 ; 0,15 ; 0,45 e 1 mg/kg i.v. de MK-801. Os registros dos efeitos cumulativos de MK-801 foram realizados 10 minutos após cada administração das doses, as quais eram realizadas imediatamente após o término das estimulações (20 choques a 0,2 Hz e 50 choques a 0,66Hz).

A solução de MK-801 utilizada foi de 1mg/ml. As doses foram considerada cumulativas pelo fato do MK-801 permanecer ligado ao seu sítio de ação por mais de 30 minutos e por não haver um antagonista para esta droga que pudesse ser

utilizado. Para verificar se houve diferenças nas respostas dos neurônios após a dose resultante das quatro injeções cumulativa e uma dose única da mesma concentração final, em 4 células isoladas foi administrado 1mg/kg de MK-801.

NaCl		0,05	0,10	0,30	0,55 mg/kg	
↓		↓	↓	↓	↓	
E	E	E	E	E	E	E
	0	10	20	30	40	50 min

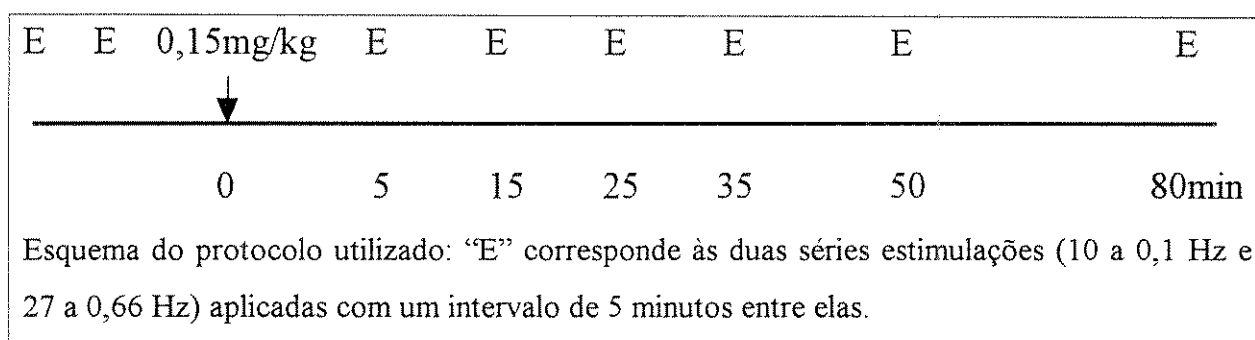
Esquema do protocolo utilizado: “E” corresponde às duas séries de estimulações (20 a 0,2 Hz e 50 a 0,66 Hz) aplicadas com um intervalo de 5 minutos entre elas. As doses administradas foram cumulativas, assim sendo a dose subsequente soma a dose anterior.

III.8.2. CARACTERIZAÇÃO DO WIND-UP NOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL

O segundo experimento teve como objetivo caracterizar o wind-up dos neurônios do Sp5O e o papel dos receptores de NMDA nestas células. Para isso, o efeito do MK-801 foi analisado nos três componentes das respostas emitidas da fibra C (resposta inicial, resposta principal e pós-descarga), após séries de estimulações elétricas a 0,66 Hz e 0,1 Hz. As estimulações a uma frequência inferior a 0,3 Hz são consideradas insuficientes para provocar o fenômeno do wind-up (JEFTINIJA ET AL., 1994 ; HAMBAL ET AL., 1992), logo a estimulação a 0,1 Hz foi utilizada para verificar a resposta basal das fibras C. A resposta inicial é, por definição, o número de PA emitidos pela primeira estimulação. A resposta principal foi considerada o PSH emitido entre as latências de 30 e 150 ms e a pós-descarga, o PSH emitido entre as latências de 150 a 1500ms. O wind-up foi calculado pelo método proposto por CHAPMAN & DICKENSON (1992) e explicado adiante. A dose de MK-801 foi determinada a partir da curva dose-resposta

realizada no experimento anterior, dando-se preferência à menor dose capaz de produzir um efeito inibitório significativo em relação ao controle.

Previamente à injeção de MK-801, foram realizados os controles nas duas frequências de estimulação, aplicando-se para isso séries de 10 estimulações a 0,1 Hz e de 27 estimulações a 0,66 Hz. Posteriormente ao registro das respostas-controle, foram injetados 0,15 mg/kg i.v. de MK-801. As respostas às estimulações tanto a 0,1 Hz como a 0,66 Hz foram observadas nos períodos de 5, 15, 25, 35, 50 e 80 minutos após a injeção.



III.8.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANUCLEAR DE MK-801 NO WIND-UP DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL

Administração de antagonistas de NMDA no subnúcleo caudal:

Este protocolo experimental teve como objetivo verificar a participação dos receptores de NMDA dos neurônios do Sp5C no wind-up observado nos neurônios do Sp5O. Para isso foram realizadas injeções intranucleares de MK-801 ou CGS 19755 ou o enantiômero de MK-801 no Sp5C e o seu efeito verificado nas resposta dos neurônios do Sp5O.

Foram aplicadas as seguintes doses:

MK-801: 0,5 e 0,25 microgramas diluídos respectivamente em 0,5 e 0,25 µl de solução fisiológica.

Enantiômero de MK-801: 0,5 microgramas diluídos em 0,5 µl de solução fisiológica.

CGS19755: 5 microgramas diluídos em 0,5 µl. Preparado com uma solução 1,0% de NaHCO₃.

A resposta dos neurônios do subnúcleo oral foi observada após a aplicação de 30 estimulações elétricas numa frequência de 0,66 Hz, nos campos receptores excitatórios dos neurônios.

Após as respostas-controle dos neurônios, foi injetado 0,5 µg de MK-801 no subnúcleo caudal de 14 animais e o seu efeito sobre as respostas desencadeadas pelas estimulações elétricas foram verificadas nos tempos de 5, 10, 25 e 60 minutos após a administração da droga. O efeito da injeção intranuclear de 0,25 µg de MK-801 sobre as respostas desencadeadas pelas estimulações elétricas foi verificado nos tempos de 5, 10 e 25 minutos após injeção. O efeito da injeção no Sp5C de 0,5 µg de enantiômero de MK-801 e 5µg de CGS19755, sobre as respostas dos neurônios do Sp5O, foi observado em 10 animais, mantendo-se o mesmo protocolo utilizado para a análise do efeito do MK-801.

A resposta inicial e o wind-up das respostas com latências entre 30 e 150 ms., foram calculados segundo o método proposto por CHAPMAN & DICKENSON (1992).

Administração de antagonista de NMDA no subnúcleo oral:

O efeito da injeção de 5µg de MK-801 (volume = 5µl) no Sp5O, sobre o wind-up desencadeado por 30 estimulações elétricas a 0,66 Hz, foi verificado nos tempos de 5, 10, 25 e 60 minutos, em 9 animais.

III.9. CÁLCULO DO WIND-UP

O cálculo do wind-up foi realizado segundo o método proposto por CHAPMAN & DICKENSON (1992). Para isto considerou-se a somatória do número de PA emitidos pelo neurônio após uma série de estimulações e a resposta basal do neurônio. O cálculo da resposta basal consiste no número de PA, fornecido pelo PSH, em resposta à primeira estimulação multiplicado pelo número total de estímulos. O PSH e o número de PA disparados pela primeira estimulação são fornecidos por um programa de discriminação de sinais. Wind-up foi calculado pela diferença entre o PSH e a correspondente resposta basal (FIGURA 6).

Apesar da visualização gráfica ser evidente, o cálculo do fenômeno do wind-up apresenta alguns problemas quanto sua quantificação. Vários autores têm observado que, nos modelos de estudo do wind-up, a variabilidade da primeira resposta emitida pelos neurônios é muito grande e por esse motivo, dificulta, ou mesmo inviabiliza uma análise estatística adequada (DAVIES & LODGE, 1987; DICKENSON & SULLIVAN, 1989; SULLIVAN ET AL., 1992; HAMBAL ET AL., 1992; CHAPMAN & DICKENSON, 1994; XU ET AL., 1995). Neste trabalho apesar de ter-se optado pelo método descrito por CHAPMAN & DICKENSON (1992), são propostas algumas considerações a respeito do wind-up e seu cálculo. Vale lembrar que, por definição, o wind-up (W) é o aumento consecutivo do número de potenciais-de-ação (PA) a cada estimulação (E). Sendo assim, a rigor, seu valor deveria ser expresso pela equação $W = d \text{ PA} / d E$, a qual representa a variação do número de PA por estimulação em função da estimulação (FIGURA 6). Deste modo, se a variação do número de PA em função de E for uma curva logarítmica, tipo $\text{PA} = a \ln E + b$, o coeficiente linear da equação será equivalente ao número de PA emitidos após a primeira estimulação e o wind-up poderá ser expresso por $W = a / E$ (FIGURA 6).

Assim sendo, o cálculo proposto por CHAPMAN & DICKENSON (1992) pode fornecer valores proporcionais à variação do wind-up de um neurônio sempre que o tratamento utilizado no estudo da resposta neuronal, varie apenas o coeficiente angular da função $\text{PA} = a \ln E + b$.

III.10. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Cada sítio de registro celular foi marcado por deposição iontoforética de *pontamina sky blue*, um corante de cor azul. Os sítios de microinjeção no subnúcleo caudal e oral foram marcados pela injeção de uma solução fisiológica contendo 20% de *pontamina sky blue*. A injeção foi feita através de um dos capilares da mesma micropipeta dupla introduzida no Sp5O ou Sp5C utilizada para as injeções intranucleares de antagonistas de NMDA. A análise histológica utilizada neste trabalho não permitiu avaliar o grau de difusão das drogas no tecido nervoso.

No final do experimento, os animais foram sacrificados e os cérebros foram removidos e fixados em solução de formalina 10% durante uma semana. Após fixação, os cérebros foram congelados, cortados serialmente em seções de 100 micrômetros e os cortes, corados com vermelho-neutro. Os sítios de registros e injeções foram observados ao microscópio de luz e suas localizações foram mapeadas.

III.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Apenas valores absolutos da somatória dos PA a cada série de estimulações foram usados para análises estatísticas. As médias individuais da porcentagem do controle foram usadas com propósitos descritivos e ilustrativos. Após o teste de normalidade de distribuição, os resultados foram submetidos ao teste da análise da variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas (*Student-Newman-Keuls*). O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

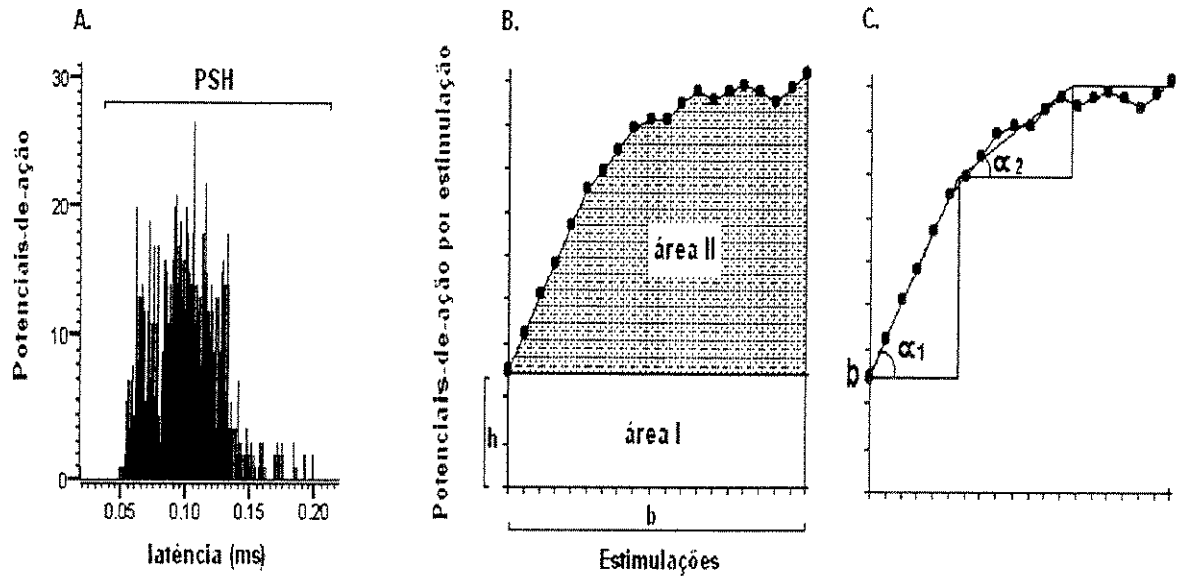


FIGURA 6. A. Exemplo de PSH fornecido por um programa de análise de sinais que relaciona o número total de potenciais-de-ação ocorridos entre as latências de 50 a 200 ms. (fibras C). A representação gráfica do número de potenciais-de-ação/estimulação ao longo das estimulação, da resposta emitida pelo neurônio da figura A, estão representados nas figuras B e C. **B.** Esquema do cálculo do wind-up proposto por Chapman & Dickenson (1992). A soma das áreas I e II corresponde ao PSH da figA. A área I é calculada pela resposta desencadeada após a primeira estimulação (h) e pelo número total de estimulações (b). Wind-up (área II) corresponde à diferença do PSH e a área I. **C.** Considerando que a variação do número de P.A. em função da estimulação (E), seja representada por uma curva logarítmica, tipo $PA = a \ln E + b$, o wind-up (W) pode ser expresso por $W = a / E$.

IV. RESULTADOS

Um total de 60 neurônios convergentes foram registradas no subnúcleo oral (Sp5O). Os 55 neurônios que puderam ser localizados histologicamente foram encontrados na metade ventral do subnúcleo, próximos à borda medial, entre os planos frontais P 1,5 e P 2,1 (FIGURA 9). Todos os neurônios possuíam um campo receptivo que envolvia um (n=44) ou dois (n=16) ramos do nervo trigêmeo localizado, principalmente, na região oral ou perioral. Todas as células responderam com um aumento do número de potenciais-de-ação (PA) ao aumento da intensidade das estimulações mecânicas, ou seja, todos os neurônios discriminaram as estimulações mecânicas inócuas daquelas nociceptivas, verificada através do aumento de suas descargas. Todos os neurônios responderam à estimulação elétrica emitindo PA com latências relativas às das fibra C. Através do PSH estas respostas puderam ser claramente distinguidas das respostas com latências relativas às fibras A. As médias dos limiares da intensidade da estimulação elétrica das fibras A β e A δ foram $0,25 \pm 0,1$ mA (n=3) e $2,15 \pm 0,4$ mA (n=6) respectivamente. As médias do tempo de latência entre as estimulações e as respostas registradas (ms) foram $1,8 \pm 0,2$ (n=4) e $5,7 \pm 0,2$ (n=6) para as fibras A β e A δ respectivamente. A média dos limiares das intensidades de estimulações relativas às fibras C foi $7,1 \pm 0,6$ mA (n=60). A média das latências correspondentes à mesmas fibras foi de $74,0 \pm 3,4$ ms (n=60).

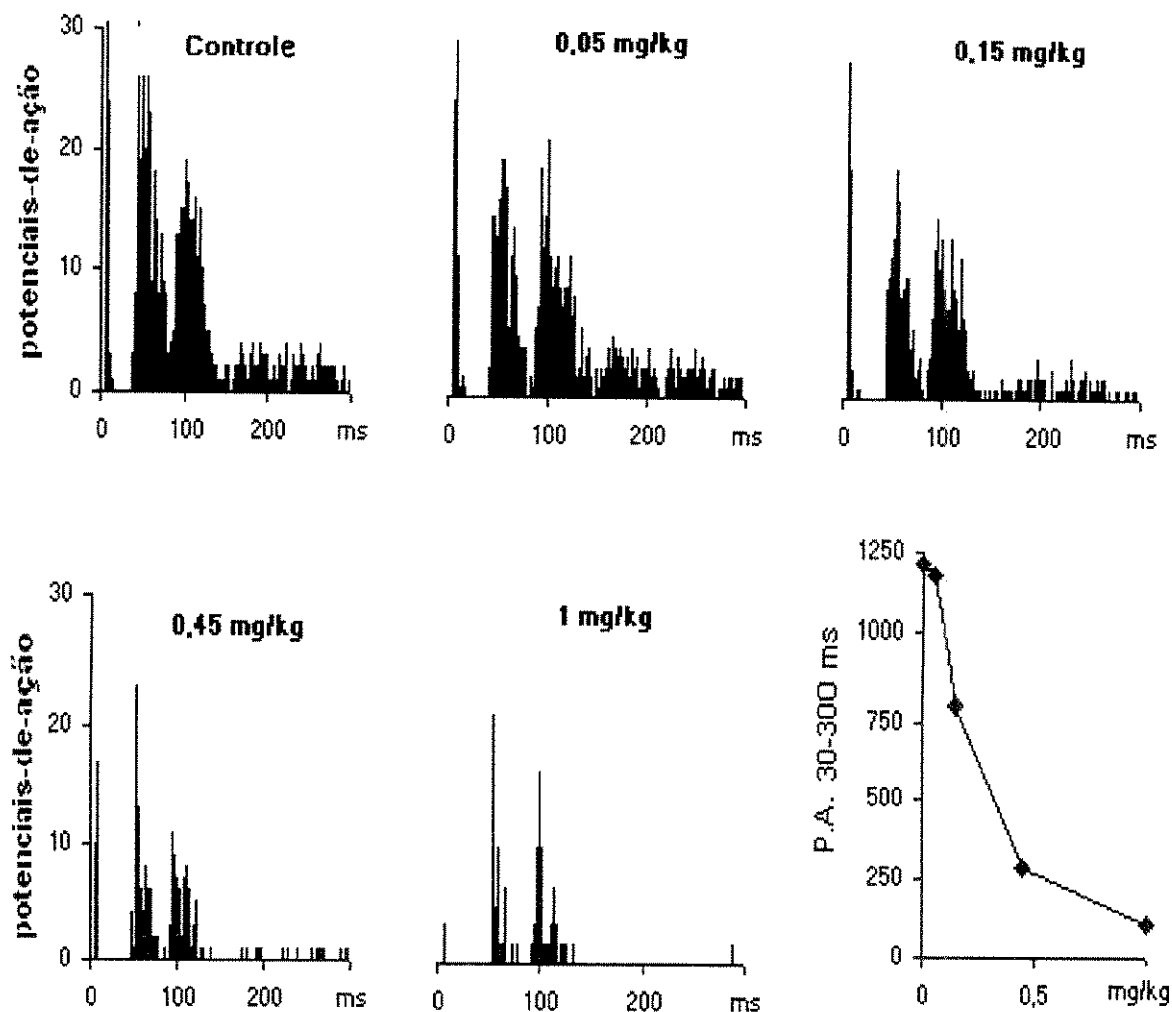


FIGURA 7: Exemplo de Histogramas Pós-estímulo (PSH) obtidos após 50 estimulações elétricas repetidas (0,66Hz) de intensidade igual a três vezes o limiar das respostas com latência de fibra C, aplicados no campo periférico de um neurônio convergente. Seguidas a uma série de respostas consideradas controle, quatro doses cumulativas de MK-801 foram aplicadas. Os PSHs mostram a somatória dos potenciais-de-ação evocados no intervalo de 5 a 300ms, no qual observa-se as respostas das fibras A δ (de 6 a 15ms) e C (após 30ms). Tanto as respostas relativas às fibras A δ , quanto as relativas às fibras C foram afetadas pelas injeções de MK-801. O gráfico no canto direito resume o efeito das doses de MK-801 no número de potenciais-de-ação com latências de fibra C (30-150 ms) dos cinco PSHs.

IV.1. EFEITO DE DOSES CUMULATIVAS DE MK-801 NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS DO SUBNÚCLEO ORAL:

Uma vez comprovada a existência do wind-up no Sp5O, este fenômeno foi caracterizado sob o ponto de vista eletrofisiológico e verificada a participação dos receptores de NMDA na sua ocorrência. Para isso realizou-se inicialmente uma análise do efeito de doses cumulativas de MK-801 na inibição das respostas com latências relativas às fibras C (FIGURA 7).

Onze células nociceptivas detectadas no Sp5O foram inibidas de modo dose-dependente pelo MK-801 (FIGURA 8). A média do número total de potenciais-de-ação (PSH) com latências entre 30 a 150 ms, desencadeados por 50 estimulações, 10 minutos após a administração de salina ou de 0,05 ; 0,15 ; 0,45 e 1,00 mg/kg de MK-801 podem ser observadas na TABELA I.

Três unidades celulares foram fracamente estimuladas ou não apresentaram modificações após administração de MK-801. As médias do número total de PA, observados 10 minutos após as injeções de salina e MK-801, nas doses de 0,05 ; 0,15 ; 0,45 e 1,00 mg/kg, foram $780,3 \pm 217,6$; $958,7 \pm 331,4$; $858,7 \pm 224,3$; $732,3 \pm 154,8$ e $609,0 \pm 185,5$ respectivamente. Em quatro células nociceptivas foi verificado o efeito da administração de uma dose única de 1mg/kg de MK-801. Após 10 minutos, a diminuição das respostas emitidas pelo neurônio após a administração de uma única dose foi similar à diminuição observada após a injeção da mesma concentração da droga, dividida em quatro doses cumulativas, ou seja de $475,0 \pm 167,3$ para $57,7 \pm 6,9$ (n=4) PA em resposta a 50 estimulações e de $924,9 \pm 148,9$ para $277,7 \pm 84,3$ (n=11) após a dose cumulativa do mesmo antagonista (TABELA I).

O efeito do MK-801 também foi verificado nas respostas dos neurônios nociceptivos convergentes do Sp5O após 20 estimulações elétricas a uma

freqüência de 0,2 Hz. Apesar desta freqüência ser considerada pouco eficiente para desencadear wind-up (HAMBA ET AL., 1992), os resultados demonstraram que doses cumulativas de MK-801 produziram inibição significativa na resposta desencadeada por tais estimulações (TABELA I). Esta inibição pode ser explicada pela possível ocorrência de wind-up nos neurônios do Sp5O.

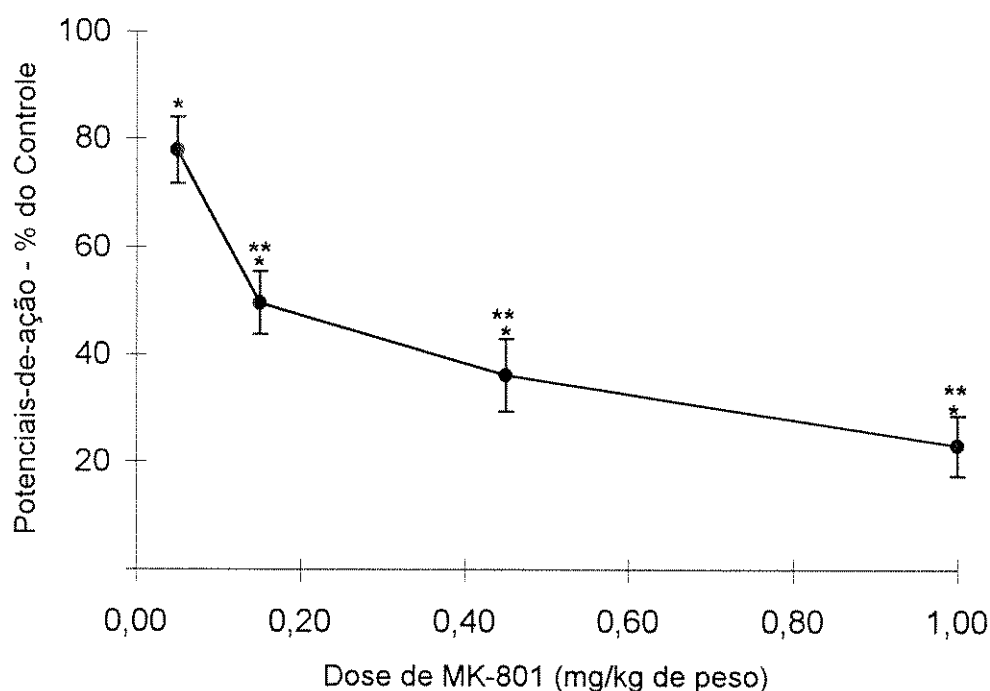


FIGURA 8: Efeito de doses cumulativas de MK-801 (0,05 ; 0,15 ; 0,45 e 1mg/kg i.v.) sobre o número de potenciais-de-ação (PA) desencadeados em resposta a 50 estimulações elétricas (0,66 Hz) no intervalo de 30-150 ms de latência. Os valores estão representados como percentual de resposta em relação ao número de PA emitidos nas condições de controle. *: valores diferentes do controle; **: valores diferentes da dose de 0,05 mg/kg (ANOVA, $p < 0,05$). As diferenças entre as respostas obtidas após as doses de 0,15 ; 0,45 e 1 mg/kg não foram significativas.

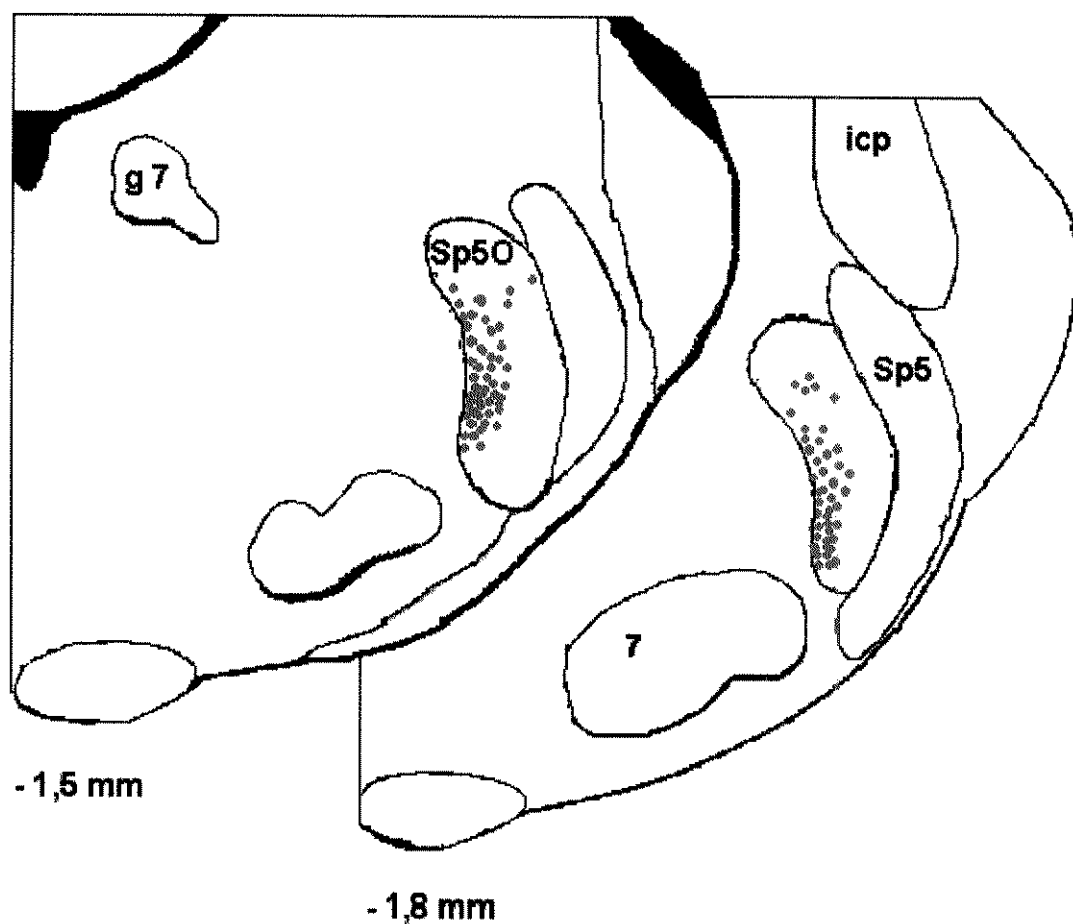


FIGURA 9: Esquema de dois cortes do tronco cerebral no plano frontal mostrando a localização dos registros dos neurônios convergentes.. Todas as células foram mapeadas nestes planos, segundo as coordenadas estabelecidas por PAXINOS & WATSON, (1986). **g7** : nervo facial. **7**: núcleo do n. facial. **Icp** : pedúnculo cerebelar inferior. **Sp50** : subnúcleo oral. Os sítios de registros estão representados pelos pontos em vermelho concentrados sobretudo na porção lateral do Sp50.

IV.2. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE NMDA NA RESPOSTA BASAL¹, NO WIND-UP E NA PÓS-DESCARGA DOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL

Neste experimento foram detectados quinze neurônios nociceptivos convergentes no Sp5O. Doze neurônios apresentaram wind-up. Nesta etapa do trabalho, o objetivo foi analisar a influência do MK-801 na resposta rápida e inicial do neurônio (resposta basal) e nas respostas tardias como o wind-up e pós descarga. A dose de 0,15 mg/kg de MK-801, utilizada neste experimento, foi determinada de acordo com o experimento anterior e correspondeu à menor concentração capaz de produzir o maior efeito inibitório sobre as respostas às fibras C (FIGURA 8).

Neste experimento, avaliou-se a resposta basal a 10 estimulações aplicadas a uma frequência de 0,1 Hz. Previamente ao efeito do MK-801, a estimulação com frequência de 0,1Hz desencadeou uma média de $6,8 \pm 1,2$ (n=12) PA por estímulo. Por outro lado, a média do número de PA emitidos após a primeira estimulação a 0,66 Hz foi $5,1 \pm 0,9$ (n=12) (TABELA II). Apesar da frequência de 0,1 Hz ser considerada insuficiente para a ocorrência do wind-up (HAMBA ET AL., 1992 ; CHAPMAN ET AL., 1994), a diferença observada entre as médias das respostas basais nestas duas situações pode ser explicada pela ocorrência de um possível wind-up provocado por estas estimulações. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se notar que nos neurônios do Sp5O, observa-se a ocorrência de wind-up mesmo após estimulações a 0,1 Hz.

¹ Neste trabalho, o termo “resposta basal” é usado para designar a resposta do neurônio que não depende dos receptores de NMDA (input C) e que é emitida após cada estimulação. Pelo fato desta resposta não poder ser distinguida do wind-up em um PSH, considera-se que o número de PA emitidos após a primeira estimulação, seja equivalente ao input C emitido ao longo de toda a série de estimulações, uma vez que o fenômeno do wind-up aparece a partir da segunda estimulação.

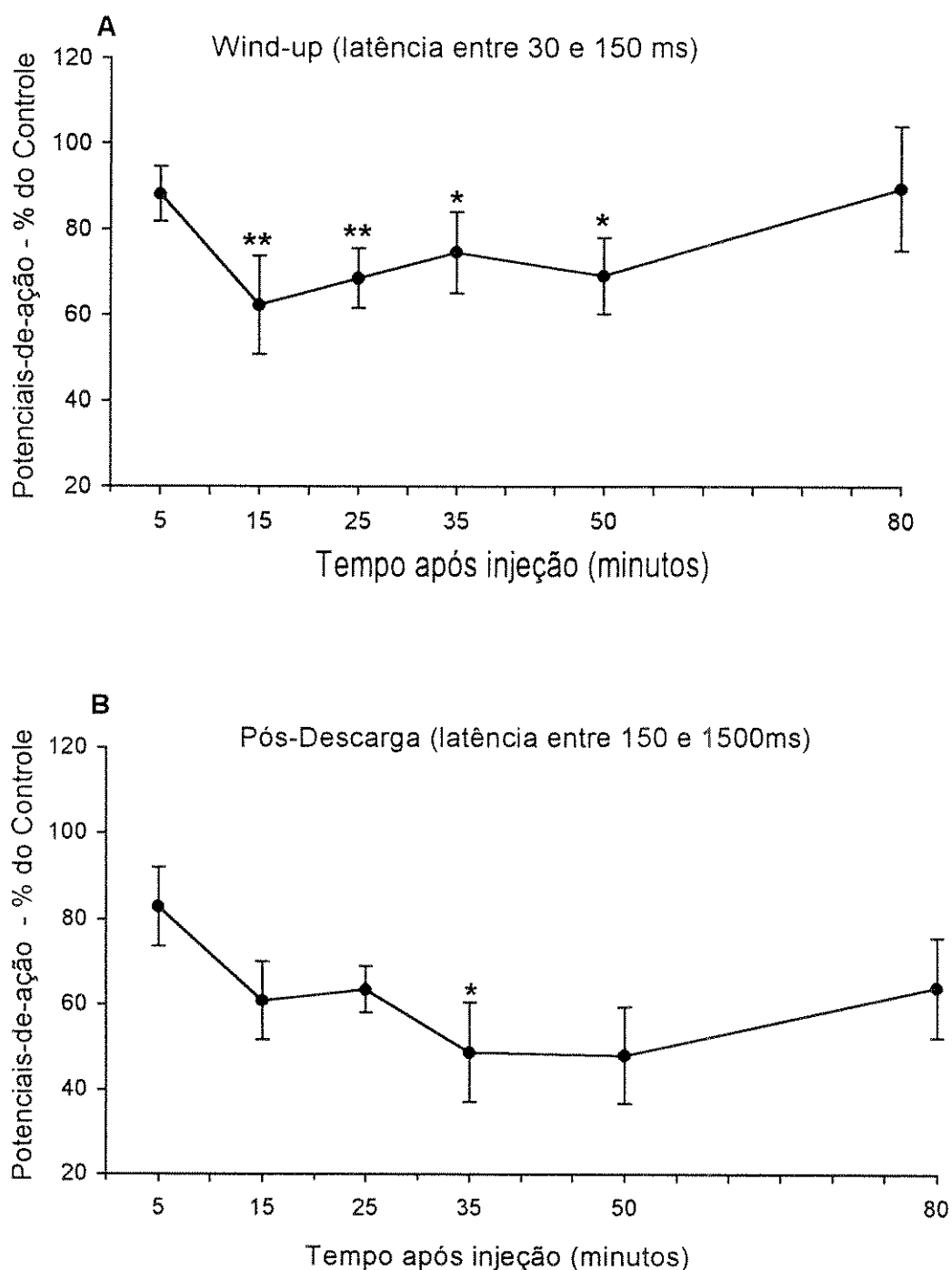


FIGURA 10: Efeito da aplicação do MK-801 (0,15 mg/kg i.v.) sobre o wind-up (A) e a pós-descarga (B) dos neurônios do subnúcleo oral. Os valores estão representados pelas médias dos valores expressos em porcentagens do controle. *: valores significativamente diferentes do controle. **: valores significativamente diferentes do tempo de 80 minutos (ANOVA, $p < 0,05$).

Para o cálculo do wind-up considerou-se o número total de PA desencadeados entre as latências de 30 e 150 ms. A análise estatística mostrou que as respostas observadas nos períodos de 15, 25, 35 e 50 minutos após a injeção de MK-801 foram significativamente diferentes do controle (FIGURA 10, TABELA II). Contudo, a menor resposta, observada 15 minutos após a injeção, não diferiu estatisticamente da resposta observada após 25 minutos. Também as respostas observadas 35 e 50 minutos após a injeção do MK-801 não diferiram estatisticamente entre si, diferindo porém do controle. É importante notar que a 80 minutos após a injeção o número de PA emitidos retornou próximo aos valores do controle e não diferiu estatisticamente do mesmo (FIGURA 10).

A pós-descarga no grupo controle foi observada depois da 5ª estimulação e atingiu seu valor máximo entre a 15ª e 20ª estimulações. Seu valor correspondeu ao número total de PA emitidos entre as latências de 150 e 1500 ms (FIGURA 10). A administração de MK-801 também produziu um efeito marcante sobre a resposta observada 35 minutos após a injeção, a qual diferiu estatisticamente do controle (TABELA II).

IV.3. CARACTERIZAÇÃO DO WIND-UP NOS NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS DO SUBNÚCLEO ORAL

O fenômeno de wind-up foi claramente observado após a aplicação de uma sequência de estimulações a uma frequência de 0,66 Hz. As células responderam com um o número de PA gradativamente maior, à medida que as 27 estimulações eram aplicadas. A média da soma dos PA por estimulação registrados no intervalo de 30 a 150 ms de 12 células é mostrado na FIGURA-11. Pode ser observado um platô nas curvas de respostas após aproximadamente a 16ª estimulação. Sendo que

ponto de vista matemático, o número de PA por estimulação corresponde a uma curva logarítmica cujo coeficiente de regressão (R) é igual a 0,98 (FIGURA 11).

As equações podem ser expressas por:

$$PA_E = 3,89 + 5,01 \ln E, \text{ para o grupo controle,}$$

$$PA_E = 3,07 + 3,38 \ln E, \text{ 15 minutos após a injeção de 0,15mg/kg de MK-801}$$

$PA_E = 3,99 + 4,46 \ln E$, 80 minutos após a injeção de 0,15mg/kg de MK-801, onde PA_E corresponde ao número de potenciais-de-ação por estimulação e E corresponde ao número de estimulação. É interessante notar que o coeficiente angular da curva de resposta após de 15 minutos é 33% menor que o da curva correspondente ao controle, o que demonstra uma diminuição real do wind-up neste período. Na verdade, o coeficiente angular da curva que relaciona o número de PA e a sequência de estimulações corresponde, por definição, ao wind-up em um dado intervalo de estimulações. Seguindo o mesmo raciocínio, o coeficiente linear das curvas, correspondem à resposta inicial calculada a partir da regressão logarítmica. É interessante notar que 15 minutos após a injeção de MK-801, o coeficiente linear da curva é 19% menor que o controle. Esta inibição é duas vezes maior, quando comparada à inibição calculada a partir da média das respostas basais no mesmo período.

Wind-up registrado nos neurônios do Sp50 (respostas com latências entre 30 e 150 ms)

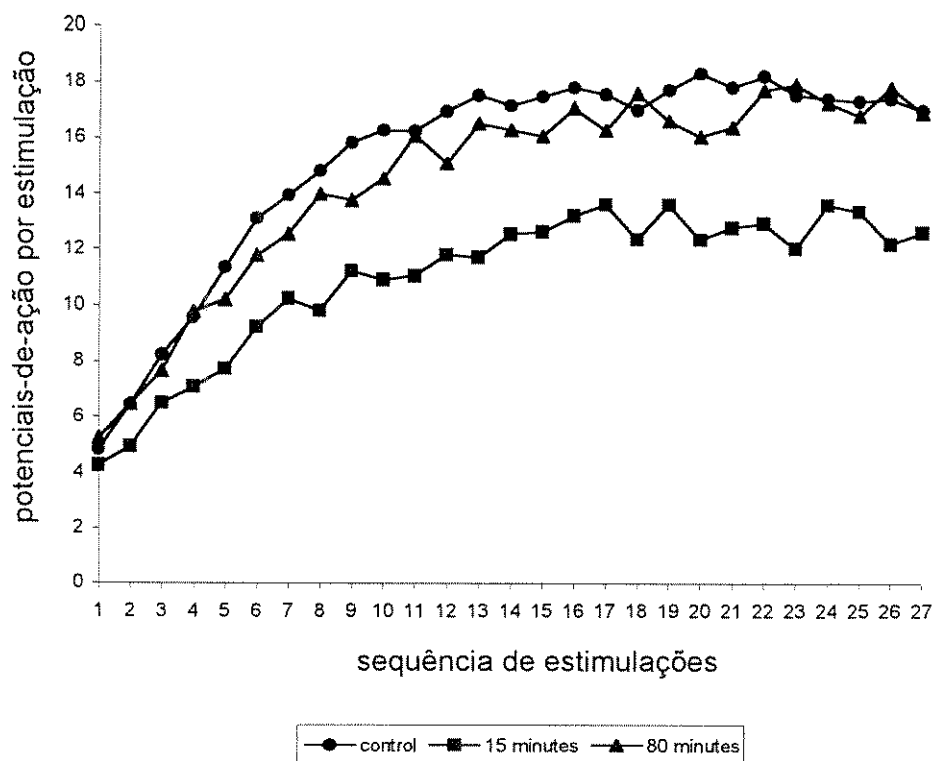


FIGURA 11: Média do número de potenciais-de-ação com latências relativas às fibras C evocados por 27 estimulações elétricas repetitivas (0,66 Hz). As curvas correspondem ao controle e às respostas observadas nos tempos de 15 e 80 minutos após a injeção de MK-801 (0,15 mg/kg i.v.). O wind-up no tempo de 15 minutos após a injeção de MK-801, difere do controle e do wind-up no tempo de 80 minutos, os quais não diferem entre si (ANOVA, $p < 0,05$).

Equações das curvas:

controle: $3,89 + 5,01 \ln(x)$, $R = 0,98$

15 minutos: $3,07 + 3,38 \ln(x)$, $R = 0,97$

80 minutos: $3,99 + 4,46 \ln(x)$, $R = 0,97$

Note que a curva, a 15 minutos possui uma inclinação nitidamente menor (coeficiente angular = 3,4) que as demais (5,0 e 4,5). As médias dos potenciais-de-ação evocados nas primeiras estimulações correspondem às respostas iniciais em cada tempo.

TABELA I: Efeito da administração sistêmica de MK-801 sobre o PSH registrado entre as latências de 30 e 300ms dos neurônios do subnúcleo oral, após 50 estimulações a 0,66 Hz ou 20 estimulações a 0,2 Hz, respectivamente.

DOSES DE MK-801 (mg/kg de peso)						
0,66 Hz	Controle	NaCl	0,05	0,15	0,45	1,00
Nº de células	11	11	10	11	10	9
Média	932,33	924,95	766,80*	479,83*+	339,78*+	277,74*+
DP	131,12	148,93	139,20	87,03	79,82	84,30
Nº de células	4	4				4
Média	502,67	474,98				57,72*
DP	155,53	167,33				6,90
0,2 Hz						
Nº de células	11	11	10	11	11	8
Média	103,45	96,05	57,30*	32,91*+	23,73*+	19,22*+
DP	20,26	13,70	9,33	8,49	5,95	5,84

* : Valores diferentes do controle e + : valores que não diferem entre si, para um $p < 0,05$ (ANOVA).

TABELA II: Efeito da administração sistêmica de 0,15 mg/kg de MK-801 sobre o wind-up (registrado entre 30 e 150 ms de latência), sobre a pós-descarga (registrada entre 150 e 1500 ms de latência) e sobre a resposta inicial, desencadeados por 27 estimulações a 0,66 Hz e no PSH dividido por 10 (registrado entre 30 e 150 ms de latência) desencadeado por 10 estimulações a 0,1 Hz.

		TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE MK-801					
27x 0,66Hz	Controle	5	15	25	35	50	80
<i>Wind-up</i>							
Nº de células	13	12	12	11	10	12	10
Média	460,17	435,33	331,22*	370,00*	411,25*+	372,00*+	422,14+
DP	53,20	43,09	49,91	38,36	32,86	51,01	51,19
<i>Pós-descarga</i>							
Nº de células	7	7	6	5	7	7	6
Média	258,02	209,57	141,50	106,80	76,43*	101,14	127,67
DP	70,77	66,63	34,45	43,86	28,10	42,34	37,23
<i>Resposta inicial</i>							
Nº de células	13	12	12	11	10	12	10
Média	4,82**	5,08	4,45	5,60	5,89	6,00	5,22
DP	0,90	0,92	0,87	0,99	0,85	0,93	0,99
10x 0,1 Hz							
<i>PSH/10</i>							
Nº de células	13	12	12	11	10	12	10
Média	5,59**	6,39	4,82	5,64	5,58	5,68	6,41
DP	1,19	0,87	0,84	0,98	0,93	0,80	1,02

*: valores diferentes do controle e +: valores que não diferem entre si para um $p < 0,05$ (ANOVA). ** : valores diferentes entre si (Teste Student, $p < 0,05$).

IV.4. PAPEL DO SUBNÚCLEO CAUDAL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO ORAL.

Efeito da injeção de MK-801 no subnúcleo caudal, nas respostas dos neurônios do subnúcleo oral

Uma vez comprovada e caracterizada a ocorrência do wind-up nos neurônios nociceptivos do Sp5O, verificou-se o papel das células do subnúcleo caudal (Sp5C) sobre a atividade dos neurônios do Sp5O. Um total de 48 células foram analisadas neste experimento.

A microinjeção de 0,25 μ g de MK-801 (volume = 0,25 μ l) no Sp5C provocou efeitos variados nas respostas de oito neurônios do Sp5O desencadeadas por 30 estimulações a 0,66Hz. Em três neurônios a administração de 0,25 μ g de MK-801 não provocou nenhum efeito nem no wind-up, nem na resposta basal. Em outros três neurônios, a administração de 0,25 μ g de MK-801 reduziu o wind-up de 536,20 $\pm$ 72,88 PA para 260,00 $\pm$ 55,26 PA, 10 minutos após a injeção. Em apenas duas células, apesar do wind-up não ter sido alterado, observou-se uma diminuição da resposta basal, a qual passou de 8,50 $\pm$ 0,50 PA para 3,00 $\pm$ 0,71 PA, 10 minutos após a injeção de 0,25 μ g de MK-801. Os valores expressos nas TABELAS III e IV são as médias do número de P.A. registrados nas oito células analisadas. Um aspecto interessante deste resultado foi revelado pelo exame histológico, ou seja, a diminuição do wind-up sem alteração da resposta inicial, foram mais freqüentes nos animais cujo o sítio de injeção localizava-se na porção mais medial do Sp5C (-5,4 $\pm$ 0,12 mm da sutura interneural), enquanto a inibição da resposta basal ocorria quando as injeções foram realizadas mais na porção lateral do subnúcleo (-6,2 $\pm$ 0,23 mm da sutura interneural). Contudo, a metodologia utilizada neste trabalho não permite concluir se houve uma relação entre o sítio da

injeção de 0,25µg de MK-801 no Sp5C e o efeito observado nos neurônios do Sp5O.

A dose de 0,5µg de MK-801 (volume = 0,5µl), foi estabelecida levando em consideração três critérios: **i)** a variabilidade do efeito na resposta neuronal após a injeção da dose de 0,25µl. **ii)** as doses utilizadas por diversos autores em outras estruturas do SNC com dimensões semelhantes às do Sp5C, uma vez que não foi encontrado na literatura trabalhos nos quais o MK-801 tenha sido administrado no Sp5C. **iii)** a proporção relativa de 0,15mg/kg de peso corporal, aplicado sistemicamente, com a massa do Sp5C, considerando que o MK-801 possui uma boa penetração na barreira hematocefálica e que os receptores de NMDA são encontrados na maior parte do SNC. Nesta etapa do trabalho, a obtenção de uma curva dose/resposta da microinjeção de MK-801 no Sp5C, foi considerada inviável dada a grande variação das respostas dos neurônios do Sp5O à 0,25 µg.

As médias das respostas de doze células do subnúcleo oral analisadas nos períodos de 5, 10, 25 e 60 minutos após a injeção de 0,5µg de MK-801 no Sp5C, podem ser observados na FIGURA-12. Duas células não apresentaram alterações após a injeção de 0,5µg de MK-801. O efeito máximo do MK-801 nas respostas dos neurônios do Sp5O foi observado 10 minutos após a sua injeção. A administração deste antagonista não-competitivo de NMDA no Sp5C inibiu 66% do wind-up observado nos neurônios do subnúcleo oral. Contudo, observou-se ao mesmo tempo uma diminuição de 91% da resposta basal dos neurônios. Diante da possibilidade da inibição observada ter sido provocada por uma lesão tecidual gerada pela introdução da micropipeta no Sp5C ou pelo efeito mecânico do volume injetado, foram testadas doses semelhantes do isômero óptico de MK-801 diluídas em volumes iguais de solução fisiológica.

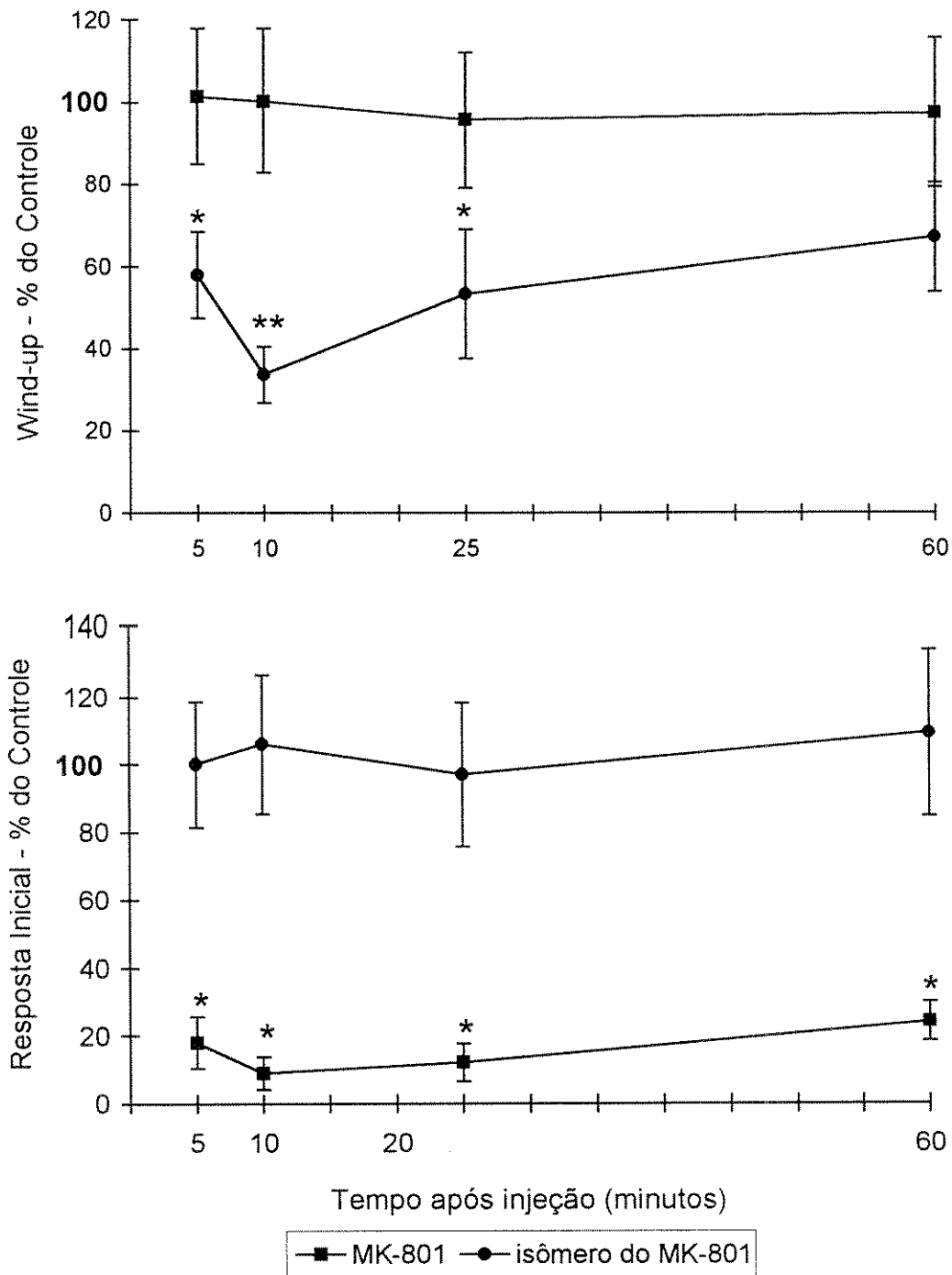


FIGURA 12: Efeito da microinjeção no subnúcleo caudal de 0,5 μ g de MK-801 e do isômero óptico de MK-801, sobre o wind-up e sobre a resposta basal de neurônios do subnúcleo oral após diferentes intervalos de tempo. Os valores estão representados em porcentagem do controle. *: valores significativamente diferente do controle (ANOVA, $p < 0,05$). **: valores significativamente diferente do controle (ANOVA, $p < 0,001$).

As médias das respostas de 6 neurônios registradas 5, 10, 25 e 60 minutos após a injeção, demonstraram que o enantiômero de MK-801 aplicado no subnúcleo caudal não provocou nenhum efeito sobre as células do Sp5O (TABELAS III e IV).

Os gráficos da FIGURA-13 mostram que apesar de não existir uma correlação entre o número de PA desencadeados pela primeira estimulação e a intensidade do wind-up, é evidente que a inibição da resposta basal pelo MK-801 refletiu na diminuição do wind-up registrado nos neurônios do Sp5O. A curva que relaciona a inibição do wind-up e a diminuição da resposta basal, 5, 10, 25 e 65 minutos após a injeção de 0,5 μ g de MK-801, pôde ser transformada em uma função logarítmica com um coeficiente de correlação (R) igual a 0,99 (FIGURA 13). Este dado reforça a hipótese da inibição do wind-up dos neurônios do Sp5O, ter sido, pelo menos em parte, reflexo da diminuição da resposta basal dos neurônios do Sp5C provocada pela injeção de 0,5 μ g de MK-801.

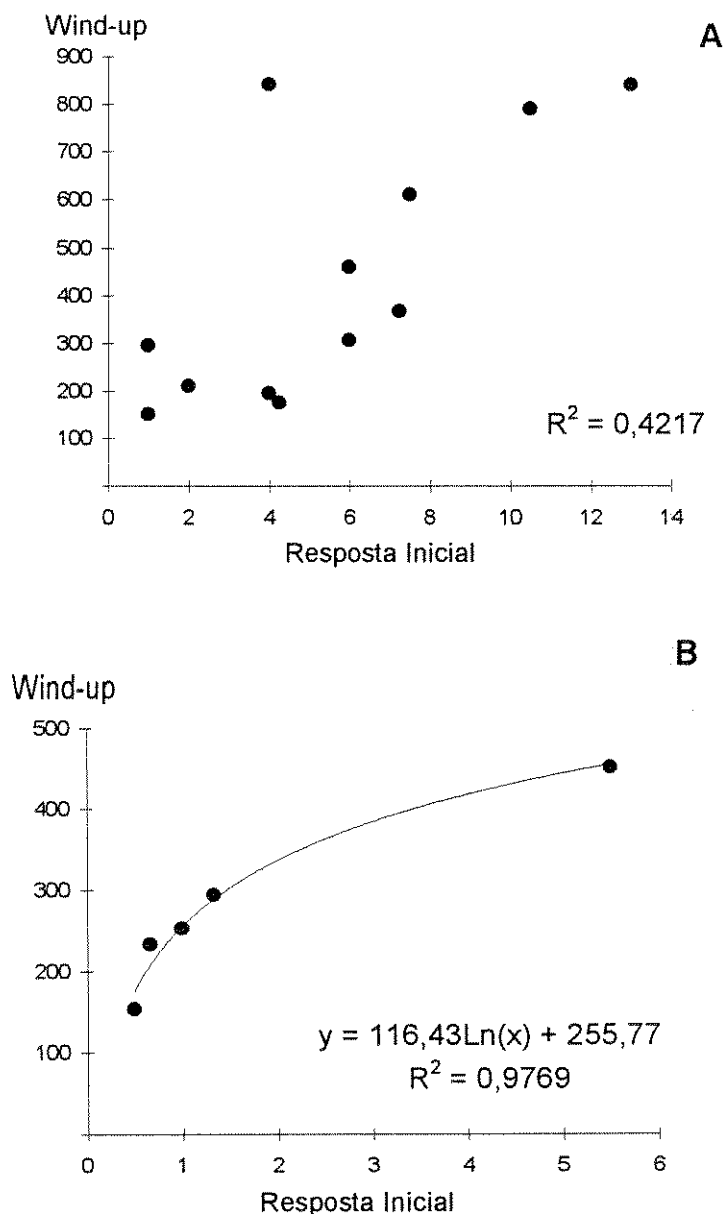


FIGURA 13: **A-** O gráfico mostra que não existe uma correlação entre o número de potenciais-de-ação desencadeados pela primeira estimulação (resposta basal) e o wind-up originado nos mesmos neurônios. **B-** Por outro lado, existe uma forte correlação entre a inibição da resposta inicial e a inibição do wind-up, mostrando que a inibição da resposta inicial pela injeção de MK-801 no subnúcleo caudal, é responsável, em grande parte, pela diminuição do wind-up.

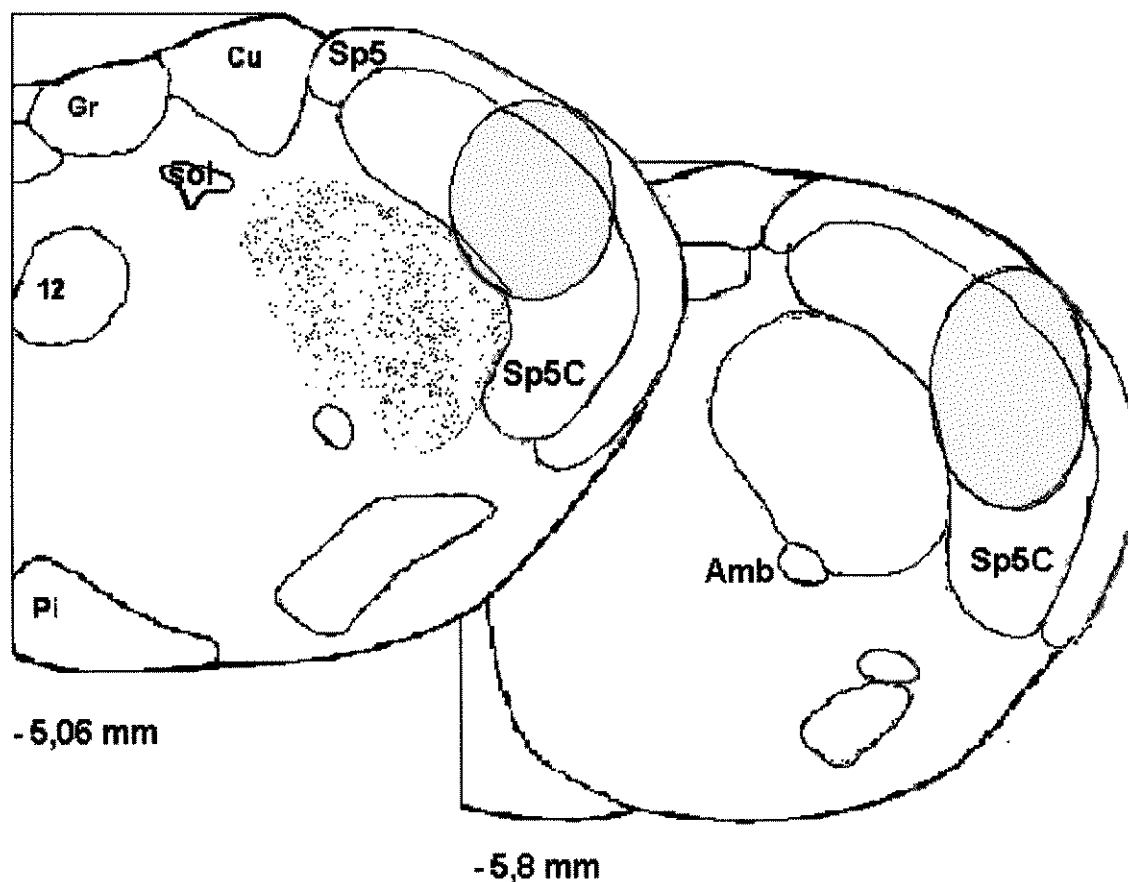


FIGURA 14: Esquema de dois cortes do tronco cerebral no plano frontal, mostrando a localização dos sítios de injeção de MK-801, isômero de MK-801 e CGS19755, no subnúcleo caudal. As áreas em azul, correspondem aos limites dos sítios de injeção identificados histologicamente em microscópio óptico e mapeados nestes planos estabelecidos por PAXINOS & WATSON (1986). **Cu:** fascículo cuneiforme. **Gr:** fascículo Grácil. **sol:** núcleo do trato solitário. **Pi:** pirâmide. **12:** núcleo do nervo hipoglosso. **Amb:** núcleo ambíguo. **Sp5C:** subnúcleo caudal do núcleo do trato espinhal do trigêmeo. **Sp5:** trato espinhal do nervo trigêmeo.

Efeito da injeção de CGS19755 no subnúcleo caudal, nas respostas dos neurônios do subnúcleo oral

O efeito da injeção intranuclear do antagonista competitivo CGS19755 sobre o wind-up e sobre a resposta basal dos neurônios do Sp5O, comprovou o efeito inespecífico do antagonista não-competitivo MK-801.

A injeção intranuclear de 5µg (volume = 0,5µl) de CGS19755 provocou uma diminuição significativa do wind-up nos períodos de 5 e 10 minutos após a injeção (**FIGURA 15**). Ambos os antagonistas de NMDA, provocaram uma inibição máxima do wind-up 10 minutos após a injeção. Contudo, em relação ao controle, a inibição provocada pela injeção de CGS19755 foi mais discreta que a provocada pelo MK-801, ou seja 42 e 66% do controle, respectivamente (**TABELA III**).

Foi importante constatar que, ao contrário do MK-801, a administração de CGS19755 no subnúcleo caudal não alterou significativamente o número de PA emitidos pela primeira estimulação (resposta basal). Este dado reforça a hipótese da inibição da resposta basal dos neurônios do Sp5O ter sido resultado das características farmacológicas do MK-801. Vale ressaltar, o controle histológico mostrou que os sítios de injeção do MK-801 e do CGS19755, foram coincidentes (**FIGURA 14**).

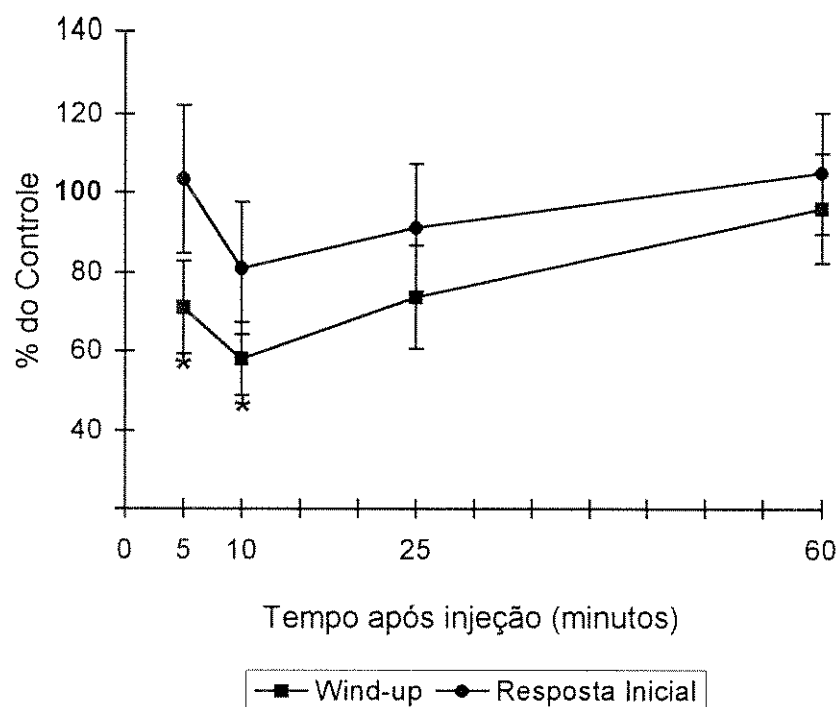


FIGURA 15: Efeito da injeção no subnúcleo caudal de 5 μ g de CGS19755 na resposta basal e no wind-up dos neurônios do subnúcleo oral. Os valores estão representados em percentagem do controle. *: valores significativamente diferentes do controle (ANOVA, $p < 0,05$). Note que a injeção de CGS19755 diminuiu o wind-up sem alterar significativamente a resposta basal das fibras C.

Efeito da injeção intranuclear de MK-801 na resposta dos neurônios do subnúcleo oral

Neste experimento foi registrada a atividade de nove neurônios do Sp5O após a injeção, neste subnúcleo, de 0,5µg (volume = 0,5µl) de MK-801. Dentre os nove neurônios, apenas as respostas emitidas por quatro deles foram consideradas. A resposta registrada de cinco neurônios apresentaram uma diminuição da amplitude dos PA após a injeção, que impossibilitou a integração do sinal.

Apesar das dificuldades técnicas deste protocolo experimental, foi observado em quatro neurônios do Sp5O que a administração intranuclear de 0,5µg de MK-801 não provoca nenhum efeito no wind-up desencadeado por 30 estimulação a 0,66 Hz (TABELA IV), contudo este resultado necessita de confirmação, utilizando-se a técnica de deposição iontoforética de antagonistas de receptor de NMDA.

Vale ressaltar que a injeção intranuclear de 5µl de solução fisiológica não alterou a amplitude dos PA registrados em três neurônios no Sp5O.

A diminuição da amplitude do PA após a injeção intranuclear de 5µg de MK-801 pode ser explicada por dois fatores: i) O MK-801 pode ter aumentado a resistência elétrica do meio intersticial, diminuindo a diferença-de-potencial entre a membrana e o microeletrodo. ii) uma ação neurotóxica do MK-801 pode ter alterado o fluxo de Na⁺ e K⁺ através da membrana, diminuindo a amplitude dos PA do neurônio.

TABELA III. Efeito de injeções no subnúcleo caudal (Sp5C) ou no subnúcleo oral (Sp5O) de antagonistas de NMDA, no wind-up observado entre as latências de 30 e 150 ms e desencadeado por 30 estimulações a 0,66Hz.

<i>Sp5C</i>	TEMPO APÓS INJEÇÃO (MINUTOS)				
	Controle	5	10	25	60
MK801(0,50µg)					
Nº de células	12	12	12	12	9
Média	437,18	253,08	147,25*	233,50*	294,22
DP	73,88	46,20	29,95	68,71	58,38
MK801(0,25µg)					
Nº de células	8	8	8	8	
Média	382,10	312,12	290,12	328,37	
DP	67,30	93,05	67,99	91,13	
isômero MK801					
Nº de células	6	6	6	6	6
Média	533,32	541,00	535,33	510,33	520,50
DP	93,57	87,89	93,04	88,06	96,76
CGS19755 (0,50µg)					
Nº de células	10	10	10	10	9
Média	409,78	291,40*	238,30*	302,40	394,30
DP	56,81	47,96	37,83	53,41	56,67
<i>Sp5O</i>					
MK801(0,50µg)					
Nº de células	4	4	4	4	4
Média	311,75	298,20	277,60	256,60	308,00
DP	54,62	68,15	57,12	66,51	35,80

*: valores significativamente diferentes do controle (ANOVA, $p < 0,05$).

TABELA IV. Efeito de injeções no subnúcleo caudal (Sp5C) ou no subnúcleo oral (Sp5O) de antagonistas de NMDA, no número de potenciais-de-ação emitidos após a primeira estimulação

<i>Sp5C</i>	TEMPO APÓS INJEÇÃO (MINUTOS)				
	Controle	5	10	25	60
MK801(0,50µg)					
Nº de células	12	12	12	12	9
Média	5,54	1,00*	0,50*	0,67*	1,33*
DP	0,97	0,42	0,27	0,31	0,32
MK801(0,25µg)					
Nº de células	8	8	8	8	
Média	7,47	8,12	5,75	5,62	
DP	1,91	2,63	1,60	1,38	
isômero MK801					
Nº de células	6	6	6	6	6
Média	5,50	5,50	5,83	5,33	6,00
DP	0,90	0,96	1,07	1,10	1,27
CGS19755 (0,50µg)					
Nº de células	10	10	10	10	9
Média	5,80	6,00	6,30	6,00	6,10
DP	0,93	1,08	1,08	0,87	0,97
<i>Sp5O</i>					
MK-801(0,50µg)					
Nº de células	4	4	4	4	4
Média	6,30	7,40	5,50	5,85	7,00
DP	1,23	1,11	0,98	0,84	2,03

*: valores significativamente diferentes do controle (ANOVA, $p < 0,05$).

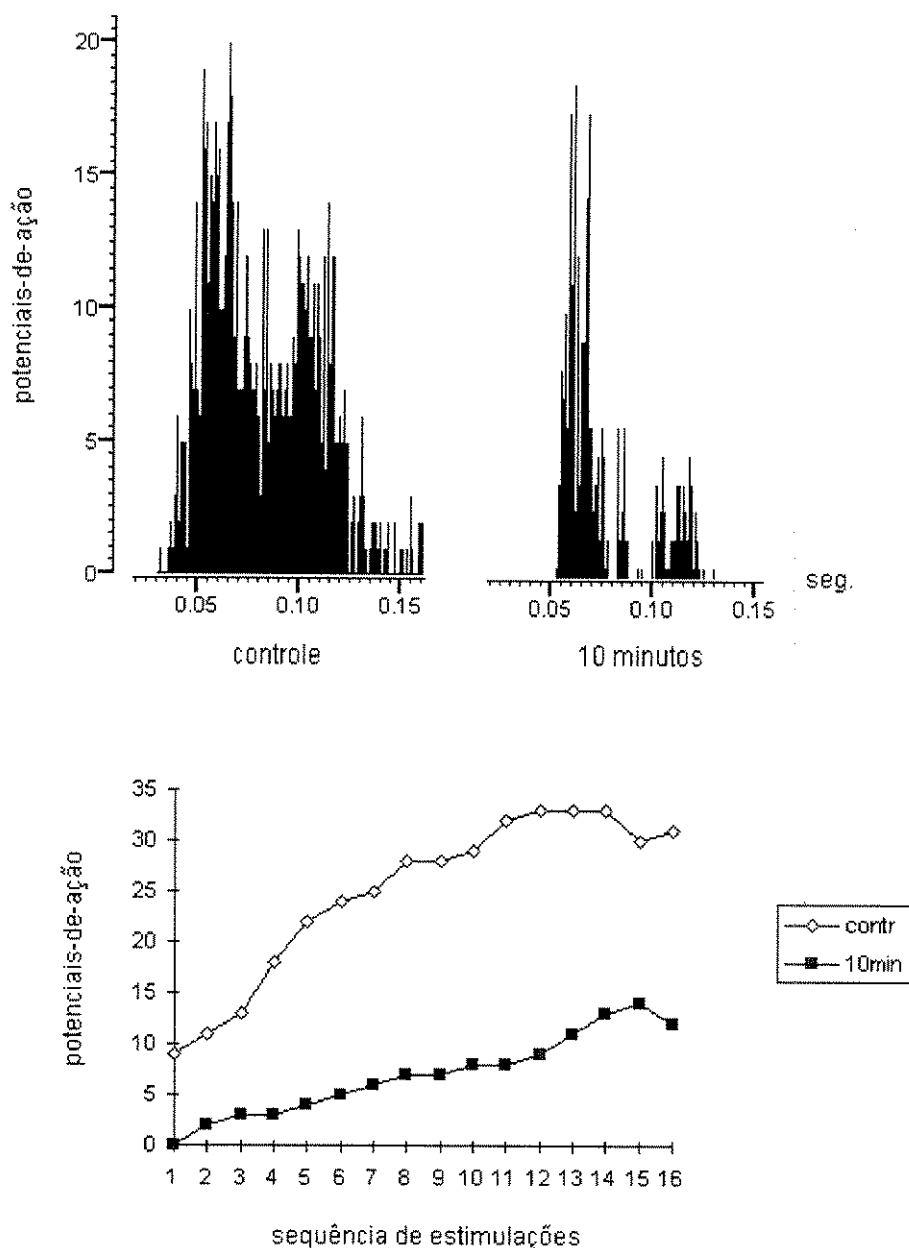


FIGURA 16: Exemplo do efeito da injeção no subnúcleo caudal de $0,25\mu\text{g}$ de MK-801, na resposta de um único neurônio do subnúcleo oral. O efeito máximo foi observado 10 minutos após a injeção. Acima, os histogramas mostram as somatórias dos potenciais-de-ação (PSH) emitidos no intervalo entre 50 a 150 ms de latência, em resposta a 16 estimulações repetitivas (0,66 Hz). Abaixo, as curvas que representam a variação do número de potenciais-de-ação emitidos durante a sequência de estimulações, mostram uma diminuição discreta do wind-up e uma evidente diminuição da resposta basal.

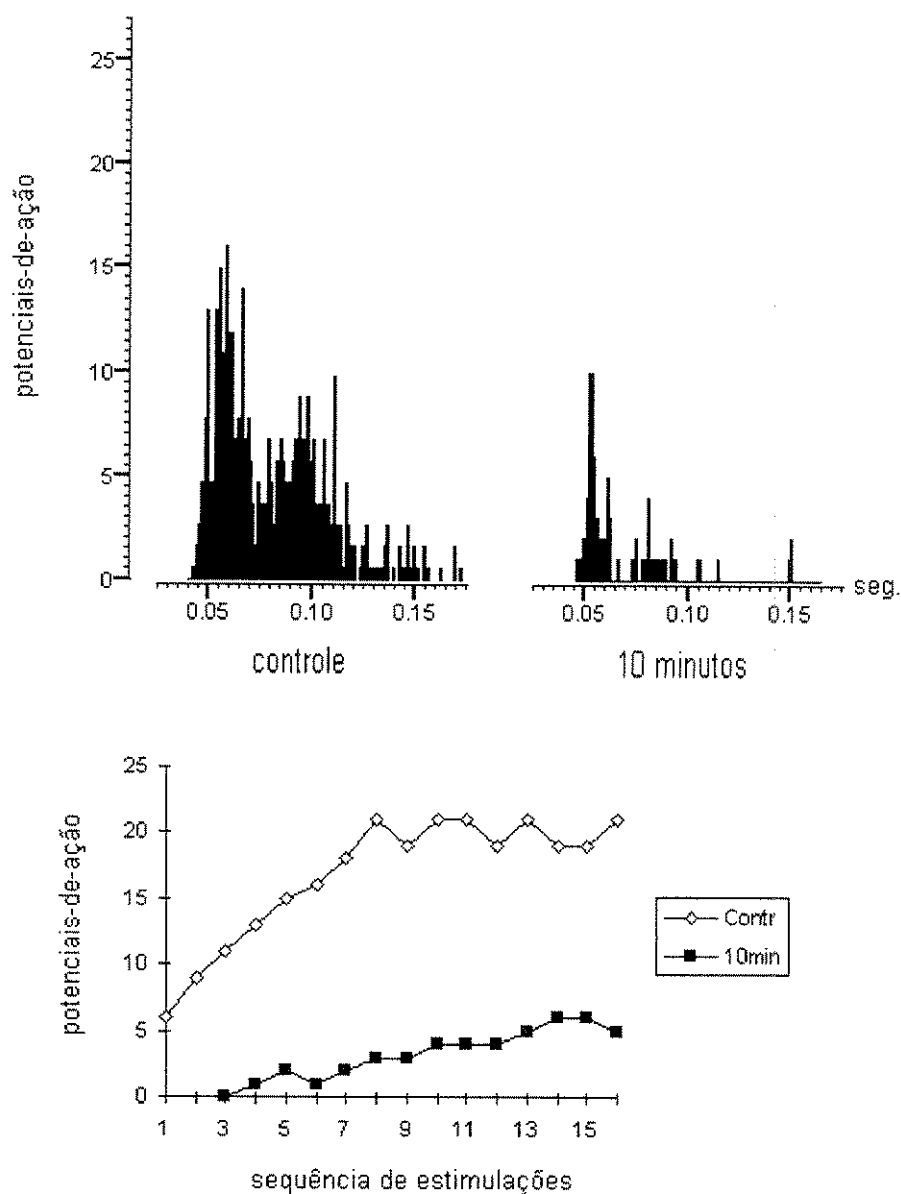


FIGURA 17: A figura mostra um registro típico do efeito da injeção, no subnúcleo caudal, de $0,5\mu\text{g}$ de MK-801 na resposta de um único neurônio do subnúcleo oral. O efeito máximo foi observado 10 minutos após a injeção. Acima, os histogramas mostram as somatórias dos potenciais-de-ação (PSH) emitidos no intervalo entre 50 a 150 ms de latência, em resposta a 16 estimulações a $0,66\text{ Hz}$. Abaixo, as curvas que representam a variação do número de potenciais-de-ação emitidos durante a sequência de estimulações, mostram claramente a diminuição do wind-up e da resposta basal.

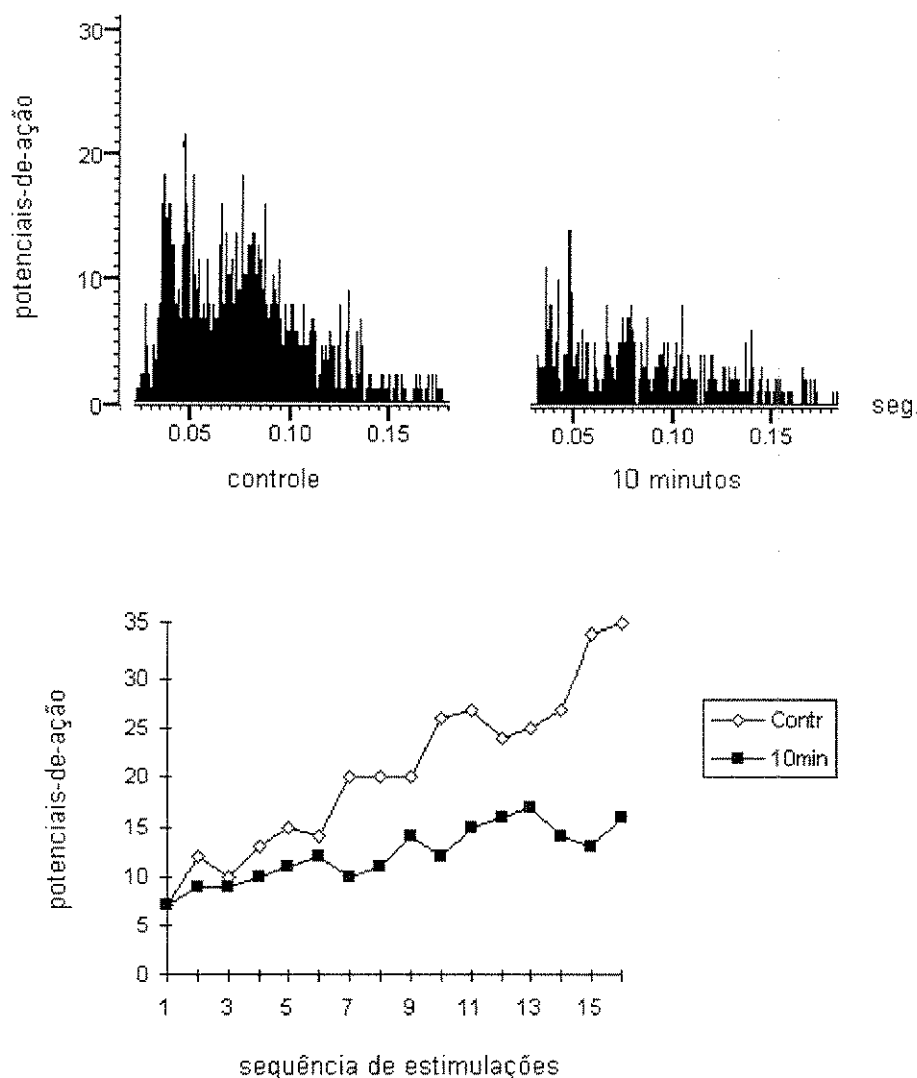


FIGURA 18 : A figura mostra um registro típico do efeito da injeção no subnúcleo caudal de de $5\mu\text{g}$ de CGS19755, na resposta de um único neurônio do subnúcleo oral. O efeito máximo foi observado 10 minutos após a injeção. Acima, os histogramas mostram as somatórias dos potenciais-de-ação (PSH) emitidos no intervalo entre 50 a 150 ms de latência, em resposta a 16 estimulações a 0,66 Hz. Abaixo, as curvas que representam a variação do número de potenciais-de-ação emitidos durante a sequência de estimulações, mostram que houve uma diminuição apenas do wind-up após a administração de CGS19755

V. DISCUSSÃO

O Sp5O é uma estrutura do complexo trigeminal pouco estudada quanto ao seu envolvimento na modulação da dor orofacial, embora ela participe diretamente da transmissão da sensibilidade dolorosa pela via trigeminal (DALLEL ET AL., 1990; RABOISSON ET AL., 1991).

Em primeiro lugar, nossos resultados evidenciaram claramente que os neurônios do Sp5O exibem o fenômeno do wind-up. Além disso, suas características eletrofisiológicas foram semelhantes às descritas para os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal e do Sp5C, que participam na modulação da sensibilidade da dor (JEFTINIJA & URBAN, 1994; DAVIES & LODGE, 1987; WOOLF & THOMPSON, 1991; CHAPMAN ET AL., 1994). Tais características podem ser exemplificadas pelas seguintes observações por nós realizadas: i) A frequência de estimulação foi um fator determinante para a indução do wind-up. Ou seja, os neurônios do Sp5O apresentaram wind-up característico apenas quando estimulados com uma frequência de 0,7 Hz, ao passo que estimulações a 0,1 e 0,2 Hz provocavam variações na descarga de potenciais de ação semelhantes às observadas nas respostas basais (TABELAS I e II). ii) A ocorrência do wind-up foi observada até a 15ª estimulação, após o que, verificou-se um platô durante as 12 estimulações seguintes (FIGURA 11). iii) Tais fenômenos foram claramente observados em respostas com latências típicas de fibras C (FIGURA 7). iv) O fenômeno da pós-descarga pôde ser claramente distinguido das outras respostas eletrofisiológicas nos neurônios do Sp5O. De fato, enquanto o wind-up correspondeu ao aumento do número de PA que ocorram após latências entre 30 e 150 ms, a pós-descarga foi observada apenas após períodos de latência bem maiores, entre 150 e 1500 ms (FIGURA 7).

Assim, considerando o fato dos neurônios do Sp5O expressarem um wind-up semelhante ao observado nos neurônios da medula espinhal e do Sp5C, parece-nos perfeitamente justificada a sua classificação como neurônios convergentes (DAVIES & LODGE, 1987 ; XU ET AL., 1995).

Nossos experimentos também mostraram que a resposta nociceptiva dos neurônios convergentes do Sp5O é inibida pela aplicação sistêmica de MK-801, um antagonista não competitivo de receptores de NMDA. De acordo com os resultados de vários autores, os receptores de NMDA estão envolvidos principalmente nos mecanismos centrais das hiperalgesias, sobretudo naquelas decorrentes da inflamação do tecido periférico ou desencadeadas por estímulos dolorosos de longa duração (CODERRE E MELZACK, 1991 ; MURRAY ET AL, 1991 ; MJELLEM-JOLY ET AL., 1992 ; NEUGEBAUER ET AL., 1993b ; CODERRE ET AL., 1994 ; EISENBERG ET AL., 1995 ; CARLTON ET AL., 1995). Tem sido também atribuído ao receptor de NMDA um papel fundamental no wind-up, ou seja, a ocorrência deste fenômeno parece estar relacionada com ativação dos receptores de glutamato tipo NMDA (DAVIES & LODGE, 1987 ; DICKENSON & SULLIVAN, 1990 ; THOMPSON ET AL., 1990). Muitos autores têm demonstrado que antagonistas competitivos e não-competitivos de receptores de NMDA inibem o wind-up registrado em células nervosas da medula espinhal (DICKENSON & SULLIVAN, 1990 ; DICKENSON & AYDAR, 1991 ; XU ET AL., 1995 ; WOOLF & THOMPSON, 1991). Os resultados apresentados no presente trabalho estão de acordo com a literatura. Mas, além disso, nossos resultados evidenciaram que a ação do MK-801 é mais eficaz na diminuição do wind-up dos neurônios do Sp5O quando comparada com àquela relatada nos neurônios da medula espinhal por outros autores (HALEY ET AL., 1990 ; WOOLF & THOMPSON, 1991 ; XU ET AL., 1992). De fato, as doses de 0,05 e 0,15 mg/kg de MK-801 por nós administradas

(i.v.), que levaram a um decréscimo acentuado do wind-up, não são suficientes para alterarem significativamente as respostas nociceptivas das células do corno dorsal da medula espinhal. Segundo a literatura (HALEY ET AL., 1990 ; WOOLF & THOMPSON, 1991 ; XU ET AL., 1992) para se obter efeitos semelhantes aos por nós observados, são necessárias doses bem maiores do mesmo antagonista, tal como 0,5 mg/kg (XU ET AL., 1992). Da mesma forma, doses de quetamina, um outro antagonista não-competitivo de NMDA, equivalentes às empregadas neste trabalho, não são capazes de provocar uma inibição do wind-up dos neurônios espinhais igual à aqui obtida nos neurônios do Sp5O.

Além disso, os resultados aqui relatados mostraram que 1mg/kg de MK-801 reduziu a resposta nociceptiva dos neurônios do Sp5O a valores bem próximos da resposta basal destes neurônios (FIGURA 8). É interessante observar que doses proporcionais deste antagonista, não são suficientes para inibir totalmente o wind-up observado nos neurônios da medula espinhal. Contudo, resultados semelhantes aos nossos foram obtidos em estudos com teste da formalina, por HALEY ET AL., (1990). Estes autores demonstraram que a segunda fase da resposta à formalina pôde ser totalmente inibida por injeções intravenosa de 1,0 mg/kg de MK-801. Vale lembrar que os mecanismos envolvidos na segunda fase da resposta à formalina tem sido comparado com os mecanismos envolvidos no fenômeno do wind-up, sobretudo pelo fato de ambos serem dependentes dos receptores de NMDA (CHAPMAN & DICKENSON, 1994).

Neste momento cabe considerar que vários fatores, combinados ou não, podem explicar os altos níveis de inibição do wind-up por nós observados:

i) O grau de estimulação parece ter influenciado no nível de inibição provocado pelo MK-801. Isto pode se dever ao fato dos antagonistas não-competitivos de NMDA que se ligam a um sítio do canal iônico acoplado ao

receptor, como o MK-801, serem mais eficazes quanto maior for a estimulação do neurônio. (MORI & MISHIMA, 1995 ; SCATTON, 1993 ; EDMONDS ET AL., 1995). Assim, quanto maior for a estimulação do neurônio e, conseqüentemente, quanto maior for a liberação de glutamato, maior será a ativação dos canais iônicos acoplados aos receptores de NMDA, favorecendo seu bloqueio pelo MK-801. Corroborando esta hipótese, foi demonstrado que, para um mesmo grau de estimulação, o MK-801 promove inibição maior do wind-up quando comparada àquela produzida pelo CPP, um antagonista competitivo de receptor de NMDA (WOOLF & THOMPSON, 1991).

ii) Também devem ser consideradas as diferentes condições anestésicas dos animais empregados nos vários estudos referidos na literatura. O halotano, por exemplo, parece não alterar a sensibilidade dos neurônios aos antagonistas não-competitivos de NMDA (RICHARDS & SMAJE, 1976), ao passo que potencializa o efeito de alguns antagonistas competitivos como o CGS19755 (MCFARLANE ET AL., 1995). Por outro lado, foi demonstrado que vários outros anestésicos interferem com os receptores de glutamato potencializando a ação de seus antagonistas (GUILBAUD ET AL., 1981 ; DALO & LARSON, 1990 ; RADHAKRISHNAN & HENRY, 1993). Assim, o emprego do halotano em nossos experimentos reforça a evidência da ação inibitória do MK-801, aplicado sistemicamente, sobre a atividade eletrofisiológica dos neurônios nociceptivos do Sp5O.

iii) Por último, os resultados obtidos com a administração sistêmica do MK-801 podem também ser explicados, pelo menos em parte, por uma ação inespecífica deste antagonista. Neste sentido, é importante ressaltar que a resposta basal por nós considerada neste trabalho e por vários outros autores (DICKENSON & SULLIVAN, 1990 ; CHAPMAN & DICKENSON, 1992 ; CHAPMAN ET AL., 1994) é equivalente ao número de PA emitidos após a primeira estimulação.

Entretanto, vários pesquisadores têm observado que a resposta inicial dos neurônios é muito variável, o que dificulta, ou mesmo inviabiliza sua análise estatística (DAVIES & LODGE, 1987 ; THOMPSON ET AL., 1990 ; BUDAI, 1994 ; JEFTINJA & URBAN, 1994). Assim sendo, um efeito inespecífico da administração sistêmica do MK-801, diminuindo a resposta basal destes neurônios, poderia não ter sido evidenciado apenas pela primeira resposta, afetando assim o cálculo do wind-up (CHAPMAN & DICKENSON, 1992 ; CHAPMAN ET AL., 1994).

Ainda com relação à administração sistêmica de MK-801, pôde ser observado neste trabalho, que seu efeito inibitório sobre a pós-descarga e o wind-up não ocorreu no mesmo intervalo de tempo (FIGURA 10). O MK-801 provocou uma inibição significativa sobre o wind-up dos neurônios do Sp5O dentro do período de 15 - 50 minutos após a injeção, ao passo que, na pós-descarga o efeito inibitório ocorreu apenas 35 minutos após a sua administração. Apesar de diversos autores não reconhecerem diferenças nos mecanismos indutores destes dois fenômenos (DICKENSON & AYDER, 1991 ; WOOLF & THOMPSON, 1991), os dados por nós obtidos revelaram que os mesmos devem possuir características diferentes pelas seguintes razões: *i)* enquanto o wind-up ocorreu dentro de um intervalo de aproximadamente 100 ms, a pós-descarga se estendeu por um período superior a 1000 ms. *ii)* dentre os onze neurônios identificados no Sp5O que exibiram wind-up, apenas quatro apresentaram pós-descarga, evidenciando que este último se manifesta mais raramente. *iii)* além de uma diferença na afinidade ao MK-801, como descrito acima, o fato da pós-descarga ocorrer apenas após a quinta estimulação, pode significar que este fenômeno é menos sensível ao glutamato, se comparado ao wind-up.

A consideração destas razões e dos dados da literatura sobre o wind-up e a pós-descarga, nos permite formular a hipótese de que diferentes subtipos de

receptores de NMDA estejam envolvidos nestes dois fenômenos. De fato, diversos trabalhos têm demonstrado que os subtipos heteroméricos de receptor de NMDA, NR1/NR2A e NR1/NR2B, estão associados a canais iônicos com tempo de fechamento entre 100 e 400 ms (MORI & MISHIMA, 1995) e são encontrados em grandes quantidades na medula espinhal e nos núcleos trigeminais (COGGESHALL & CARLTON, 1997, e DOHRN & BEITZ, 1994 ; PETRALIA ET AL. 1994 a). Mais ainda, são muito sensíveis ao glutamato e possuem grande afinidade com o MK-801 (SCATTON, 1993 ; EDMONDS ET AL., 1995). Em contrapartida, os subtipos NR1/NR2C e NR1/NR2D possuem canais iônicos com tempo de fechamento bem maior, entre 400 e 5000 ms (MORI & MISHIMA, 1995) e são encontrados em menores quantidades tanto na medula espinhal quanto no núcleo espinhal do trigêmeo (COGGESHALL & CARLTON, 1997). Estes são menos sensíveis ao glutamato e possuem uma menor afinidade ao MK-801, quando comparados com os demais subtipos (SCATTON, 1993 ; EDMONDS ET AL., 1995). Assim, é possível que o wind-up e a pós-descarga estejam relacionados, pelo menos em parte, com os receptores heteroméricos de NMDA que possuam as subunidades NR2A e NR2B, NR2C e NR2D, respectivamente.

A exibição do wind-up e da pós-descarga pelos neurônios nociceptivos do Sp5O, aqui demonstradas, parecem confirmar também a hipótese de que porções mais rostrais do núcleo espinhal do trigêmeo participam na transmissão de informações nociceptivas orofaciais relacionadas com os processos de sensibilização central (CLAVELOU ET AL., 1989 ; CADET ET AL., 1993 ; RABOISSON ET AL., 1991; TORNECK ET AL., 1996). Contudo, devemos considerar que a supressão total ou parcial destas respostas neuronais no Sp5O, por antagonistas de NMDA, não significa necessariamente que a ativação destes receptores ocorra nas mesmas células onde as respostas foram registradas. De fato, é atribuído

principalmente ao subnúcleo caudal (Sp5C), mais precisamente às células encontradas em sua camada gelatinosa, o papel modulatório da dor orofacial, sobretudo por sua semelhança anatômica e funcional com o corno dorsal da medula espinhal (SESSLE, 1987 ; HU, 1990 ; CAHUSAC ET AL., 1990 ; MATHISEN ET AL., 1995). Por exemplo, foi demonstrado que lesões no Sp5C diminuem sobremaneira a sensação de dor orofacial em humanos (YOUNG, 1982 ; GRAHAM ET AL., 1988).

De fato, a diminuição do wind-up dos neurônios do SP5O após a injeção intranuclear de antagonistas de NMDA no Sp5C, comprovou o papel deste subnúcleo na modulação das respostas nociceptivas orofaciais (FIGURAS 11 e 14). O controle do Sp5C sobre a atividade nociceptiva dos neurônios do Sp5O foi igualmente demonstrada por outros autores após a aplicação intranuclear de opióides (UJIHARA ET AL., 1987).

Entretanto, um efeito interessante por nós observado, foi a diminuição inusitada da resposta basal dos neurônios do Sp5O após a injeção de 0,5 µg de MK-801 no interior do Sp5C (FIGURA 17). Contrariamente, vários autores têm demonstrado que o limiar e a resposta basal dos neurônios nociceptivos não são significativamente alterados pela administração de várias classes de antagonistas de receptores de NMDA (DAVIES & LODGE, 1987 ; THOMPSON ET AL., 1990 ; JEFTINJA & URBAN, 1994 ; ARENTD-NIELSEN ET. AL., 1995 ; GERBER ET AL., 1991 ; DOUGHERTY ET AL., 1992 ; NEUGEBAUER ET AL., 1993b ; CODERRE & VAN EMPEL, 1994 ; EISENBERG ET AL., 1995). É curioso notar que a inibição das respostas neuronais do Sp5O após a injeção de MK-801 no Sp5C, foi semelhante aos efeitos produzidos nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal após administração de dexamedetomidina e dextrometorfan. Sendo o primeiro um agonista seletivo de adrenoceptor α_2 e o segundo um potente analgésico, que

inibem fortemente a resposta basal e o wind-up dos neurônios nociceptivos (SULLIVAN ET AL., 1992 ; DICKENSON ET AL., 1991).

É plausível, portanto, considerar os seguintes fatores como provavelmente envolvidos na redução da resposta basal registrada neste trabalho:

i) Efeito tóxico do MK-801: apesar de pouco provável, não podemos descartar a possibilidade de um efeito tóxico deste antagonista ter colaborado na diminuição da resposta basal dos neurônios do Sp5O. Esta suposição procede do fato das respostas neuronais terem sido registradas distante do local da injeção da droga. Realmente, tem sido demonstrado que a administração sistêmica de altas doses de antagonistas não-competitivos de receptores de NMDA (5mg/kg) pode provocar vacuolizações ou mesmo a morte dos neurônios na córtex cerebral (MCDONALD ET AL., 1989 OLNEY ET AL., 1991 ; FIX ET AL., 1993).

ii) Efeito inespecífico do MK-801: apesar dos antagonistas não-competitivos dos receptores de NMDA produzirem uma inibição acentuada no wind-up dos neurônios nociceptivos, alguns trabalhos têm demonstrado que estes antagonistas podem produzir um efeito inibitório na resposta basal destes neurônios (DAVIES & LODGE , 1987). GHORPADE & ADVOKAT (1993) demonstraram que administração sistêmica ou intratecal de quetamina aumenta significativamente a latência ao teste do “tail-flick”, tanto em animais intactos quanto nos sensibilizados pela seção da medula. Também foi demonstrado que a memantina, altera a resposta basal em ratos com hiperalgesia térmica e mecânica devido a presença de neuropatia periférica (EISENBERG ET AL., 1995 ; CARLTON & HARGETT, 1995). Além disso, WOOLF & THOMPSON, (1991), empregando doses elevadas de MK-801 (mais que 1mg/kg) e CPP (5mg/kg), administradas sistemicamente, observaram, além de uma acentuada inibição do wind-up e uma diminuição significativa da resposta basal. Finalmente, resultados análogos aos

nossos foram obtidos por HALEY ET AL. (1990) e CODERRE & VAN EMPEL, (1994), os quais observaram uma inibição da primeira fase do teste da formalina com doses elevadas de MK-801. Vale ressaltar que apenas a segunda fase do teste da formalina é considerada dependente de receptores de NMDA (MURRAY ET AL., 1991 ; MJELLEM-JOLY ET AL., 1992 ; CODERRE & MELZACK, 1992 a ; b).

Assim, com base no exposto acima, é muito provável que a diminuição da resposta basal dos neurônios do subnúcleo oral, após a administração de MK-801, seja devido principalmente a um efeito inespecífico deste antagonista.

iii) Via de administração: considerando-se o fato da administração sistêmica de MK-801 não ter provocado diminuição da resposta basal dos neurônios do SP5O, em contraposição ao observado após a sua administração intranuclear no Sp5C, podemos supor que esta última via é mais específica para a indução do efeito produzido pelo MK-801. De fato, a administração sistêmica distribui a droga por todo tecido nervoso, especialmente para as regiões mais irrigadas. Assim, os receptores de NMDA encontrados nas camadas IV e V podem ser bloqueados mais facilmente que os receptores da estreita camada gelatinosa, o que não acontece com a administração intranuclear. Contudo, não podemos deixar de considerar que a administração sistêmica de doses mais elevadas de MK-801 possa resultar em uma diminuição significativa da resposta nociceptiva basal dos neurônios do Sp5O.

iv) Especificidade do subnúcleo caudal: apesar de não constarem na literatura dados suficientes demonstrando que os neurônios do Sp5C tenham propriedades nociceptivas diferentes dos neurônios do corno dorsal da medula, alguns poucos dados apontam para uma possível diferenciação destas duas estruturas do ponto de vista farmacológico. Por exemplo, em humanos, tem sido demonstrado que o agonista de receptores GABA_B (BACOFLEN) é mais eficaz na

nevralgia do nervo trigêmeo que nas outras nevralgias (FROMM ET AL., 1984 ; HUGHES, 1993 ; MISGELD ET AL., 1995). Analogamente aos nossos resultados, EISENBERG ET AL. (1993) observaram que a administração sistêmica de doses baixas de memantina (2,5 mg/kg) inibiram significativamente as duas fases da resposta induzida pela injeção de formalina na face. Estes autores demonstraram ainda, que a administração de doses elevadas deste antagonista não competitivo de NMDA (20 mg/kg), ocorria um bloqueio completo de ambas as fases da resposta à injeção de formalina na face. Não obstante os efeitos inespecíficos da memantina e do MK-801, os altos níveis de inibição das respostas nociceptivas orofaciais alcançados pela administração de antagonistas não-competitivos de NMDA, sugerem que o núcleo espinhal do trigêmeo difere do corno dorsal da medula espinhal, pelo menos do ponto de vista farmacológico.

Ainda com relação à administração de antagonistas de NMDA no Sp5C, os resultados deste trabalho mostraram que a injeção intranuclear de CGS19755 provocou uma inibição significativa do wind-up dos neurônios do Sp5O sem que houvesse, contudo, alterações na resposta basal destes neurônios (FIGURAS 15 e 18). Este resultado está de acordo com a maioria dos autores, os quais não constatarem diminuição da resposta basal dos neurônios nociceptivos após administração de diferentes antagonistas de receptores de NMDA (JEFTINJA & URBAN, 1994 ; ARENTD-NIELSEN ET AL., 1995 ; GERBER ET AL., 1991 ; DOUGHERTY ET AL., 1992 ; NEUGEBAUER ET AL., 1993b ; CODERRE & VAN EMPEL, 1994 ; EISENBERG ET AL., 1995). O CGS19755, um antagonista competitivo de receptor de NMDA tem sido considerado de alta especificidade (JEZIORSKI ET AL., 1994 ; MC FARLANE ET AL., 1995). Entretanto, alguns autores mostraram serem necessárias doses até 100 vezes maior de CGS19755 para se obter efeitos similares aos provocados pelo MK-801 (JEZIORSKI ET AL., 1994).

Deste modo, similarmente ao efeito observado após administração sistêmica de fracas doses do MK-801, a inibição do wind-up no Sp5O após a injeção de CGS19755 no Sp5C, comprova mais uma vez a grande sensibilidade dos neurônios nociceptivos do Sp5O aos antagonistas de receptor de NMDA.

Por outro lado, independentemente da sensibilidade dos neurônios do Sp5O aos antagonistas de NMDA, os resultados deste trabalho mostraram que o wind-up registrado no Sp5O é, em grande parte, dependente da atividade dos receptores de NMDA situados nos neurônios do Sp5C. A ausência (TALLAKSEN-GREENE ET AL., 1992) ou talvez a pequena densidade (PETRALIA ET AL., 1994) destes receptores no Sp5O, sugere que a camada gelatinosa do Sp5C (lâminas I e II), a qual é rica em receptores de NMDA (PETRALIA ET AL., 1994 a ; DOHRN & BEITZ, 1994 ; AMBALAVANAR & MORRIS, 1992), seja o sítio de produção do wind-up observado nos neurônios do Sp5O.

É importante ressaltar que o Sp5O é desprovido da camada gelatinosa e provavelmente não possui terminações primárias de fibras C (AMBALAVANAR & MORRIS, 1992), o que diminui a probabilidade do wind-up observado ter sido originado no próprio Sp5O. De certa forma, a ausência ou talvez a baixa densidade de receptores de NMDA no Sp5O, associados ao fenômeno do wind-up, pôde ser evidenciada pelos resultados obtidos neste trabalho, com a injeção intranuclear de MK-801 no Sp5O, a qual não provocou inibição do wind-up de seus neurônios (TABELA III). Contudo, consideramos que este dado necessite de confirmação utilizando-se outras técnicas de administração da droga, tal como a sua aplicação iontoforética no Sp5O.

Na década de setenta, DUBNER ET AL, (1978) demonstraram a existência de uma facilitação das respostas dos neurônios do Sp5O após a estimulações mecânicas branda aplicadas nos neurônios do Sp5C. Vale dizer que a idéia de um

controle do Sp5C sobre a atividade neuronal do Sp5O fora sugerida por SESSLE & GREENWOOD, (1976), porém não havia sido demonstrada.

Um dos principais fatores que dão sustentação a esta hipótese é a presença de uma grande quantidade de neurônios de associação intranucleares, que garantem a intercomunicação entre o Sp5C e o Sp5O demonstrada por diversos autores (NASUTION & SHIGENAGA, 1987 ; JACQUIN ET AL., 1990). Estes neurônios dão origem a fibras conhecidas como feixes profundos (deep bundles) os quais transmitem para as porções rostrais do núcleo espinhal as informações geradas nos neurônios do Sp5C, particularmente nas camadas IV e V (JACQUIN ET AL., 1993). É interessante notar que a citoarquitetura do Sp5O é muito semelhante à lâminas IV e V encontradas no Sp5C (PHÉLAND & FALLS, 1989 ; JACQUIN ET AL., 1993). Isto pode significar que o Sp5O pode ser uma “continuação” rostral das camadas IV e V do Sp5C.

Sendo assim, podemos supor que o grau de convergência das informações nociceptivas que chegam nos neurônios do Sp5O foi outro importante fator responsável pelos altos níveis de inibição do wind-up por nós registrado após a administração de antagonistas de NMDA. Isto é, uma vez que o subnúcleo oral não possui terminações de fibras C (AMBALAVANAR & MORRIS, 1992), as informações nociceptivas transmitidas pelos neurônios convergentes primários, chegariam inicialmente no subnúcleo caudal. Estas informações fazem suas primeiras sinapses na camada gelatinosa deste subnúcleo, onde o wind-up é gerado, e então via camadas IV e V, partem em direção do Sp5O, por meio dos feixes profundos (NASUTION & SHIGENAGA, 1987 ; JACQUIN ET AL., 1990 ; JACQUIN ET AL., 1993). Isto significa que o wind-up registrado em um único neurônio do Sp5O é decorrente da ativação de vários neurônios situados no Sp5C, mas que convergem em direção do Sp5O (FIGURA 3). Considerando que o wind-

up registrado nas camadas profundas do núcleo dorsal da medula é mais susceptível à ação de antagonistas de receptores de NMDA que os neurônios das camadas superficiais (DICKENSON & SULLIVAN, 1990), é provável que a inibição maciça do wind-up registrada nos neurônios do Sp5O, seja reflexo da inibição de um número maior de neurônios convergentes situados no Sp5C.

Recentemente, resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por DALLEL ET AL. (comunicação pessoal) demonstrando que a resposta nociceptiva dos neurônios do subnúcleo oral não são afetadas por injeções intranucleares de opióides, porém, esta resposta é totalmente inibida quando morfina é administrada no interior do Sp5C.

Enfim, com base nos resultados deste trabalho, podemos concluir que o Sp5O apesar de participarem das transmissões nociceptivas orofaciais, possui, contudo, uma função modulatória modesta. Por outro lado, a configuração da rede neuronal do núcleo espinhal do trigêmeo confere aos neurônios do Sp5O uma convergência maior das informações nociceptivas, quando comparada com a das camadas profundas do corno dorsal da medula espinhal. Isto, de certa forma, pode determinar algumas diferenças nas propriedades fisiológicas e farmacológicas do wind-up dos neurônios do Sp5O e consequentemente nas hiperalgesias orofaciais.

VI. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo do trabalho foi caracterizar o wind-up das fibras C nos neurônios convergentes do subnúcleo oral (Sp5O) do núcleo espinhal do trigêmeo, bem como elucidar os mecanismos de controle envolvidos neste fenômeno relacionado com as hiperalgesias orofaciais. Para isso foram utilizados métodos eletrofisiológicos com a finalidade de registrar a atividade unicelular de neurônios nociceptivos convergentes do Sp5O após estimulações elétricas aplicadas nos campos receptivos destes neurônios. Os estímulos elétricos aplicados foram em forma de ondas retangulares, com intensidade três vezes o limiar das fibras C, 2 ms de duração e frequência igual a 0,66 Hz. A participação dos receptores de NMDA na atividade dos neurônios nociceptivos do Sp5O foi analisada sob diferentes aspectos: i) após administração sistêmica do antagonista não competitivo de receptores de NMDA, MK-801 (0,15 mg/kg). ii) após injeção intranuclear no Sp5O de MK-801 (0,5µg). iii) após injeções intranucleares no subnúcleo caudal (Sp5C) de duas classes de antagonista de receptores de NMDA: MK-801 e CGS19755, um antagonista competitivo (0,5 µg e 20µg, respectivamente).

Os resultados demonstraram que :

- i) Os neurônios nociceptivos convergentes do Sp5O, exibem o fenômeno do wind-up com características muito semelhantes aos neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal.
- ii) A administração sistêmica de MK-801, inibe o wind-up e a pós-descarga sem alterar significativamente ($p < 0,05$) a resposta basal dos neurônios nociceptivos do Sp5O.
- iii) Apenas a injeção intranuclear no Sp5C inibe o wind-up registrado nos neurônios do Sp5O.

Com base na análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- i) Provavelmente o fenômeno do wind-up exibido pelos neurônios convergentes do Sp5O é originado na camada gelatinosa do Sp5C.
- ii) O Sp5O, participa efetivamente das transmissões das respostas nociceptivas do complexo sensorial do trigêmeo, contudo possui propriedades modulatórias modestas.
- iii) Os neurônios nociceptivos do Sp5O, provavelmente por estarem sujeitos a uma convergência maior que os neurônios do Sp5C ou os do corno dorsal da medula espinhal, parecem ser mais fortemente susceptíveis à ação de antagonistas de receptores de NMDA quando comparado aos demais neurônios nociceptivos. Isto confere uma característica fisiológica e farmacológica importante da dor orofacial.

VII. SUMMARY

The aim of this study was to characterize the C-fiber wind-up of the convergent neurons in subnucleus oralis of the trigeminal sensory complex, as well as to elucidate the control mechanisms involved in the phenomenon related to the orofacial hiperalgesias. Unitary extracellular recordings were performed on WDR oralis nociceptive neurons after electrical stimulation applied to their receptive field. Electrical rectangular wave stimuli were applied (0.66 Hz) at the 3 times the threshold for C-fiber activation. The involvement of the NMDA receptors in the responses of the oralis nociceptive neurons was evaluated under different aspects: i) C-fiber wind-up, ii) postdischarge, iii) baseline response, iv) the role of the NMDA receptors in subnucleus caudalis, v) the role of the NMDA receptors in subnucleus oralis, vi) the effect of the noncompetitive NMDA receptor, MK-801 (dizocilpina), injection into subnucleus caudalis.

The results suggested that:

- i) The convergent oralis nociceptive neurons exhibits a wind-up phenomenon analogous to that described in the neurons of the dorsal horn of the spinal cord, despite being devoid of NMDA receptors .
- ii) The systemic administration of MK-801, a noncompetitive NMDA receptor, strongly inhibits the wind-up and the afterdischarge without affecting significantly the baseline response of the oralis nociceptive neurons.
- iii) The microinjection of CGS19755, a competitive NMDA antagonist, within the subnucleus caudalis, inhibits the wind-up without affecting the baseline response of the oralis nociceptive neurons. However, the

microinjection of MK-801, at the same site, evoked a significant decrease of the baseline response of the neurons studied.

- iv) The microinjection of NMDA receptor antagonist within subnucleus oralis, apparently did not modify the oralis nociceptive responses.

Based on the results obtained, it is concluded that:

- i) The wind-up observed on convergent neurons of the subnucleus oralis originates at the substantia gelatinosa of the subnucleus caudalis.
- ii) Although the subnucleus oralis plays a role on the transmission of the nociceptive responses of the trigeminal sensory complex and on C-fiber wind-up, it possibly does not modulate orofacial pain.
- iii) The oralis nociceptive neurons appear to be analogous to the neurons found in laminae V of subnucleus caudalis. However, they seem to be much more related to the NMDA receptors than the other nociceptive neurons of the trigeminal sensory complex or of the dorsal horn of the spinal cord.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- AMANO, N.; HU, J.W. & SESSLES, B.J. Responses of neurons in feline trigeminal subnucleus caudalis (Mesullary Dorsal Horn) to cutaneous, intraoral, and muscle afferent stimuli. *J. Neurophysiology*, 55(2): 227, 1986.
- AMBALAVANAR, R. & MORRIS, R. The distribution of binding by isolectin I-B4 from Griffonia Simplicifolia in the trigeminal nuclei in the rat. *Neuroscience*. 47: 421-429, 1992.
- ARENDT-NIELSEN, L. & PETERSEN-FELIX, S. Wind-up and neuroplasticity: is there a correlation to clinical pain? *European Journal of Anaesthesiology*, 12(10):1-7, 1995.
- ARENDT-NIELSEN, L.; PETERSEN-FELIX, S.; FISCHER, M.; BAK, P.; BJERRING, P. & ZBINDEN, A.M. The effect of *N*-methyl-D-aspartate antagonist (ketamine) on single and repeated nociceptive stimuli: a placebo-controlled experimental human study. *Anesth analg*, 81:63-8, 1995.
- AZERAD, J.; WODA, A. & ALBE-FESSARD, D. Physiological properties of neurons in different parts of the cat trigeminal sensory complex. *Brain Research*, 246: 7-21, 1982.
- BARTES, C.A. & KILLACKY, H.P. The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex a its role in the formation of central trigeminal patterns. *J. Comp. Neurol.* 240: 265-280, 1995.
- BENEDEK, G. & SZIKSZAY, M. Potentiation of thermoregulatory and analgesic effects of morphine by calcium antagonists. *Pharmacol. Res. Commun.* 16: 1009-1017, 1984.
- BENOIST, J.M.; KAYSER, V.; GAUTRON, M.; GUILBAUD, G. Letter to editor. *Pain* 18: 410-411 (1984).
- BENVENISTE, M. & MAYER, M.L. Kinetic analysis of antagonist action at *N*-methyl-D-aspartate acid receptors. *Biophys J.* 59: 560-573, 1991.

- BENVENISTE, M. & MAYER, M.L. Structure-activity analysis of binding kinetics for NMDA receptor competitive antagonists: the influence of conformational restriction. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 207-221, 1991.
- BEREITER, D.A. Microinjections of glutamate within trigeminal subnucleus interpolaris alters adrenal and autonomic function in the cat. *Brain Research*, 622: 155-162, 1993.
- BETTLER, B. & MULLE, C. Review: Neurotransmitter receptors II AMPA and Kainate Receptors. *Neuropharmacology*, 34(2): 123-139, 1995.
- BUDAI, D. A computer-controlled system for post-stimulus time histogram and wind-up studies. *Journal Neuroscience Methods*, 51:205-211, 1994.
- BULLER, A.L.; LARSON, C.H.; SCHNEIDER, B.E.; BEATON, J.A.; MORRISETT, R.A. & MONAGHAN, D.T. The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J. Neuroscience*, 14(9): 5471-5484, 1994.
- CADET, R.; AIGOUY, L. & WODA, A. Sustained hyperalgesia can be induced in the rat by a single formalin injection and depends on the initial nociceptive inputs. *Neuroscience Let.*, 156: 43-46, 1993.
- CAHUSAC, P.M.B.; MORRIS, R.; SALT, T.E. & HILL, R.G. Sensory responses of caudal trigeminal neurons to thermal and mechanical stimuli and their behavioural correlates in the rat. *Neuroscience*, 36(2):543-551, 1990.
- CARLTON, S.M. & HARGETT, G.L. Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. *Neuroscience Let.*, 198: 115-118, 1995.
- CERNE, R.; RUSIN, K.I. & RANDIÉ, M. Enhancement of the *N*-methyl-D-aspartate response in spinal dorsal horn neurons by cAMP-dependent protein kinase. *Neuroscience Let.*, 161: 124-128, 1993.
- CHAPMAN, V. & DICKENSON, A.H. Enhanced responses of rat dorsal horn neurones after UV irradiation of the hindpaw; roles of the NMDA receptor. *Neuroscience Let.*, 176:41-44, 1994.

- CHAPMAN, V. & DICKENSON, A.H. The combination of NMDA antagonism and morphine produces profound antinociception in the rat dorsal horn. *Brain Research*, 573: 321-323, 1992.
- CHAPMAN, V.; DICKENSON, A.H. & TJOLSEN, A. Bi-directional effects of intrathecal NMDA and substance P on rat dorsal horn neuronal responses. *Neuroscience Let.*, 178(1):90-4, 1994.
- CHAPMAN, V.; HALEY, J.E. & DICKENSON, A.H. Electrophysiologic analysis of preemptive effects of spinal opioids on *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated events. *Anesthesiology*, 81(6): 1429-35, 1994.
- CHAZOT, P.L.; COLEMAN, S.K.; CIK M. & STEPHENSON, F.A. Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptor expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *J.Biol.Chem.* 269: 2403-2409 (1994).
- CHAZOT, P.L.; COLEMAN, S.K.; CIK, M.; STEPHENSON, F.A. Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *J. Biol. Chem.* 269: 24403-24409, 1994.
- CHEN, L. & HUANG, L-Y.M. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a μ opioid. *Neuron*, 7: 319-326, 1991.
- CLEMENTS, J.D. & WESTBROOK, G.L. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron*, 7: 605-613, 1991.
- CODERRE, T.J. & EMPEL, I.V. 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.
- CODERRE, T.J. & EMPEL, I.V. 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*, 59: 353-359, 1994.

- CODERRE, T.J. & MELZACK, R. Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neuroscience Let.*, 131: 71-74, 1991.
- CODERRE, T.J. & MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neuroscience*, 12(9): 3665-3670, 1992 a.
- CODERRE, T.J. & MELZACK, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neuroscience*, 12(9): 3671-3675, 1992 b.
- CODERRE, T.J. Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury. *Neuroscience Let.*, 140: 181-184, 1992.
- CODERRE, T.J.; KATZ J.; VACCARINO A.L. & MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*, 52:259-285, 1993.
- CODERRE, T.J.; VACCARINO, A L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res.* 535: 155-158, 1990.
- COGGESHALL, R.E. & CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res. Rev.* 24: 28-66, 1997.
- COLLINGRIDGE, G.L.; BLISS, T.V. NMDA receptors, their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 10: 288-293, 1987.
- CONTRERAS, E.; TAMOYO, L.; AMIGO, M. Calcium channel antagonists increase morphine-induced analgesia and antagonize morphine tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 463-466, 1988.
- CRAIG A.D. Pain, temperature and the sense of the body. In: Frazen O, Johansson R, Terenius L, eds. *Proceeding of the 1994 Wenner-Gren Symposium on Somatosensation*. Basel: Birkhäuser, 1995.

- DAHL, J.B. Neuronal plastic and pre-emptive analgesia: implications for the management of postoperative pain. *Danish Medical Bulletin*, 41(4): 434-442, 1994.
- DAHL, J.B.; ERICHSEN, C.J.; FUGLSANG-FREDERIKSEN, A. & KEHLET, H. Pain sensation and nociceptive reflex excitability in surgical patients and human volunteers. *British J. Anaesthesia*, 69: 117-121, 1992.
- DALLEL, R.; CLAVELOU, P. & WODA, A. Effects of tractotomy on nociceptive reactions induced by tooth pulp stimulation in the rat. *Experimental Neurology*. 106:78-84, 1989.
- DALLEL, R.; RABOISSON, P.; AUROY, P. & WODA, A. The rostral part of the trigeminal sensory somplex is involved in orofacial nociception. *Brain Research*, 448:7-19, 1988.
- DALLEL, R.; RABOISSON, R.D.; WODA, A. & SESSLE, B.J. Properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis of the rat. *Brain Research*. 521: 95-106, 1990.
- DALO, N.L. & LARSON, A.A. Effects of urethane and ketamina on substance P and excitatory amino acid-induced behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 184: 173-177, 1990.
- DAVIES, S.N. & LODGE, D. Evidence for involvement of *N*-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Research*, 424:402-406, 1987.
- DICHENSON A.H.; SULLIVAN, A.F.; STANFA, L.C. & McQUAY, H.J. Dextromethorphan and levorphanol on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Neuropharmacology*, 30(12A): 1303-1308, 1991.
- DICKENSON, A. & SULLIVAN, A. NMDA receptors and central hyperalgesic states. *Pain*, 46: 344-345, 1991.
- DICKENSON, A.H. & AYDAR, E. Antagonism at the glycine on the NMDA receptor reduces spinal nociception in the rat. *Neuroscience Let.*, 121: 263-266, 1991.

- DICKENSON, A.H. & Le BARS, D. Diffuse nocious inhibitory controls (DNIC) involve trigeminothalamic and spinothalamic neurones in the rat. *Exp Brain Res*, 49:174-180, 1983.
- DICKENSON, A.H. & SULLIVAN, A.F. Electrophysiological studies on the effects of intrathecal morphine on nociceptive neurones in the rat dorsal horn. *Pain*, 24:211-222, 1987.
- DICKENSON, A.H. Spinal cord pharmacology of pain. *British Journal of Anaesthesia*, 75: 193-200, 1995.
- DICKENSON, A.H.; & SULLIVAN, A.F. Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Brain Research*, 506: 31-39, 1990.
- DOHRN, C.S. & BEITZ, A.J. Differential NMDA NR1 mRNA expression among spinal trigeminal neurons that project to different targets. *Neuro Report*, 5: 1857-1869, 1994.
- DOUGHERTY, P.M. & WILLIS, W.D. Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of *N*-methyl-D-aspartate acid and substance P. *Pain*, 47: 85-93, 1991.
- DOUGHERTY, P.M.; PALECEK, J.; PALECKOVA, V.; SORKIN, L.S. & WILLIS, W.D. The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the excitation of primate spinothalamic tract neurons by mechanical, chemical, thermal, and electrical stimuli. *J. Neuroscience*, 12(8): 3025-3041, 1992.
- DOUGHERTY, P.M. & WILLIS, W.D. Modification of the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical stimulation by excitatory amino acids and an *N*-methyl-D-aspartate antagonist. *Brain Research*, 541: 15-22, 1991.
- DRAY, A.; URBAN, L. & DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. *Tips*, 15: 190-97, 1994.
- DUBNER, R.; SESSLE, B.J.; STONEY, A.T. The neural basis of oral and facial function. *Plenum Press*, New York and London. 483pp. 1978.
- EATON, S.A. & SALT, T.E. Membrane and action potential responses evoked by excitatory amino acids acting at *N*-methyl-D-aspartate receptors and non-

- N*-methyl-D-aspartate receptors in the rat thalamus in vivo. *Neuroscience*, 44(2):277-286, 1991.
- EDMONDS, B.; GIBB, A.J. & COLQUHOUN, D. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu. Rev. Physiol.*, 57:495-519, 1995.
- EISENBERG, E.; LaCROSS, S. & STRASSMAN, A.M. The clinically tested *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine blocks and reverses thermal hyperalgesia in a rat model of painful mono-neuropathy. *Neuroscience Let.*, 187: 17-20, 1995.
- EISENBERG, E.; VOS, B.P. & STRASSMAN, A.M. The NMDA antagonist memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. *Pain*, 54: 310-307, 1993.
- ELLIOTT, K.; KEST, B.; MAN, A.; KAO, B. & INTURRISI, C. *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, Mu and kappa opioid tolerance, and perspectives on new analgesic drug development. *Neuropharmacology*, 13(4): 348-355, 1995.
- FALLS, W.M. Morphology and synaptic connections of unmyelinated primary axons in the border zone of rat trigeminal nucleus oralis. *Neuroscience Let.*, 70: 342-347, 1986.
- FALLS, W.M. Synaptic organization of primary axons in trigeminal nucleus oralis. *Journal of electron Microscopy Technique*, 10:213-227, 1988.
- FALLS, W.M. Axonal endings terminating on dendrites of identified large trigeminospinal projection neurons in rat trigeminal nucleus oralis. *Brain Research*, 324: 335-341, 1984.
- FALLS, W. Termination in trigeminal oralis of ascending intratrigeminal axons originating from neurons in the medullary dorsal horn: an HRP study in the rat employing light and electron microscopy. *Brain Research*, 290: 136-43, 1984.
- FARKAS, S. & ONO, H. Participation of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the mediation of spinal reflex potentials in rats: an *in vivo* study. *Br. J. Pharmacology*, 114:1193-1205, 1995.

- FERREIRA, S.H. & LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology*, 33(11): 1479-1485, 1994.
- FERREIRA, S.H. & LORENZETTI, B.B. Intrathecal administration of prostaglandin E₂ causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm. Res.* 45: 499-502, 1996.
- FIX, A.S.; HORN, J.W.; WIGHTMAN, K.A.; JOHNSON, C.A.; LONG, G.G.; STORTS, R.; FARBER, N.; WOZNIAK, D.F. & OLNEY, J.W. Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK-801 (Dizocilpine Maleate): A light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Experimental Neurology*, 123: 204-215, 1993.
- FRASER, H.M.; CHAPMAN, V. & DICKENSON, A.H. Spinal local anaesthetic actions on afferent evoked responses and wind-up of nociceptive neurones in the rat spinal cord: combination with morphine produces marked potentiation of antinociception. *Pain*, 49:33-41, 1992.
- FROMM, G.H.; TERRENCE, C.F. & CHATTHA, A.S. Baclofen in the treatment of face pain: a double-blind and long-term follow-up. *Annals of Neurology* 15: 240-244, 1984.
- GERBER, G.; CERNE R. & RANDIÉ M. Participation of excitatory amino acid receptors in the slow excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn. *Brain Research*, 561:236-251, 1991.
- GERBER, G.; KANGRGA, I.; RYU, P.D.; LAREW, J.S.A. & RANDIC, M. Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. *J. Neuroscience*, 9(10): 3603-3617, 1989.
- GHORPADE A. & ADVOKAT, C. Evidence of a role for *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the facilitation of tail withdrawal after spinal transection. *Pharm. Bioch. and Behavior*, 48(1): 175-181, 1994.
- GRAHAM, S.H.; SHARP, F.R. & DILLON, W. Intraoral sensation in patients with brainstem lesions: Role of the rostral spinal trigeminal nuclei in pons. *Neurology*, 38: 1529, 1988.

- GREENE-TALLAKSEN, S.J.; YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B. & BEITZ, A.J. Excitatory amino acid binding sites in the trigeminal principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat. *Neuroscience Let.*, 141: 79-83, 1992.
- GUILBAUD, G.; PESCHANSKI, M.; GAUTRON, M. Functional changes in ventrobasal thalamic neurones responsive to noxious and non-noxious cutaneous stimuli after chloralose "silent connections" in the adult nervous system? *Pain*, 11: 9-11, 1981.
- GUIRRIMAND, F. & D Le BARS. Physiologie de la nociception. *Ann Fr Anesth Réanim*, 15:1048-1079, 1996.
- HALEY, J.; SULLIVAN, A.F. & DICKENSON, A.H. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Research*, 518: 218-226, 1990.
- HAMBA, M.; HISAMITSU, H. & MURO, M. Wind-up of tooth pulp-evoked responses and its suppression in rat trigeminal caudal neurons. *Brain Research Bulletin*, 29:883-889, 1992.
- HILL, R.G. & SALT, T.E. An ionophoretic study of the responses of rat caudal trigeminal nucleus neurones to non-noxious mechanical sensory stimuli. *J. Physiol.*, 327:65-78, 1982.
- HOCKFIELD, SUSAN & GOBEL, STEPHEN, S. An Anatomical demonstration of projections to the medullary dorsal horn (trigeminal nucleus caudalis) from rostral trigeminal nuclei and the contralateral caudal medulla. *Brai Research*, 252: 203-211, 1982.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *A. Res. Neurosci.*, 17: 31-108, 1994.
- HONG, Y. & HENRY, J.L. Glutamate, NMDA and NMDA receptor antagonists: Cardiovascular effects of intrathecal administration in the rat. *Brain Research*, 569: 38-45, 1992.
- HU, J.W. & SESSLE, B.J. Effects of tooth pulp deafferentation on nociceptive and nonnociceptive neurons of the feline trigeminal subnucleus caudalis (Medullary Dorsal Horn). *J. Neurophysiology*, 61(6): 1197, 1989.

- HU, J.W. & SESSLE, B.J. Comparison of responses of cutaneous nociceptive and nonnociceptive brain stem neurons in trigeminal subnucleus caudalis (Medullary Dorsal Horn) and subnucleus oralis to natural and electrical stimulation of tooth pulp. *J. Neurophysiology*, 52: 1984.
- HU, J.W.; DOSTROVSKY, J.O.; LENZ, Y.E.; BALL, G.J. & SESSLE, B.J. Tooth pulp deafferentation is associated with functional alterations in the properties of neurons in the trigeminal spinal tract nucleus. *J. Neurophysiology*, 56(6):1650, 1986.
- HU, J.W.; SESSLE, B.J.; RABOISSON, P.; DALLEL, R.; WODA, A. Stimulation of craniofacial afferents induces prolonged facilitatory effects in trigeminal nociceptive brainstem neurones. *Pain* 48: 53-60, 1992.
- HU, J.W.; SHARAV, Y. & SESSLE, B.J. Effects of one-or two-stage deafferentation of mandibular and maxillary tooth pulps on the functional properties of trigeminal brainstem neurons. *Brain Research*, 516: 271-279, 1990.
- HU, W.J. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain*, 41:331-345, 1990.
- HU, J.W. & SESSLE, B. Comparison of responses of cutaneous nociceptive and nonnociceptive brain stem neurons in trigeminal subnucleus caudalis (Medullary Dorsal Horn) and subnucleus oralis to natural and electrical stimulation of tooth pulp. *J. Neurophysiology*, 52(1): 39, 1984.
- HUGHES, R.A.C. Diseases of the fifth cranial nerve. In: *Peripheral neuropathy*. Dyck P.J. & Thomas P.K. eds., Saunders, Philadelphia, 1993.
- HUTCHISON, G.L.; CROFTS, S.L. & GRAY, I.G. Preoperative piroxicam for postoperative analgesia in dental surgery. *Br. J. Anaesthesia*. 65:600-503, 1990.
- IVERSEN, L.L. MK-801 (Dizocilpine Maleate) - NMDA receptor antagonist. *Res. Bioch. Intern.* 10(1): 1-7, 1994.

- JACQUIN, M.F. & RHOADES, R.W. Cell structure and response properties in the trigeminal subnucleus oralis. *Somatosensory and Motor Research*, 7(3): 265-288, 1990.
- JACQUIN, M.F.; CHIAIA, N.L.; HARING, J.H. & RHOADES, R.W. Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosensory and Motor Research*, 7(4): 399-420, 1990.
- JACQUIN, M.F.; RENEHAN, W.E.; RHOADES, R.W. & PANNETON, W.M. Morphology and topography of identified primary afferents in trigeminal subnuclei principalis and oralis. *J. Neurophysiology*. 70(5): 1993.
- JANICE, K.R.; HYLDEN, L.K.; WILLIAMS, G.M.; RUDA, M.A. & DUBNER, R. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain*, 50: 331-344, 1992.
- JEFTINIJA, S. & URBAN, L. Repetitive stimulation induced potentiation of excitatory transmission in the rat dorsal horn: an *in vitro* study. *J. Neurophysiol.*, 71(1): 216-28, 1994.
- JEFTINIJA, S. Excitatory transmission in the dorsal horn is in part mediated through APV-sensitive NMDA receptors. *Neuroscience Let.*, 96: 191-196, 1989.
- KANGRGA, I. & RANDIC, M. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *J. Neuroscience*, 10(6): 2033, 1990.
- KLEPSTAD, P.; MAURSET, A.; MOBERG E.R.; & OYE, I. Evidence of a role for NMDA receptors in pain perception. *Eur. J. Pharmacology*, 187:513-518, 1990.
- KOJIMA, Y. Convergence patterns of afferent information from the temporomandibular joint and masseter muscle in the trigeminal subnucleus caudalis. *Brain Research*, 24: 609-616, 1990.
- KONDO, E.; KIYAMA, H.; YAMANO, M.; SHIDA, T.; UEDA, Y. & TOHYAMA, M. Expression of glutamate (AMPA type) and y-aminobutyric

acid (GABA)_A receptors in the rat caudal trigeminal spinal nucleus. *Neuroscience Lett.*, 186:169-172, 1995.

KRISTENSEN, J.D.; SVENSSON, B. & GORDH JR., T. The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain*, 51: 249-253, 1992.

KUS, L.; SANDERSON, J.J. & BEITZ, A.J. *N*-methyl-D-aspartate R1 messenger RNA and [¹²⁵I]MK-801 binding decrease in rat spinal cord after unilateral hind paw inflammation. *Neuroscience*, 68(1):159-165, 1995.

KWAN, C.L.; HU, J.W. & SESSLE, B.J. Effects of tooth pulp deafferentation on brainstem neurons of the rat trigeminal subnucleus oralis. *Somatosensory and Motor Research*. 10(2):115-131, 1993.

KYROZIS, A.; GOLDSTEIN, P.A.; HEATH, M.J.S. & MacDERMOTT, A.B. Calcium entry through a subpopulation of AMPA receptors desensitized neighbouring NMDA receptors in rat dorsal horn neurons. *J. Physiology*, 485(2): 373-381, 1995.

KYROZIS, A.; GOLDSTEIN, P.A.; HEATH, M.S.J.; MACDERMOTT, A.B. Calcium entry through a subpopulation of AMPA receptors desensitized neighbouring NMDA receptors in rat dorsal horn neurons. *J. Physiology*. 485(2): 373-381, 1995.

LAMOTTE, R.H.; SHAIN, C.N.; SIMONE, D.A.; TSAI, E.F.P. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J. Neurophysiology*. 66: 190-211, 1991.

LE BARS, D.; DICKENSON, A.H.; BESSON, J.M. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6: 283-304, 1979.

LE BARS, D.; GUILBAUD, G.; CHITOUR, D. & BESSON, J.M. Does systemic morphine increase descending inhibitory controls of dorsal horn neurones involved in nociception ? *Brain Research*. 202: 223-228, 1980.

LE BARS, D.; GUILBAUD, G.; CHITOUR, D.; BESSON, J.M. Does systemic morphine increase descending inhibitory controls of dorsal horn neurones involved in nociception? *Brain Research*. 202: 223-228, 1980.

- LIU, X.G. & SANDKÜHLER J. Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal *N*-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neuroscience Lett.*, 191:43-46, 1995.
- MALENKA, R.C. & NICOLL, R.A. NMDA-deceptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Neuroscience*, 16(12): 521-527, 1993.
- MANFURT, C.F. & RAJCHERT, D.M. Trigeminal primary afferent projections to "non-trigeminal" areas of the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 303: 489-511, 1991.
- MAX, M.B.; BYAS-SMITH, M.G.; GRACELY, R.H. & BENNETT, G.J. Intravenous infusion theNMDA antagonist, ketamine, in chronic posttraumatic pain with allodynia: a double-blind comparison to alfentanil and placebo. *Clinical Neuropharmacology*, 18(4): 360-368, 1995.
- McDONALD, J.W.; SILVERSTEIN, F.S. & JOHNSTON, M. Neuroprotective effects of MK-801, TCP, PCP and CPP against *N*-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in an in vivo perinatal rat model. *Brain Research*, 490: 33-40, 1989.
- McFARLANE, C.; WARNER, D.S. & DEXTER, F. Interactions between NMDA and AMPA glutamate receptor antagonists during halothane anesthesia in the rat. *Neuropharmacology*, 34(6):659-663, 1995.
- MELLER, S.T. & GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, 52 : 127-136, 1993.
- MELZACK, R. & TORGENSEN, W.S. On the language of pain. *Anesthesiology* 34: 50-59, 1971.
- MENDELL, L.M. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Experimental Neurology*, 16:316-332, 1966.
- MEYER, E.A.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of Pain*. New York, Edinburgh: Churchill Livingstone, 3rd edition: 13-44, 1994.

- MIRANDA, H.F.; BUSTAMANTE, D.; KRAMER, V.; PELISSER, T.; SAAVEDRA, H.; PAEILE, C.; FERNANDEZ, E.; PINARDI, G. Antinociceptive effects of Ca^{2+} channel blockers. *Eur. J. Pharmacol.* 217: 137-141, 1992.
- MISGELD, U.; BIJAK, M. & JAROLIMEK, K.A. physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 46: 423-426, 1995.
- MJELLEM-JOLY, N.; LUND, A.; ODD-GEIR, B. & HOLE, K. Intrathecal co-administration of substance P and NMDA augments nociceptive responses in the formalin test. *Pain*, 51: 195-198, 1992.
- MONAGHAN, D.T.; BRIDGES, R.J.; COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology nervous system. *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402, 1989.
- MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURID, J.; SAKMANN, B. & SERBERG P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12: 529-540, 1994.
- MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURIE, D.J.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-540, 1994.
- MORI, H. & MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34(10): 129-137, 1995.
- MORIMOTO, K.; KATAYAMA, K.; INOUE, K. & SATO, K. Effects of competitive and noncompetitive NMDA receptor antagonists on kindling and LTP. *Phram. Bioch. and Behavior*, 40: 893-899, 1991.
- MULLE, C. & BETTLER, B. Review: Neurotransmitter receptors II AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 34(2): 123-139, 1995.
- MURASE, K.; RYU, P.D. & RANDIC, M. Excitatory and inhibitory amino acids and peptide-induced responses in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. *Neuroscience Lett.*, 103: 56-63, 1989.

- MURRAY, C.W.; COWAN, A. & LARSON, A.A. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic acid antagonist are antinociceptive in the mouse formalin model. *Pain*, 44: 179-185, 1991.
- NÄSSTRÖM, J.; KARLSSON, U. & POST, C. Antinociceptive actions of different classes of excitatory amino acid receptor antagonists in mice. *Eur. J. Pharmacology*, 212: 21-29, 1992.
- NASUTION, I.D. & SHIGENAGA, Y. Ascending and descending internuclear projections within the trigeminal sensory nuclear complex. *Brain Research*, 425: 234-247, 1987.
- NEUGEBAUER, V.; KORNHUBER, J.; LUCKE, T. & SCHAIBLE, H-G. The clinically available NMDA receptor antagonist memantine is antinociceptive on rat spinal neurones. *Neuro Report*, 4(11): 1259, 1993.
- NEUGEBAUER, V.; LÜCKE, T. & SCHAIBLE, H-G. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J. Neurophysiology*, 70(4): 1365-1377, 1993.
- OLNEY, J.W.; LABRUYERE, J.; WANG, G.; WOSNIAK, D.F.; PRICE, M.T. & SESMA, M.A. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Repeint Series*, 254: 1515-1518, 1991.
- OLSZEWSKI, J. On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 92: 404-413, 1950.
- PANNETIN, W.M. & BURTON, H. Origin of ascending intratrigeminal pathways in the cat. *Brain Research*, 236: 463-470, 1982.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*, New York. 1986.
- PETRALIA, R.S.; WANG, Y.X. & WENTHOLD, R.J. The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J. Neuroscience*, 14(10):6102-6120, 1994.

- PETRALIA, R.S.; YOKOTANI, N. & WENTHOLD, R.J. Light and electron Microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J. Neuroscience*, 14(2): 667-696, 1994.
- PHELAND, K.D. & FALLS, W.M. The interstitial system of the spinal trigeminal tract in the rat: Anatomical evidence for morphological and functional heterogeneity. *Somatosens. Mot. Res.* 6: 367-399, 1989.
- PIN, J.P. & DUVOISIN R. Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34(1):1-26, 1995.
- POCKETT, S. Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. *Anesth Analg*, 80:173-9, 1995.
- PRICE, D.D.; MAO, J.; FRENK, H. & MAYER, D.J. The Nmethyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan selectively reduces temporal summation of second pain in man. *Pain*, 59(2):165-74, 1994.
- RABOISSON, P.; BOURDIOL, P. DALLEL, R.; CLAVELOU, P. & WODA, A. Responses of trigeminal subnucleus oralis nociceptive neurones to subcutaneous formalin in the rat. *Neuroscience Lett.*, 125: 179-182, 1991.
- RABOISSON, P.; DALLEL, R.; CLAVELOU, P.; SESSLE, B.J. & WODA, A. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat. *J. Neurophysiology*, 73(2): 496, 1995.
- RADHAKRISHNAN, V. & HENRY, J.L. Excitatory amino acid receptor mediation of sensory inputs to functionally identified dorsal horn neurons in cat spinal cord. *Neuroscience* 55: 531-544, 1993.
- RANG H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of Pain*. New York, Edinburgh: Churchill Livingstone, 3rd edition: 57-78, 1994.
- REICHLING, D.B. & MacDERMOTT, A.B. NMDA receptor-mediated calcium entry in the absence of AMPA receptor activation in rat dorsal horn neurons. *Neuroscience Lett.*, 204:17-20, 1996.

- REN, K. Wind-up and the NMDA receptor: from animal studies to humans. *Pain*, 59 (2):157-8, 1994.
- REY, R. *Histoire de la Douleur*. Paris: La découverte, 1993.
- RICHARDS, C.D. & SMAJE, J.C. Anaesthetics depress the sensitivity of cortical neurones to L-glutamate. *Br. J. Pharmacol.* 58: 347-357, 1976.
- ROCK, D.M. & MACDONALD, R.L. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 463-82, 1995.
- RUSIN, K.I.; BLEAKMAN, D.; CHARD, P.S.; RANDIC, M. & MILLER, R.J. Tachykinins potentiate *N*-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated neurons from the dorsal horn. *J. Neurochemistry*, 1993.
- RUSIN, K.I.; JIANG, M.C.; CERNE, R. & RANDIC, M. Interactions between excitatory amino acids and tachykinins in the rat spinal dorsal horn. *Brain Research Bulletin*. 30: 329-338, 1993.
- SAKURADA, K.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Alteration of Ca^{2+} permeability and sensitivity to Mg^{2+} and channel blockers by a single amino acid substitution in the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 410-415, 1993.
- SALT, T.E. & EATON, S.A. Sensory excitatory postsynaptic potentials mediated by NMDA and non-NMDA receptors in the thalamus in vivo. *Eur. J. Neuroscience*, 3: 296-300, 1990.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. *Fundam Clin Pharmacol*, 7:389-400, 1993.
- SCHAIBLE, H-G.; GRUBB, B.D.; NEUGEBAUER, V. & OPPMAN, M. The effects of NMDA antagonists on neuronal activity in cat spinal cord evoked by acute inflammation in the knee joint. *Eur. J. Neuroscience*, 3: 981-991, 1991.
- SESSLE, B.J. & GREENWOOD, L.F. Inputs to trigeminal brain stem neurones from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues: 1. Responses to innocuous and noxious stimuli. *Brain Res.* 117: 211-226, 1976.

- SESSLE, B.J. Neurobiology of facial and dental pain: present knowledge. Future direction. *J. Dent Res.* 66(5):962-981, 1987.
- SESSLE, B.J. The neurobiology of facial and dental pain: present knowledge, future directions. *Neurobiol. Facial and Dental Pain*, 66(5):962-981, 1986.
- SESSLE, B.J.; HU, J.W.; AMANO, N. & ZHONG, G. Convergence of cutaneous, tooth pulp, visceral, neck and muscle afferents onto nociceptive and non-nociceptive neurones in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and its implications for referred pain. *Pain*, 27: 219-235, 1986.
- SHORTLAND, P.J.; De MARO, J.A. & JACQUIN, M.F. Trigeminal structure-function relationships: A reevaluation based on on-range staining of a large sample of brainstem A β fibres. *Somatosensory and Motor Research*, 12: (3-4), 249-275, 1995.
- SKILLING, S.R.; HARKNESS, D.H. & LARSON, A.A. Experimental peripheral neuropathy decreases the dose of substance P required to increase excitatory amino acid release in the CSF of the rat spinal cord. *Neuroscience Lett.*, 139: 92-96, 1992.
- SKILLING, S.R.; SMULLIN, D.H. & LARSON, A.A. Differential effects of C- and N- terminal substance P metabolites on the release of amino acid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. *J. Neuroscience*, 10(4):1309-1318, 1990.
- SULLIVAN, A.F.; KALSO, E.A.; McQUAY, H.J. & DICHENSON, A.H. The antinociceptive actions of dexmedetomidine on dorsal horn neuronal responses in the anaesthetized rat. *Eur. J. Pharmacology*, 215:127-133, 1992.
- TALLAKSEN-GREENE, S.L.; YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B.; BEITZ, A.J. Excitatory amino acid binding sites in the trigeminal principal sensory and spinal trigeminal nuclei of rat. *Neuroscience Lett.* 141: 79-83, 1992.
- THOMPSON, S.W.; DRAY, A.; McCARSON, K.E.; KRAUSE, J.E. & URBAN, L. Nerve growth factor induces mechanical allodynia associated with novel A fibre-evoked spinal reflex activity and enhanced neurokinin-1 receptor activation in the rat. *Pain*, 62(2): 219-31, 1995.

- THOMPSON, S.W.N.; DRAY, A. & URBAN, L. Injurt-induced plasticity of spinal reflex activity: NK1 neurokinin receptor activation and enhanced A- and C-Fiber mediated responses in the rat spinal cord in vitro. *J. Neuroscience*, 14(6): 3672-3687, 1994.
- THOMPSON, S.W.N.; KING, A.E. & WOOLF, C.J. Activity-dependent changes in rat ventral horn neurons in vitro; summation of prolonged afferent evoked postsynaptic depolarizations produce a D-2-amino-5-phosphonovaleric acid sensitive windup. *Eur. J. Neuroscience*, 2:638-649, 1990.
- TOREBJÖRK, H.E.; LUNDEBERG, L.; LAMOTTE, R.H. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J. Physiology*. 448: 765-780, 1992.
- TORNECK, C.D.; KWAN, C.L. & HU, J.W. Inflammatory lesions of the tooth pulpl induce changes in brainsten neurons of the rat trigeminal subnucleus oralis. *J. Dent Res*. 75(1):553-561, 1996.
- TSURU, K.; OTANI, K.; KAJIYAMA, K.; SUEMUNE, S. & SHIGENAGA, Y. Central terminations of periodontal mechanoreceptive and tooth pulp afferents in the trigeminal principal and oral nuclei. *Brain Research*. 485:29-61, 1989.
- UJIHARA, H.; SASA, M.; FUJITA, Y & TAKAORI, S. Opioid-mediated inhibition from the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus to the neurons in the subnucleus oralis. *Brain Research*, 418:52-57, 1987.
- URBAN, L.; THOMPSON, S.W.N. & DRAY, A. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *TINS*, 17(10): 432-438, 1994.
- VACCARINO, A.L. & MELZACK, R. Temporal processes of formalin pain: differential role of the cingulum bundle, fornix pathway and medial bulboreticular formation. *Pain* 44: 257-271, 1992.
- VACCARINO, A.L.; MAREK, P.; STERNBERG, W. & LIEBESKIND, J.C. NMDA receptor anatgonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia in the formalin test. *Pain*, 50: 119-123, 1992.

- WALL, P.D. Introduction. In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of Pain*. New York: Churchill Livingstone: 1-18, 1989.
- WANG, Y.; BOSY, T.Z.; YASUDA, R.P.; GRAYSON, D.E.; VICINI, S.; PIZZORUSSO, T. & WOLFE, B.B. Characterization of NMDA receptor subunit-specific antibodies: distribution of NR2A and NR2B receptor subunits in rat brain and ontogenic profile in the cerebellum. *J. Neurochemistry*, 1995.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HOORÉ, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 25-33, 1990.
- WILCOX, G.L. Excitatory neurotransmitters and pain. IN: M.R. Bond, J.E. Charlton & J. Woolf (eds.) *Proceedings of the VIth World Congress on Pain*. Elsevier Science Publishers BV, (12) 1991.
- WILCOX, G.L. Spinal mediators of nociceptive neurotransmission and hyperalgesia. *APS Journal*, 2(4): 265-275, 1993.
- WILLIS, W.D. & COGGESHALL, R.E. *Sensory mechanisms of the spinal cord*. New York: Plenum Press, 1991.
- WOOLF, C. & THOMPSON, S.W.N. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on *N*-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*, 44:293-299, 1991.
- WOOLF, C.J. & KING, A.E. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J. Neuroscience*. 10: 2717-2726, 1990.
- WOOLF, C.J. & KING, A.E. Subthreshold components of the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat lumbar spinal cord. *J. Neurophysiology*. 62: 907-916, 1989.
- WOOLF, C.J.; STEPHEN, W.N.; THOMPSON, W.N. & KING, E. Prolonged primary afferent induced alterations in dorsal horn neurones, an intracellular analysis in vivo and in vitro. *J. Physiology*. 83: 255-266, 1989.

- XIE, X.; SMART, T.G. A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature* 349: 521-524, 1991.
- XU, X-J.; ZHANG, X.; HÖKFELT, T. & WIESENFELD-HALLIN, Z. Plasticity in spinal nociception after peripheral nerve section: reduced effectiveness of the NMDA receptor antagonist MK-801 in blocking wind-up and central sensitization of the flexor reflex. *Brain Research*, 670: 342-346, 1995.
- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N. & MIZUGUCHI, T. The effects of morphine, MK-801, an NMDA antagonist, and CP-96,345, an NK1 antagonist, on the hyperesthesia evoked by carageenan injection in the rat paw. *Anesthesiology*, 78: 124-133, 1993.
- YAMAMOTO, TATSUO & YAKSH, T.L. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology*, 77: 757-763, 1992.
- YAMAMOTO, TATSUO & YAKSH, T.L. Studies on the spinal interaction of morphine and the NMDA antagonist MK-801 on the hyperesthesia observed in a rat model of sciatic mononeuropathy. *Neuroscience Letters*, 135: 67-70, 1992.
- YOKOTA, T. & NISHIKAWA, Y. Action of picrotoxin upon trigeminal subnucleus caudalis neurons in the monkey. *Brain Res.* 171: 369-373, 1979.
- YOUNG, R.F. Effect of trigeminal tractotomy on dental sensation in humans. *J. Neurosurg*, 56: 508-516, 1982.
- ZOCHODNE, D.W.; MURRAY, M.; NAG, S. & RIOPELLE, R.J. A segmental chronic pain syndrome in rats associated with intrathecal infusion of NMDA: evidence for selective action in the dorsal horn. *Can. J. Neurol. Sci.* 21: 24-28, 1994.