

**Manipulação do sistema supra-espinhal de
controlo da dor por técnicas de terapia génica**

Estudos em modelos de dor inflamatória e neuropática

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA LICENCIADA
LARA FERNANDA DE MELO CABRAL**

PORTO, 2009

**Manipulação do sistema supra-espinhal de
controlo da dor por técnicas de terapia génica**
Estudos em modelos de dor inflamatória e neuropática

Orientadora: Professora Doutora Isaura Tavares

Co-Orientadora: Mestre Isabel Martins

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA LICENCIADA
LARA FERNANDA DE MELO CABRAL

PORTO, 2009

Ao meu pai

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização desta Tese de Mestrado.

Agradeço em particular à Professora Doutora Isaura Tavares, minha orientadora e à Mestre Isabel Martins, co-orientadora, pela ajuda em todas as etapas deste trabalho e pelas suas valiosas contribuições para esta dissertação.

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, ao meu irmão e ao meu namorado pelo seu apoio incondicional em todos os momentos.

Bem hajam!

Abreviaturas

C

cDNA - DNA complementar

Cu - Núcleo cuneato

D

DAB - 3,3-diaminobenzidina

DNA (Deoxyribonucleic acid) - Ácido desoxirribonucleico

DOR (Delta opioid receptor) - Receptor delta opióide

DRt (“*dorsal reticular nucleus*”) – Núcleo reticular dorsal

E

EGFP (“*enhanced green fluorescent protein*”) - proteína fluorescente verde

H

hCMV (Human cytomegalovirus) - Citomegalovírus humano

HSV-1 (Herpes simplex virus type 1) - Vírus Herpes Simples tipo 1

HSV-LacZ - Vírus Herpes Simples - LacZ

HSV-PPE - Vírus Herpes Simples - Pré-proencefalina

I

i.p. - Intraperitoneal

IRES - “Internal Ribosomal Entry Site”

IR-L (“internal repeat long”) - Sequência vírica única longa

IR-S (“internal repeat short”) - Sequência vírica única curta

L

LRT - Núcleo reticular lateral

LV – Lentivirus

N

NSS (“*normal swine serum*”) - Soro normal de suíno

NTS (“*nucleus tractus solitarius*”) – Núcleo do tracto solitário

P

PA - Poliadenilação

PBS (“*phosphate buffered saline*”) - Tampão fosfato salino

PBS/T - PBS contendo Triton

PFU (“*plaque-forming unit*”) - Unidades formadoras de placas

PPE - Pré-proencefalina

R

rPPE - Pré-proencefalina de rato

S

SNC – Sistema Nervoso Central

SNI - “*spared nerve injury*”

Sp5C - Núcleo trigeminal espinhal *pars caudalis*

T

T.U. - Transducing units

V

VLM - “*ventrolateral medulla*”

VLMlat – VLM lateral

VM - Núcleo ventromedial do tálamo

W

WPRE - “*woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element*”

Índice Geral

RESUMO	1
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	9
OBJECTIVOS	17
I. Análise do efeito de um vector derivado do HSV-1 que sobre-expressa pré-proencefalina no VLM num modelo de dor inflamatória	17
II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que expressa o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática	18
MATERIAIS E MÉTODOS	19
I. Análise do efeito de um vector derivado do HSV-1 que sobre-expressa pré-proencefalina no VLM num modelo de dor inflamatória	19
1. Construção dos vectores derivados do HSV-1.....	19
2. Injecção estereotáxica dos vectores no VLM	20
3. Avaliação comportamental do efeito dos vectores através do teste do formol	22
4. Processamento histológico do material e análise da expressão de c-fos.....	23
II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que expressa o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática	25
A. Caracterização da expressão de c-fos no modelo SNI	25
1. Indução do modelo SNI	25
2. Indução da expressão de c-fos	26
3. Processamento histológico do material e análise da expressão de <i>c-fos</i>	27
B. Análise do efeito comportamental do vector lentivírico que expressa o receptor DOR no DRt.....	28
1. Construção dos vectores derivados de lentivírus	28
2. Indução do modelo SNI e injecção estereotáxica dos vectores no DRt.....	29
3. Avaliação comportamental do efeito dos vectores	30

4.	Processamento histológico do material.....	31
RESULTADOS.....		33
I. Análise do efeito de um vector derivado do HSV-1 que sobre-expressa pré-proencefalina no VLM num modelo de dor inflamatória		
		33
1.	Localização da injeção dos vectores	33
2.	2. Avaliação do efeito comportamental dos vectores no teste do formol	34
3.	3. Avaliação do efeito dos vectores na expressão de <i>c-fos</i> na medula espinhal.....	35
II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que sobre-exprime o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática		
		37
DISCUSSÃO.....		43
I. Análise do efeito analgésico da injeção no VLM de um vector derivado do HSV-1 que sobre-exprime pré-proencefalina - modelo de dor inflamatória		
		43
1.	Efeitos no teste do formol.....	43
2.	Efeitos na expressão espinhal do proto-oncogene <i>c-fos</i>	45
3.	Perspectivas e implicações do estudo	46
II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que expressa o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática		
		47
4.	1. Teste de Von Frey.....	49
5.	Teste de Acetona	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO		51
BIBLIOGRAFIA.....		53

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema do vector HSV-PPE.	20
Figura 2 - Fotografia do aparelho de extereotaxia.....	21
Figura 3 - Fotografia dos nervos peroneal comum, tibial e sural	26
Figura 4: Esquema do vector LV-DOR e LV-EGFP.....	29
Figura 5 - Localização da injeção de HSV-PPE no VLM.	34
Figura 6 - Número de elevações espontâneas da pata injectada com formol	35
Figura 7 - Efeito do vector HSV-PPE na expressão do proto-oncogene <i>c-fos</i> no segmento espinhal L4.	36
Figura 8 - Número de neurónios expressando o proto-oncogene <i>c-fos</i>	37
Figura 9 - Localização da injeção de LV-DOR no DRt.	38
Figura 10 - Efeito do vector LV-DOR na alodínia mecânica.....	40
Figura 11 - Efeito do vector LV-DOR na alodínia ao frio.	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Coordenadas estereotáxicas usadas para injectar o VLM esquerdo..... 21

Tabela 2 - Coordenadas estereotáxicas usadas para injectar o DRt esquerdo..... 29

Resumo

O sistema endógeno de controlo da dor é um sistema complexo que inclui várias regiões encefálicas, sendo essencial no modo como experienciamos a dor. Uma dessas regiões encefálicas com maior densidade de áreas envolvidas na modulação da dor é o bulbo raquidiano, onde se destacam o VLM (“*ventrolateral medulla*”) e o DRt (“*dorsal reticular nucleus*”), alvos de estudo deste trabalho. O VLM, considerado até recentemente um importante núcleo antinociceptivo, parece exercer igualmente acções facilitatórias (Tavares & Lima, 2007). O DRt, entre outras funções que lhe foram atribuídas pelas várias conexões que estabelece no encéfalo, tem acção pronociceptiva, i.é. facilitadora da transmissão nociceptiva na medula espinhal (Almeida *et al.* 1999).

Nos últimos tempos, novas abordagens ao problema do controlo da dor têm equacionado o papel do sistema supra-espinhal de controlo da dor. A terapia génica, por permitir uma acção dirigida e sustentada, tem-se destacado como uma possível abordagem nomeadamente por permitir conhecer melhor a neurobiologia do sistema.

A tese de Mestrado incluiu dois trabalhos que utilizaram terapia génica para controlo da dor em animais de experiência. No primeiro trabalho, aumentou-se a expressão de pré-proencefalina (PPE) no VLM através de um vector derivado do Herpes Simples tipo 1 (HSV-1) e avaliou-se o efeito analgésico na dor inflamatória, recorrendo ao teste do formol. O segundo trabalho foi dividido em 2 partes: a primeira parte consistiu na caracterização da expressão de *c-fos*, proto-oncogene induzido em resposta a estímulos nociceptivos, na medula espinhal num modelo de dor neuropática (SNI; “*spared nerve injury*”) com o intuito de avaliar posteriormente o efeito das abordagens de manipulação do DRt sobre essa mesma expressão; a segunda parte consistiu na avaliação dos efeitos analgésicos, no modelo SNI, da injeção de um vector lentivírico que expressa os receptores δ opióides (DOR) no DRt.

No primeiro trabalho, ratos Wistar machos foram injectados estereotaxicamente no VLM esquerdo com o vector de HSV-1 transportando PPE ou *lacZ*, sob o controlo de um promotor de citomegalovírus humano. Dois dias após a estereotaxia, foi administrada uma injeção subcutânea de 50 μ l de formol a 5% na pata posterior esquerda, e os animais filmados durante 60 minutos para avaliação do número de

retracções da pata injectada. Duas horas após a injeção de formol, os animais foram perfundidos transcardiacamente, e os encéfalos e o segmento espinhal L4 foram removidos, cortados, e armazenados sequencialmente. Os cortes do bolbo raquidiano de animais injectados com o vector HSV-1 contendo *lacZ* foram processados com um anticorpo contra a β -galactosidase para se estabelecer quais as estruturas abrangidas pelo local de injeção. A activação do proto-oncogene *c-fos* foi avaliada imunohistoquimicamente na medula espinhal. Verificou-se uma redução significativa do número de retracções da pata injectada, nas fases inicial e tardia do teste de formol e redução do número de células expressando *c-fos* no corno dorsal da espinhal medula, nos animais injectados com o vector HSV-1 transportando PPE. Numerosos neurónios marcados pela β -galactosidase foram observados no local de injeção e apenas alguns foram encontrados em aferentes encefálicos do VLM, o que indica que os efeitos antinociceptivos do vector que contém a PPE são mediados pelo VLM. A redução da expressão de *c-fos* no corno dorsal sugere que o vector de PPE potencia a inibição descendente por parte do VLM ou inibe as acções facilitatórias. Os resultados reforçam o valor da transferência directa de genes para áreas supraespinhais de controlo da dor no tratamento da dor.

No segundo trabalho, ratos Wistar machos foram sujeitos a uma cirurgia para indução de SNI, em que os ramos terminais do nervo ciático, peroneal comum e tibial foram seccionados, mantendo-se apenas intacto o nervo sural. Na primeira parte deste trabalho, animais sujeitos a SNI foram submetidos a diferentes estímulos: não-nóxico (fricção da pata) e nóxico (“Pin Prick” com diferentes durações, 10 ou 20 minutos), tendo sido posteriormente avaliada imunohistoquimicamente a activação do proto-oncogene *c-fos* nos segmentos espinhais L4-L5. O estímulo inócuo induziu expressão mais intensa de *c-fos*, mas não havia, no entanto, diferenças estatisticamente significativas relativamente a ratos SNI não-estimulados. Deste modo, abandonou-se a ideia de complementar a avaliação comportamental dos efeitos da manipulação do DRt pelo LV-DOR com o estudo da activação dos neurónios espinhais.

Na segunda parte deste trabalho, catorze dias após a cirurgia para indução do modelo de SNI, foi injectado estereotaxicamente no DRt esquerdo um vector lentivírico conduzindo à expressão de receptores DOR (grupo LV-DOR) ou um vector controlo que continha a “*green fluorescence protein*” (GFP) como transgene de marcação (grupo LV-EGFP). Um terceiro grupo de animais não foi injectado (grupo SNI). Foi feita a

avaliação comportamental destes animais recorrendo a testes de alodínia mecânica e pelo frio.

O teste de alodínia mecânica revelou a ausência de efeito do DRt atendendo a que os animais do grupo LV-DOR apresentaram um limiar de resposta com valores próximos aos obtidos antes da injeção e similares aos observados em animais não-injectados. O grupo LV-EGFP não apresentou diferenças estatisticamente significativas relativamente aos outros dois grupos experimentais.

Quanto ao teste de alodínia ao frio, a injeção do vector LV-DOR no DRt, surtiu efeito, já que se observou uma diminuição da intensidade da resposta significativamente abaixo da resposta observada nos grupos controlo (LV-EGFP e SNI), apesar de modesto. Tais resultados podem ser devidos a uma expressão insuficiente dos receptores DOR, sendo necessários mais estudos para averiguar este efeito.

Os trabalhos incluídos nesta tese de Mestrado mostraram ser possível induzir analgesia intensa e sustentada pela injeção do vector HSV-PPE no VLM, num modelo de dor inflamatória. No modelo de dor neuropática, a injeção no DRt de um vector que sobre-expressava receptores DOR, induzia uma analgesia que não era, contudo, tão intensa e apresentava diferenças na modalidade sensorial ensaiada. Os resultados obtidos nesta tese de Mestrado poderão servir de base a outros estudos, necessários para uma melhor compreensão dos papéis do VLM e DRt no sistema supra-espinhal endógeno de controlo da dor. Poderão também ser equacionados no desenvolvimento de novas estratégias de manipulação da dor.

Abstract

The endogenous system of pain control is a complex system that includes several brain areas. One of these brain areas with higher density of regions involved in pain modulation is the medulla oblongata, which encompasses the VLM (ventrolateral medulla) and the DRt (dorsal reticular nucleus). Both medullary areas were targeted in this Master thesis. The VLM was until recently considered an important antinociceptive nucleus, but it was recently shown to also exert facilitatory actions (Tavares & Lima, 2007). The DRt has a pronociceptive action, i.e facilitates nociceptive transmission in the spinal cord (Almeida *et al.* 1999).

In the last few years, new approaches to the pain control problematic have equated the role of the supraspinal pain control system. Gene therapy, by allowing directed and sustained action, has been highlighted as a possible approach to gather information concerning the neurobiology of the supraspinal pain control system.

The Master thesis includes two studies that used gene therapy to control pain in laboratory animals. In the first study, we increased the expression of pre-proenkephalin (PPE) in the VLM by using a vector derived from Herpes Simplex type 1 (HSV-1) and evaluated the analgesic effect in inflammatory pain, using the formalin test. The second study was divided into 2 parts: the first part was to characterize the expression of *c-fos* proto-oncogene induced in response to noxious stimulation, in the spinal cord in a neuropathic pain model (SNI; "spared nerve injury) intending to further assess the effect of manipulating DRt over this same expression. The herein defined protocol would be used in the second part, which consisted on evaluation of the analgesic effects of the injection of a lentiviral vector that expresses in the DRt the δ opioid receptors (DOR) in a neuropathic pain model (SNI model).

In the first study, male Wistar rats were injected stereotaxically in the left VLM with the HSV-1 vector carrying PPE or *lacZ*, under the control of the human cytomegalovirus promoter. Two days after stereotaxy, a subcutaneous injection of 50 μ l formaldehyde 5% was performed in the left hind paw. The formalin test was then performed and the animals were filmed for 60 minutes to assess the number of retractions of the injected paw. Two 2 hours after formalin injection, the animals were

transcardiac perfused and the brains and spinal segments of L4, removed and cut in series. The brain sections from animals injected with HSV-1 vector containing *lacZ* were processed with an antibody against β -galactosidase in order to establish a pattern of neuronal transduction. Activation of the proto-oncogene *c-fos* was assessed immunohistochemically in the spinal segments. There was a significant reduction in the number of retractions of the injected paw, at early and late stages in the formalin test and reduced the number of cells expressing *c-fos* in the dorsal horn of the spinal cord, for the animals injected with HSV-1 vector carrying PPE. Many neurons marked by β -galactosidase were observed at the injection site, with only a few occurring in brain afferents of the VLM, which indicates that the antinociceptive effects of the vector containing the PPE are mediated by the VLM. Reducing the expression of *c-fos* in the dorsal horn suggests that the vector containing PPE potentiate descending inhibition from the VLM, or inhibits descending facilitation. The results reinforce the value of the direct genes transfer to supraspinal areas of pain control in the treatment of pain.

In the second study included in the Master thesis, male Wistar rats were subjected to surgical induction of SNI, where the terminal branches of the sciatic nerve, common peroneal and tibial were cut, keeping intact only the sural nerve. In the first part of this second study animals subjected to SNI were subjected to different stimuli: non-noxious (gentle touch of the skin of the lesioned hindlimb) and noxious (“Pin Prick” with different duration, 10 or 20 minutes) and were further evaluated immunohistochemically the activation of proto oncogene *c-fos* in spinal segments L4-L5. The non-noxious stimulus was what induced a higher expression of *c-fos*, however, expression was not statistically superior to SNI rats not stimulated. Therefore, the idea of complementing the behavioral assessment of the effects of manipulation of the DRt LV-DOR was abandoned.

In the second part of this work, fourteen days after surgery to induce the SNI model, a lentiviral vector was injected by stereotaxy in the left DRt. Two different viral constructs were used: a vector leading to the expression of delta-opioid receptors (DOR) (LV-DOR group) or a control vector containing the green fluorescence protein (GFP) as marking gene (LV-EGFP group). A third group of animals was not injected (SNI group). The behavioral assessment of animals was made using validated tests to assess mechanical and cold allodynia.

The test of mechanical allodynia supported previous results indicating a lack of effect of DRt in the control of this modality, given that the animals in the LV-DOR showed a response threshold with values close to those seen prior to injection and similar to those obtained in animals that were not injected. The LV-EGFP group did not show statistically significant differences in relation to the remaining experimental groups.

In the test of cold allodynia, the injection of the vector LV-DOR in the DRt induced a moderate analgesic effect, since there was a decrease in the intensity of the response significantly below the response observed in control groups (LV-EGFP and SNI), although modest. These results may be due to an insufficient expression of receptors DOR, more research is needed to investigate this effect.

The results obtained in this Master thesis demonstrate that an intense analgesia can be induced by the injection of the vector HSV-PPE in VLM in a model of inflammatory pain. The modest analgesia achieved in cold allodynia in a model of neuropathic pain after injection of the vector LV-DOR in DRt also supports the value of gene therapy approaches directed to the pain control system. These results may serve as a basis for further studies, required for a better understanding of the VLM and DRt in the endogenous system of pain control as well as in the develop of new strategies for pain control.

Introdução

Dor

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2008), a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual efectiva ou potencial ou descrita em termos de tais danos.

Ao alertar o organismo para a presença efectiva ou potencial de danos tecidulares, a dor funciona como um importantes mecanismos de sobrevivência. No entanto, enquanto a dor aguda pode ser considerada como um sinal fisiológico de alerta para potenciais perigos, a dor crónica, entendendo-se como dor crónica a dor que persiste por mais de três meses, deve ser considerada um estado patológico, que para além de ser inútil é altamente angustiante (Pohl *et al.*, 2003). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a dor é responsável por 80% das consultas médicas e 30% da população mundial sofre de dor crónica, sendo este um importante problema de saúde pública.

Podem-se considerar três tipos de dor: (1) a dor normal ou sensitiva, que resulta de um estímulo intenso intrínseco ou extrínseco; (2) a hiperalgesia, devida a lesão crónica dos tecidos, com componente inflamatório e funcionamento anormal das estruturas nervosas, tratando-se de uma dor contínua e persistente; (3) a dor neuropática, devida a lesões, geralmente traumáticas, dos elementos nervosos (Coimbra, 1995). A dor sensitiva é um sintoma geralmente agudo que se trata pela cura da lesão, enquanto a hiperalgesia e a dor neuropática são processos geralmente crónicos, envolvendo comprometimento neuronal e anomalias dos receptores e mensageiros secundários intracelulares (Coimbra, 1995). Estes dois últimos tipos de dor são objecto de estudo deste trabalho.

Dor Crónica

A dor crónica está frequentemente associada a alterações profundas dos circuitos neuronais envolvidos na transmissão e modulação da dor. Tais alterações podem ir desde modificações na excitabilidade dos neurónios ou mesmo do fenótipo destas células, com alterações na expressão de várias moléculas importantes para o processamento nociceptivo e indução da expressão de novas moléculas (Pohl *et al.*, 2003). A dor crónica, e em particular a dor neuropática pode também levar a alterações neuroanatómicas como a perda de interneurónios espinhais, rearranjos anormais das fibras sensoriais aferentes na medula espinhal ou proliferação e invasão de fibras do sistema nervoso simpático nos gânglios sensoriais. Todas estas modificações contribuem para alterar profundamente as características estruturais, bioquímicas e electrofisiológicas dos neurónios envolvidos no processamento da dor e, conseqüentemente, o modo de funcionamento do sistema supra-espinhal endógeno de controlo da dor (Pohl *et al.*, 2003).

Terapias

Algumas formas de dor crónica, em particular de origem neuropática, são de difícil manipulação clínica com os tratamentos actualmente disponíveis. Os opióides são relativamente ineficazes dado que o estado dos respectivos receptores está muitas vezes alterado (Coimbra, 1995) e o seu uso generalizado está limitado pelos seus efeitos secundários. Os antidepressivos e anticonvulsionantes, igualmente utilizados nestas situações, só permitem 50% de alívio em menos de metade dos pacientes tratados (Sindrup & Jensen, 1999).

Os avanços no conhecimento da neuroanatomia das vias de condução, da neurofarmacologia e da fisiopatologia da dor poderão facilitar o desenvolvimento de pesquisas visando novas modalidades de tratamento. Neste contexto, a terapia génica representa uma nova e útil técnica que pode contribuir para uma melhor gestão das situações de dor crónica refractária. Uma das questões que se coloca na utilização desta técnica de transferência de genes consiste em saber qual o nível mais adequado de intervenção. Os primeiros estudos realizados incidiram na transferência de genes precursores de opióides promovendo a sua sobre-expressão ao nível de tecidos

periféricos e da medula espinhal. Estes estudos demonstraram a exequibilidade e o real interesse deste tipo de técnica, demonstrando que a sobre-produção local de péptidos opióides induzia efeitos antinociceptivos em modelos de dor persistente de origem inflamatória, neuropática ou mesmo oncológica (Pohl *et al.*, 2003). Se até aqui os estudos realizados têm alvejado essencialmente a periferia, mais recentemente o sistema supra-espinhal ganhou importância como potencial alvo, já que a sua manipulação pela tecnologia de transferência de genes poderia apresentar resultados mais robustos e ao mesmo tempo contribuir para um melhor conhecimento da neurobiologia do próprio sistema supra-espinhal durante a dor crónica (Tavares & Lima, 2006).

Vectores

Vários sistemas não-víricos e víricos foram já usados na transferência de genes para o sistema nervoso central (SNC). Embora os sistemas não-víricos sejam, *a priori*, mais seguros para aplicações *in vivo*, a sua principal limitação continua a ser o relativo curto tempo em que asseguram a expressão de transgenes. Em contrapartida, grandes progressos têm sido conseguidos na produção de vectores derivados de vírus, nomeadamente no que respeita a garantir a sua segurança e diminuir a citotoxicidade e possibilidades de induzir inflamação (Simonato *et al.*, 2000; Lowenstein & Castro, 2001; Okada *et al.*, 2002).

Vectores derivados do vírus HSV-1 são adequados para a introdução de transgenes no SNC (Yamada *et al.*, 1999; Martino *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000) já que possuem afinidade para neurónios e sofrem migração retrógrada até ao corpo celular destas células. Uma vez no núcleo da célula, o HSV-1 não integra o genoma do hospedeiro. Permanece em latência com excepção de uma pequena região que permanece transcripcionalmente activa, gerando várias moléculas de RNA debaixo do controlo do promotor activo de latência. Esta capacidade do HSV permanecer no núcleo dos neurónios juntamente com a actividade basal do promotor activo de latência, representam características particularmente tentadoras para o uso de vectores derivados do HSV na terapia génica (Pohl *et al.*, 2003). No caso concreto deste trabalho, pretendia-se com a utilização de vectores derivados do HSV-1 que ocorresse produção local de PPE numa área encefálica importante na modulação da dor: o VLM (“*ventrolateral medulla*”). A existência de migração retrógrada em alguns dos aferentes

às áreas injectadas (Martins *et al.*, 2008), poderia potenciar a libertação de PPE na área injectada, potenciando assim os efeitos do vector.

Na segunda parte deste trabalho, pretendeu-se promover uma sobre-expressão de receptores delta opióides (DOR) numa outra área encefálica envolvida na modulação descendente: o DRt (“*dorsal reticular nucleus*”). Deste modo, optou-se pela utilização de vectores derivados de lentivirus por permitirem precisamente uma acção local, de modo a conseguir a sobre-expressão dos receptores delta opióides (DOR) no DRt. Outra vantagem adicional da utilização de vectores derivados de lentivirus face aos derivados do HSV-1, consiste em conseguir uma expressão mais duradoura dos transgenes.

Sistema supra-espinhal endógeno de controlo da dor

O sistema supra-espinhal endógeno de controlo da dor é uma rede complexa de várias áreas encefálicas que controlam a transmissão nociceptiva na medula espinhal, tanto por acções inibitórias como facilitadoras. É o balanço entre estas acções que assegura uma modulação efectiva da dor aguda. Na dor crónica, o balanço entre as acções inibitórias e facilitadoras fica desequilibrado, prevalecendo os efeitos pronociceptivos.

A modulação descendente é exercida por três sistemas neuroquímicos que interagem entre si: noradrenérgico, serotoninérgico e opioidérgico.

O bolbo raquidiano é a região encefálica com maior densidade de áreas envolvidas na modulação da dor. Nesta região encontram-se o RVM (“*rostromedial medulla*”), NTS (“*nucleus tractus solitarius*”), VRt (“*ventral reticular nucleus*”) e, os já acima referidos, VLM e DRt (Tavares & Lima, 2002). Neste trabalho, centrámo-nos em duas áreas particulares – o VLM e o DRt.

VLM

Localizado no quadrante ventrolateral do bulbo raquidiano, o VLM só recentemente emergiu como um componente importante do sistema endógeno de modulação da dor. O VLM parece ser responsável pela inibição descendente tónica dos neurónios nociceptivos espinhais, actuando por vias descendentes directa e indirecta (Tavares & Lima, 2002).

Na via directa, as projecções para as áreas da medula espinhal contendo neurónios nociceptivos, nomeadamente as lâminas I, IV a V e X, originam-se na região do VLM designada por VLMIlat, parecendo ser esta região a principal responsável pela modulação da dor (Tavares & Lima, 2002). O VLMIlat encontra-se delimitado pelo núcleo espinhal do trigémio, parte caudal (Sp5C) e pelo núcleo reticular lateral (LRt). A lâmina VII, que contém principalmente interneurónios pré-motores, é alvejada exclusivamente pelo LRt, uma região envolvida no controlo motor. Os neurónios na lâmina I projectam de volta para o VLMIlat formando um circuito recíproco fechado que deverá estar especificamente envolvido na modulação da dor (Tavares *et al.*, 1998). Por sua vez, os neurónios do corno dorsal profundo, apesar de serem alvejados pelo VLMIlat, enviam projecções ascendentes apenas para o LRt (Lima *et al.*, 1991).

Na via indirecta, α_2 -adrenoreceptores e receptores serotoninérgicos espinhais medeiam o efeito antinociceptivo produzido pelo VLM (Gebhart & Ossipov, 1986; Gebhart & Randich, 1990; Gogas *et al.*, 1991). No tronco cerebral, as fibras do VLM encontram-se directamente apostas a neurónios que projectam para a medula espinhal e estão localizados no grupo de células noradrenérgicas A5 e no RVM. A via VLM-A5 origina-se exclusivamente a partir do VLMIlat e estabelece contactos sinápticos assimétricos putativamente excitatórios com neurónios do A5 que projectam para a medula espinhal (Tavares *et al.*, 1996 e 1997), enquanto a via VLM-RVM-medula espinhal resulta de contactos sinápticos estabelecidos de uma maneira similar à da primeira via referida.

Mais recentemente, verificou-se que o VLM deverá exercer efeitos facilitadores da dor, a par das acções inibitórias (Tavares & Lima, 2007). Efectivamente, os neurónios do VLM que projectam para a medula espinhal estabelecem contactos sinápticos com os neurónios espinhais. Pelo estudo ultra-estrutural foi possível inferir que acções inibitórias mas também facilitadoras devem ser exercidas pelo VLM sobre a

medula espinhal. Estudos electrofisiológicos dos neurónios do VLM permitiram concluir que aquela área bulbar alojava neurónios “OFF” (inibidores) e neurónios “ON” (facilitadores; Pinto-Ribeiro *et al.*, 2006). Deste modo, os estudos de manipulação do VLM para controlo da dor devem ter em consideração o duplo efeito daquela área.

DRt

O DRt localiza-se lateralmente ao núcleo do tracto solitário (NTS), medialmente ao núcleo trigeminal espinhal, *pars caudalis* (Sp5C) e ventralmente ao núcleo cuneato (Cu). Trata-se de uma área peculiar no sistema supra-espinhal de controlo da dor atendendo a que tem uma acção pronociceptiva (Almeida *et al.*, 1999). Do DRt parte uma via descendente constituída por uma componente dorsal que termina nas lâminas ipsilaterais do corno dorsal superficiais (I-II) e profundas (III-IV) e por uma componente ventral que atinge apenas as lâminas profundas bilateralmente (IV-V; Tavares & Lima, 1994). A existência de uma via ascendente ligando áreas nociceptivas espinhais ao DRt foi demonstrada pelo uso de diferentes técnicas de marcação (Lima, 1990; Almeida *et al.*, 1995). As fibras do DRt que terminam na lâmina I parecem fazer parte de um circuito fechado DRt-medula espinhal-DRt (Almeida *et al.*, 1993).

Várias funções foram propostas para o DRt pelo facto deste estabelecer várias conexões no encéfalo, como por exemplo com a zona incerta parafascicular (PF), com o núcleo ventromedial do tálamo (VM) e com o núcleo reticular gigantocelular. Estas conexões foram consideradas como sugestivas do envolvimento do DRt nas reacções de aversão à estimulação dolorosa (Bernard *et al.*, 1990; Villanueva *et al.*, 1997). Outras conexões como DRt-PF-amígdala e DRt-núcleo reuniens- amígdala/hipocampo podem atribuir um papel ao DRt nas respostas afectivas (Davis, 1992; Selden *et al.*, 1991). Também se considerou a contribuição do DRt para as expressões faciais e vocalizações associadas a estímulos nóxicos através das projecções para o núcleo motor dos nervos facial, trigémio e hipoglosso (Bernard *et al.*, 1990). Os dados parecem sugerir que a intensificação do sinal nociceptivo pelo DRt é a base para uma resposta adequada face à dor nas vertentes motivacional, afectiva e motora (Almeida *et al.*, 1999).

Adicionalmente outros estudos demonstraram que uma grande proporção dos neurónios da lâmina I que projectam para o DRt, também projectam igualmente para a

porção caudal do mesencéfalo, possibilitando uma potente coordenação da modulação descendente da dor (Basbaum & Fields, 1984), que pode ser desencadeada pelos sinais intensificados que transmitem. Modulação negativa similar pode ser produzida pela activação de outras regiões antinociceptivas que também recebem projecções do DRt como o grupo de células noradrenérgicas A5, o núcleo reticular gigantocelular, PAG, núcleo parabraquial e NTS (Almeida *et al.*, 1999).

Estudos recentes mostraram que o DRt é afectado pela instalação de dor crónica. Em modelos animais de dor crónica inflamatória, verificou-se que há uma considerável diminuição da expressão de receptores opióides tipo μ (MOR) e δ (DOR; Pinto *et al.*, 2008a; Neto *et al.*, 2008). A diminuição da expressão destes opióides deve traduzir-se na diminuição da inibição opioidérgica do DRt, o que deverá reforçar a acção facilitatória do núcleo na dor crónica (Sotgiu *et al.*, 2008). Importa, pois, definir estratégias para repor a inibição daquele centro pronociceptivo.

Objectivos

Os trabalhos realizados nesta dissertação de Mestrado incluíram dois estudos complementares que tinham como objectivo final delinear estratégias para realizar uma intervenção simultânea sobre dois centros-chave no controlo supra-espinhal da dor: o VLM e o DRt. Pretendia-se, em suma, diminuir a transmissão nociceptiva na medula espinhal aumentando a inibição descendente proveniente do VLM e diminuir os efeitos pró-nociceptivos do DRt. Nos trabalhos incluídos nesta dissertação de Mestrado, pretendeu-se analisar a eficácia de cada estratégia de manipulação isolada para avaliar a sua viabilidade de combinação.

A justificação para cada abordagem parcelar foi já parcialmente descrita na secção “Introdução” mas carece de uma justificação mais detalhada, nesta secção de “Objectivos”.

I. Análise do efeito de um vector derivado do HSV-1 que sobre-expressa pré-proencefalina no VLM num modelo de dor inflamatória

Este estudo realizou-se tendo por base dados prévios que mostravam que a instilação de morfina no VLM induzia analgesia comportamental (Janss & Gabhart, 1988) e que os MOR e DOR se exprimem no VLM, os primeiros dos quais em neurónios de projecção para a medula espinhal (Pinto *et al.*, 2008b). Para além destes aspectos, o estudo da migração do vector HSV-1 contendo o transgene *LacZ*, após injeção no VLM mostrou que havia transdução local a tempos de sobrevida curtos (2 dias) e transdução de aferentes encefálicos a tempos mais longos. Alguns dos aferentes encefálicos transduzidos eram encefalinérgicos, como se demonstrou pela co-localização da β -galactosidade com a encefalina (Martins *et al.*, 2009). Deste modo, a injeção de um vector HSV-1 que sobre-expressa PPE (vector HSV-PPE) deveria induzir analgesia mediante a inibição descendente dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal. Para comprovar a existência destes efeitos analgésicos, os animais foram sujeitos a avaliação comportamental pelo teste do formol, atendendo a que é um teste muito usado na avaliação da dor e cuja validade na determinação da eficácia de analgésicos tem sido documentada (Tjolsen *et al.*, 1992; Dubuisson & Dennis., 1977).

Este teste tem ainda a vantagem de que o estímulo usado permite, em simultâneo, avaliar a activação nociceptiva de neurónios do corno dorsal, recorrendo à detecção imunocitoquímica da proteína Fos, produzida após activação do proto-oncogene *c-fos* (Tjolsen *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 1995).

II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que expressa o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática

Este estudo teve a sua justificação na constatação de que, como já referido, a expressão de receptores opióides diminui no DRt após a instalação de dor crónica (Pinto *et al.*, 2008a; Neto *et al.*, 2008). A abordagem farmacológica realizada mediante instilação no DRt de agonistas de receptores MOR e DOR (Pinto *et al.*, 2008a) mostra que pode ser útil em termos analgésicos usar uma estratégia de terapia génica que leve ao aumento da expressão local daqueles receptores. Utilizaram-se lentivírus que sobre-exprimiam o transgene para os receptores DOR e avaliou-se a eficácia analgésica desta estratégia usando um modelo de dor neuropática: o SNI (“*spared nerve injury*”). Neste modelo experimental, os animais apresentam manifestações de dor que mimetizam diversas situações clínicas de difícil tratamento nomeadamente alodínia (sensibilidade dolorosa a estímulos inócuos) e hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nociceptivos). No modelo SNI os animais apresentam alodínia táctil, alodínia ao frio e hiperalgesia mecânica, de uma forma que é estável ao longo do tempo (Decosterd & Woolf, 2000). Como pretendíamos analisar não só respostas comportamentais mas também a actividade nociceptiva de neurónios do corno dorsal, tornou-se necessário desenvolver um protocolo de estimulação nociceptiva dos ratos com SNI que garantisse uma expressão evidente do proto-oncogene *c-fos*. Deste modo, podíamos confirmar que a analgesia que viesse a ser induzida pela injeção do vector lentivírico com DOR no DRt era acompanhada pela diminuição da expressão do *c-fos*, indicadora de diminuição de actividade dos neurónios do corno dorsal. Um estudo prévio mostrou uma expressão espinal moderada do *c-fos* após estímulo em animais SNI (Intondi *et al.*, 2008). Desenvolvemos outros protocolos de estimulação com o objectivo de aumentar a expressão de *c-fos* tendo, contudo, presentes algumas das dificuldades no estudo da expressão daquele proto-oncogene em situações de dor crónica (Pinto *et al.*, 2008a).

Materiais e Métodos

Todas as experiências foram executadas de acordo com as normas da Comunitária Europeia (Directiva 86/609/CEE), e os princípios éticos para a investigação da dor em animais (Zimmermann, 1983). Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, provenientes da colônia de Charles River (Barcelona, Espanha) alojados com acesso livre a comida e água e sob condições controladas de temperatura, humidade e luz (22 °C; 60% de humidade relativa; ciclos de 12h luz). Todas as experiências foram realizadas durante a fase de luz do ciclo, correspondendo ao período entre as 8h e as 20h.

I. Análise do efeito de um vector derivado do HSV-1 que sobre-expressa pré-proencefalina no VLM num modelo de dor inflamatória

1. Construção dos vectores derivados do HSV-1

Os vectores utilizados neste estudo, HSV-PPE e HSV-LacZ, são derivados de uma forma recombinante não-replicativa do vírus HSV-1 e foram construídos no laboratório do Professor Steven P. Wilson (Departamento de Farmacologia, Fisiologia e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade da Carolina do Sul, EUA) que colabora com o grupo de investigação onde decorreram os trabalhos incluídos na dissertação de Mestrado.

O vector HSV-PPE transporta uma cassette de expressão que contém o promotor de citomegalovírus humano (hCMV), o cDNA da pré-proencefalina de rato (rPPE), a sequência IRES¹, o gene da EGFP (“*enhanced green fluorescent protein*”- proteína fluorescente verde) e uma sequência de poliadenilação (PA) (Figura 1). No vector HSV-LacZ, o cDNA da PPE foi substituído pelo cDNA do gene marcador *lacZ* de *Escherichia coli* que codifica a proteína β -galactosidase. Para construir estes vectores a

¹ IRES -Internal Ribosomal Entry Site - sequência derivado do vírus da encefalomiocardite que aumenta a eficiência da tradução de genes bicistronicos em vectores lentiviricos (Chinnasamy *et al.*, 2009)

“cassete” de expressão foi clonada num plasmídeo entre os genes UL36 e UL37. Este plasmídeo foi linearizado e inserido por recombinação homóloga entre os genes UL36 e UL37 dum vírus HSV-1 contendo o gene ICP4 deletado (Δ ICP4; Figura 1) (Wilson *et al.*, 1999). Dado que a proteína ICP4 é indispensável para a replicação vírica, a deleção de uma porção do gene que codifica esta proteína torna o vírus incapaz de replicação. Os vectores recombinantes obtidos foram purificados e a presença da cassete de expressão verificada por “dot-blot”. Os *stocks* de vectores foram produzidos por transfecção de células que complementam a proteína vírica ICP4 e conservados numa solução de sacarose a 10% diluída numa solução salina de tampão de fosfatos 0.1 M pH 7.2 (PBS).

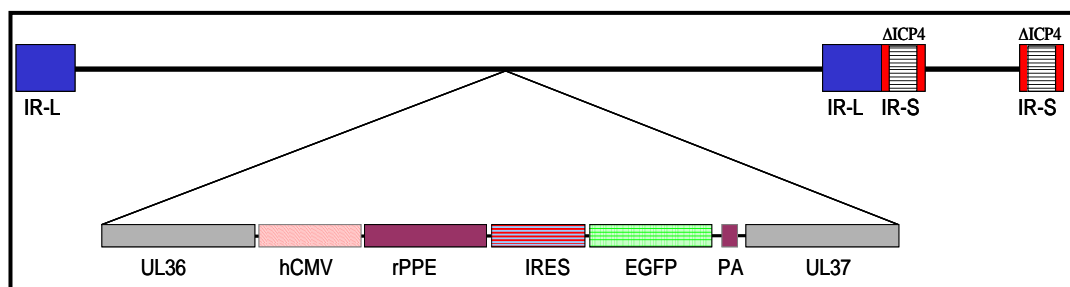


Figura 1 - Esquema do vetor HSV-PPE. A cassete de expressão contém o promotor de citomegalovírus humano (hCMV), o cDNA da pré-proencefalina de rato (rPPE), a sequência IRES, o gene da EGFP (“enhanced green fluorescent protein”) e uma sequência de poliadenilação (PA) e foi inserida entre os genes víricos UL36 e UL37. A deleção de uma porção do gene vírico ICP4 (Δ ICP4) torna o vírus não-replicativo. IR, sequências internas repetidas que flanqueiam a sequência vírica única longa (IR-L) e curta (IR-S)

2. Injeção estereotáxica dos vectores no VLM

Ratos machos Wistar de peso compreendido entre 285-315g foram anestesiados por injeção intraperitoneal (i.p.) de uma mistura de cloridrato de medetomidina (Domitor; 0.25 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (Ketalar; 60 mg/Kg). De seguida foram posicionados num aparelho de estereotaxia (David Kopf Instruments; Tujunga, CA, EUA), onde a cabeça é imobilizada recorrendo a duas barras laterais inseridas nos canais auditivos externos e a uma barra de sustentação dos incisivos superiores posicionada 5mm acima da linha interaural (Figura 2). Após desinfecção com iodopovidona (Betadine®), realizou-se uma incisão longitudinal de modo a expor o

crânio e procedeu-se à trepanação do lado esquerdo do osso occipital com o auxílio de uma broca. A dura-máter foi cuidadosamente removida de modo a permitir a injeção dos vectores no VLM. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para alvejar o VLM-esquerdo foram adaptadas do atlas de Paxinos e Watson (1998) conforme se apresenta na Tabela 1.

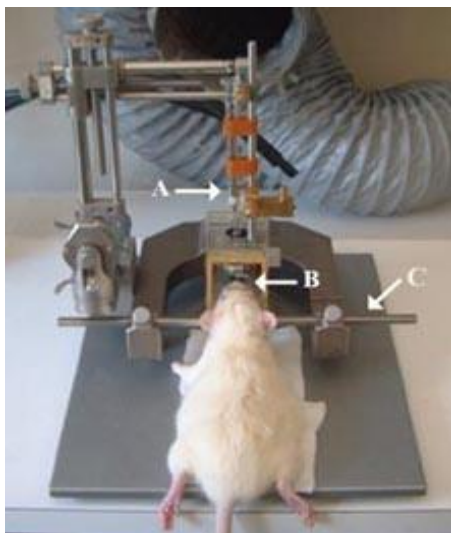


Figura 2 - Fotografia do aparelho de estereotaxia: A- Seringa Hamilton; B- Barra que prende o animal pelos incisivos superiores; C- Barra de orelhas que prende o animal lateralmente.

Recorrendo a uma seringa Hamilton, o volume total de 1 μ L de soluções contendo o vector vírico (2x10⁶ PFU/ μ l) foi lentamente injectado (0,1 μ L a cada 2 min). No final da injeção aguardaram-se 10 minutos antes de se remover a seringa, de forma a prevenir o refluxo da solução. Os animais foram suturados, e foi aplicada Bacitracina® localmente de modo a prevenir possíveis infecções. Após a cirurgia, cada animal foi alojado individualmente e monitorizado para avaliar o seu comportamento e garantir o seu bem-estar geral.

Coordenadas (mm)	VLM-esquerdo
Dorso-ventral	-2.6
Latero-medial	+2.2
Rostro-caudal	-5,8

Tabela 1 - Coordenadas estereotáxicas usadas para injectar o VLM esquerdo.

Os animais foram divididos em três grupos: um grupo (grupo “HSV-PPE”; n=7) foi injectado com um vector que expressa o PPE; um segundo grupo (grupo “HSV-LacZ”; n=7) foi injectado com o vector controlo; um terceiro grupo (grupo “veículo”; n=3) foi injectado com a solução-veículo onde os vectores são diluídos (sacarose a 10% diluída em PBS).

3. Avaliação comportamental do efeito dos vectores através do teste do formol

O teste do formol foi realizado como descrito anteriormente (Tjolsen *et al.*, 1992) após um período de uma semana de habituação dos animais ao investigador, à sala e ao equipamento. Os critérios usados para assegurar que ocorreu habituação adequada consistiram em garantir que os animais não ficavam estáticos nem defecavam quando colocados na placa de teste (Abbott *et al.*, 1995).

Dois dias após a injeção estereotáxica dos vectores, 50 µl de formol a 5% foram injectados subcutaneamente com uma agulha de 30 G na superfície dorsal da pata posterior ipsilateral ao local de injeção de HSV-1 no bolbo raquidiano. Depois da injeção de formol, os ratos foram colocados na placa de teste e filmados durante 60 minutos. O número de vezes que ocorria elevação espontânea da pata injectada foi avaliado em 12 sessões de 5 minutos usando o programa informático Etholog (Ottoni, 2000). O comportamento de elevação espontânea da pata injectada consiste numa resposta comportamental robusta e facilmente identificável e quantificável (Hao *et al.*, 2008; Goss *et al.*, 2001; Munro, 2009). Aquele parâmetro, contrariamente a outras respostas comportamentais no teste do formol, como lambar e morder a pata injectada, não se encontra associado a alterações comportamentais não-nociceptivas que ocorrem durante o teste (Tjolsen *et al.*, 1992). Deste modo, a monitorização daquele parâmetro comportamental, é frequentemente o mais usado em estudos comportamentais que usam o teste do formol. O tratamento estatístico dos dados foi realizado por “Repeated measures” do ANOVA de forma a determinar o efeito do tratamento e pelo teste-t para comparar os grupos em cada sessão.

4. Processamento histológico do material e análise da expressão de *c-fos*

4.1. Perfusão transcardíaca e fixação do material

Duas horas após a injeção de formol, tempo necessário para detectar de forma óptima a expressão de *c-fos* (Almeida *et al.*, 1999), os animais foram anestesiados por injeção i.p. com pentobarbital sódico a 5% diluído em soro (0.1 ml/100 g). Os animais foram de seguida colocados em decúbito dorsal, a caixa torácica aberta de forma a expor o coração e a introduzir um catéter na crossa aórtica. De seguida os animais foram perfundidos com 100 ml da solução de Tyrode seguidos por 750 ml de uma solução de fixador composta por paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfatos 0.1 M, pH 7.2.

Após perfusão, procedeu-se à dissecação do bolbo raquidiano e do segmento espinhal L4. Estes foram seguidamente colocados na solução de fixador, durante 4 horas e armazenados durante 48h a 4°C numa solução de sacarose a 30% diluída em tampão fosfatos. O material foi posteriormente cortado transversalmente em micrótomo de congelação a -20°C em secções coronais com 40 µm de espessura. Os cortes foram recolhidos seriadamente, o bolbo raquidiano em 4 séries e o segmento espinhal L4 em 3 séries, de modo a que cada série contivesse uma amostragem total do material. Os cortes foram armazenados numa solução de crioprotecção a -20°C. Posteriormente, os cortes do bolbo raquidiano foram usados para determinar o local de injeção enquanto os cortes da medula espinhal foram usados para análise da expressão do proto-oncogene *c-fos*.

4.2. Identificação do local de injeção

Os cortes do bolbo raquidiano foram montados em lâminas revestidas com gelatina e corados pelo método formol-tionina, adaptado de Donovick (1974). Os cortes foram seguidamente analisados num óptico de luz (Nikon) e o local de injeção identificado pela presença do tracto da agulha nos cortes mais caudais do bolbo raquidiano.

Noutra série de cortes do bolbo raquidiano, estes foram montados em lâminas revestidas com gelatina e observados num microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha) para detectar a fluorescência verde emitida pela EGFP produzida pelas células transduzidas pelo vector e analisar a extensão da área transduzida em torno do

tracto da agulha. As imagens foram captadas usando o programa Axiovision (Imaging Associates).

4.3. Análise da expressão de *c-fos*

A detecção da expressão do proto-oncogene *c-fos* foi realizada por imunohistoquímica no segmento espinhal L4. Este segmento foi escolhido por ser a área de projecção da pata injectada com formol e, concordantemente, apresentar um número elevado de neurónios imunorreactivos para a proteína Fos após injeção de formol (Almeida *et al.*, 1999).

Os cortes foram inicialmente submetidos a várias lavagens com PBS 0,1M e reagiram durante 20 minutos com peróxido de hidrogénio a 0.003% em PBS 0,1M de forma a suprimir a actividade da peroxidase endógena. Após várias lavagens com PBS 0,1M contendo 0,3% Triton X-100 (PBS/T) os cortes foram incubados durante 2 horas em PBS/T contendo 7,5 mg/ml de glicina e 10% de soro normal de suíno (NSS; “*normal swine serum*”), para bloquear os locais antigénicos não-específicos. Seguiu-se uma incubação, durante 2 noites a 4°C, com um anticorpo policlonal anti-*c-fos* de coelho (Ab5, Oncogene, Alemanha) diluído a 1:10000 em PBS/T com 2% de NSS. Após várias lavagens em PBS/T com 2% de NSS, os cortes foram incubados durante 1 hora com um anticorpo secundário de suíno biotilado anti-coelho (Dako, Dinamarca) diluído a 1:200 na mesma solução. Precedeu-se de seguida a várias lavagens com PBS/T e a incubação durante 1 hora em solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase a 1:200 (ABC; Vectorstain Elite, Vector, USA). Dado que cada avidina se liga a 4 biotinas este complexo permite a amplificação do sinal. Após lavagens sucessivas com PBS/T e PBS e, por fim, em tampão Tris-HCl a 0,05 M pH 7,6, os cortes foram incubados na solução de revelação contendo 0,5 mg/ml de tetrahidrocloreto de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma Immunochemicals, EUA) e 0,025% de H₂O₂ preparada no mesmo tampão. A DAB é o substrato cromogénico da peroxidase. A reacção da enzima com o H₂O₂ e a oxidação consecutiva da DAB leva à formação de um precipitado castanho e insolúvel no local de actuação da enzima e, consequentemente, no local de expressão da proteína Fos. Para parar a reacção, os cortes foram lavados com o tampão Tris-HCl a 0,05 M pH 7,6 e montados em lâminas revestidas com gelatina, passados em xilol e cobertos com Eukitt.

Os cortes foram analisados num microscópio óptico de luz (Nikon) contou-se o número de neurónios presentes nas lâminas espinhais I-II e III-IV. Foram analisados todos os cortes e calculada a média de neurónios com marcação por corte. O tratamento estatístico dos dados foi realizado por “One way ANOVA” de forma a comparar o número de neurónios com *c-fos* entre os grupos experimentais.

II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que expressa o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática

Este estudo foi dividido em 2 partes. A primeira parte (A) consistiu na caracterização da expressão de *c-fos* no corno dorsal da medula espinhal no modelo de dor neuropática (SNI; “*spared nerve injury*”). A segunda parte (B) consistiu na análise do efeito comportamental do vector lentivírico que expressa o receptor delta opióide (DOR) no DRt.

A. Caracterização da expressão de c-fos no modelo SNI

1. Indução do modelo SNI

A cirurgia para indução do modelo SNI foi realizada como descrito anteriormente (Decosterd & Woolf, 2000) em ratos machos Wistar de peso compreendido entre 220-230g anestesiados com isoflurano (5% para indução, 2.5% para manutenção; Laboratórios Abbott, Portugal). Durante a cirurgia a superfície lateral da coxa esquerda foi desinfectada com iodopovidona (Betadine®) e foi feita uma incisão directamente através do músculo bíceps femoral, expondo o nervo ciático e os seus 3 ramos terminais (sural, peroneal comum e tibial; Figura 3). Os nervos peroneal comum e tibial foram ligados individualmente com fio de seda 4.0 e seccionados distalmente à ligação, removendo-se 2-4 mm. Evitou-se qualquer contacto ou estiramento do nervo sural remanescente. O músculo foi suturado utilizando linha de sutura, e a pele fechada, recorrendo a agrafos cutâneos (Stoelting, USA), que foram removidos 5 a 6 dias pós-cirurgia (Decosterd & Woolf, 2000). Este modelo garante uma hipersensibilidade sensorial da parte lateral da pata, claramente presente 24h depois da cirurgia atingindo

um pico cerca de 2 semanas após a cirurgia que se mantém de forma sustentada durante 6 meses (Decosterd & Woolf, 2000).

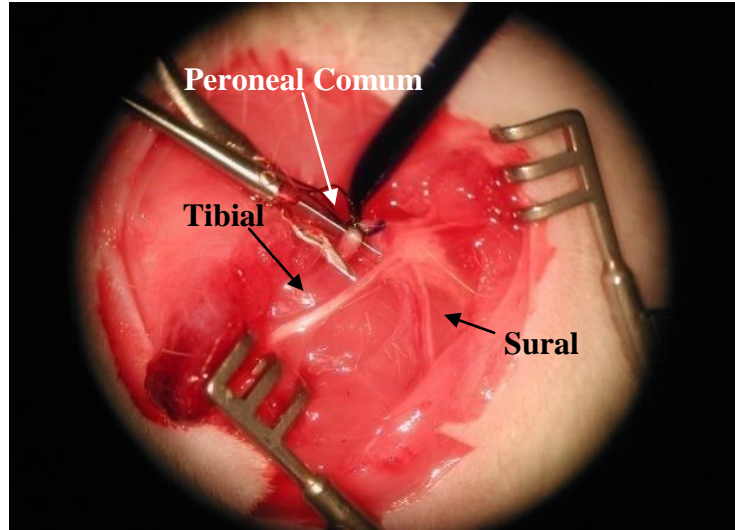


Figura 3 - Fotografia dos nervos peroneal comum, tibial e sural durante a cirurgia para indução de SNI (fotografia cedida por Hugo Almeida- Universidade do Minho)

2. Indução da expressão de c-fos

Este estudo foi realizado 30 dias após a indução do SNI, período em que os animais apresentam hipersensibilidade sensorial sustentada e estável. Os animais foram divididos em quatro grupos e os estímulos foram aplicados na superfície plantar lateral (área inervada pelo nervo sural) da pata posterior esquerda submetida à cirurgia SNI.

Os dois primeiros grupos de animais foram anestesiados por injeção i.p. com hidrato de cloral a 35% diluído em soro (0.1 ml/100 g), os animais foram de seguida colocados em decúbito lateral direito, o primeiro grupo foi sujeito a um estímulo nódico mecânico que consistiu em 5 picadas/minuto durante 10 minutos com uma agulha cuja ponta foi burilada para evitar lesão do tecido (n=2) e o segundo grupo foi sujeito ao mesmo estímulo mas com uma duração de 20 minutos (n=2). No terceiro e quarto grupos os animais não foram anestesiados e no terceiro grupo foi aplicado um estímulo táctil não nódico, que consistiu em passar suavemente o dedo polegar do investigador ao longo da área supracitada enervada pelo nervo sural, repetindo-se este movimento

cada 4 segundos durante 10 minutos (n=1; Ma & Woolf, 1996). No quarto grupo não foi aplicado qualquer estímulo (n=1).

3. Processamento histológico do material e análise da expressão de *c-fos*

3.1. Perfusão transcardíaca e fixação do material

Duas horas após aplicação dos estímulos para indução de *c-fos*, tempo que, conforme já referido nesta tese, é necessário para detectar de forma óptima a expressão da proteína Fos, produzida por activação do proto-oncogene *c-fos* (Bullitt, 1990), os animais foram anestesiados ou levaram um reforço de anestesia (animais submetidos ao estímulo nódico) por injeção i.p. com hidrato de cloral a 35% diluído em soro (0.1 ml/100 g) e foram sacrificados por perfusão transcardíaca de acordo com o procedimento atrás descrito.

Após perfusão, procedeu-se à dissecação dos segmentos espinhais L4-L5 que foram seguidamente colocados na solução de fixador durante 4 horas e depois armazenados a 4°C numa solução de sacarose a 30% diluída em tampão fosfato. Os segmentos L4-L5 foram posteriormente cortados transversalmente num micrótomo de congelação a -20°C em secções coronais com 40 µm de espessura. Os cortes foram recolhidos seriadamente em 3 séries e armazenados numa solução de crioprotecção a -20°C.

3.2. Análise da expressão de *c-fos*

A detecção da expressão de *c-fos* foi realizada por imunocitoquímica em cortes provenientes dos segmentos L4-L5, que recebem inervação do nervo ciático (Ma & Woolf, 1996; Decosterd & Woolf, 2000). Usou-se um protocolo de imunocitoquímica semelhante ao referido acima, com o anticorpo primário anti-Fos à concentração de 1/5000.

No final da reacção, os cortes foram montados em lâminas revestidas com gelatina, passados em xilol, para o seu clareamento e cobertos com Eukitt para a fixação da lamela. Os cortes foram seguidamente analisados num óptico de luz (Nikon) e contabilizado o número de neurónios assinalados nas lâminas espinhais, agrupadas de

acordo com o seu papel neurobiológico: I-II e III-IV. As contagens incidiram na porção lateral do corno dorsal da medula espinhal, inervada pelo nervo sural (Ma & Woolf, 1996). Foram analisados todos os cortes e calculada a média de neurónios marcados por corte. Atendendo ao reduzido número de neurónios imunoreactivos à proteína Fos (vide Resultados, secção II, A), não se aumentou o número de animais, o que impediu a análise estatística.

B. Análise do efeito comportamental do vector lentivírico que expressa o receptor DOR no DRt

1. Construção dos vectores derivados de lentivírus

Os vectores utilizados neste estudo (LV-DOR e LV-EGFP) são vectores lentivíricos construídos no laboratório do Professor Steven P. Wilson (Departamento de Farmacologia, Fisiologia e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade da Carolina do Sul, EUA).

O vector LV-DOR transporta uma cassette de expressão que contém o promotor humano da sinapsina, o cDNA do receptor DOR, a sequência IRES², o gene da EGFP e a sequência WPRE³ (Figura 4). A partícula vírica foi obtida por co-transfecção de células 293 T com este vector e 3 outros plasmídeos necessários à formação de uma partícula vírica, o plasmídeo pCMVΔR8.92 que permite o empacotamento do genoma vírico, o plasmídeo pRSV-Ver, que codifica a proteína “rev” e o plasmídeo pMD.G que codifica a glicoproteína G de envelope do vírus da estomatite vesicular (Grillo *et al.*, 2007). O vector controlo LV-EGFP foi produzido da mesma forma mas transporta uma cassette de expressão que contém o promotor humano da sinapsina, o gene da EGFP e a sequência WPRE (Figura 4). Os vectores foram quantificados por real-time PCR e os stocks de vectores são conservados numa solução de sacarose a 10% diluída numa solução salina de tampão de fosfatos 0.1 M pH 7.2 (PBS).

² IRES -Internal Ribosomal Entry Site - sequência derivado do vírus da encefalomiocardite que aumenta a eficiência da tradução de genes bicistronicos em vectores lentivíricos (Chinnasamy *et al.*, 2009)

³ WPRE -Woodchuck Hepatitis Virus Post-Transcriptional Regulatory Element - sequência do vírus da hepatite que aumenta a eficiência da tradução em vectores lentivíricos (Zufferey *et al.*, 1999).

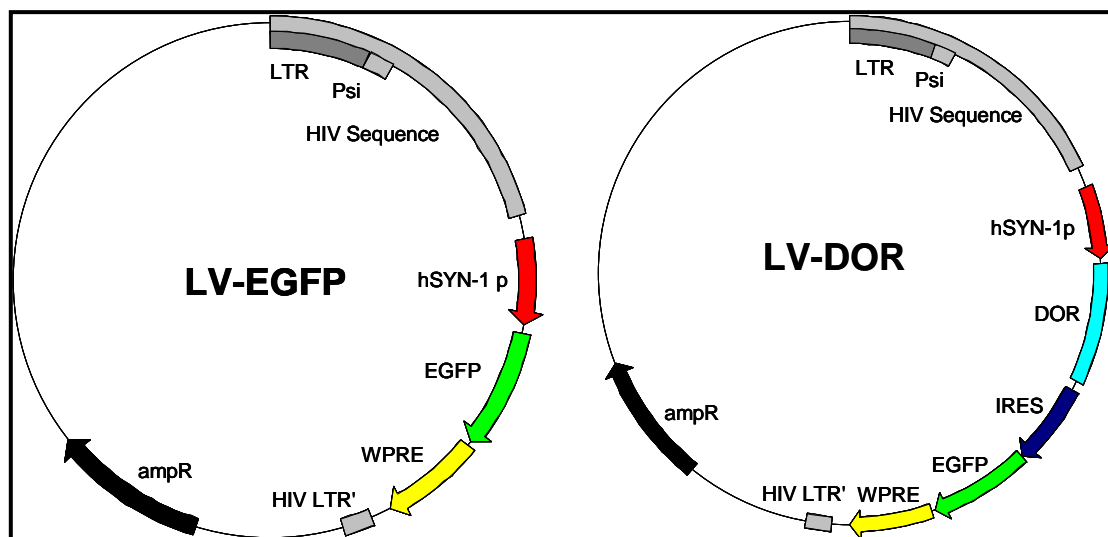


Figura 4: Esquema do vector LV-DOR e LV-EGFP.

2. Indução do modelo SNI e injeção estereotáxica dos vectores no DRt

A cirurgia para indução do modelo SNI foi realizada como descrito na secção anterior. Catorze dias após a indução do SNI, período em que os animais apresentam hipersensibilidade sensorial sustentada e estável, os animais foram anestesiados por injeção i.p. com a mistura de medetomidina/cetamina acima referida e posicionados num aparelho de estereotaxia, de acordo com o procedimento acima mencionado, de forma a alvejar o DRt esquerdo. Os animais receberam duas injeções de suspensão vírica (0,6µl/cada; 10^7 T.U⁴/µl) em dois locais do DRt esquerdo cujas coordenadas foram adaptadas do atlas de Paxinos e Watson (1998) conforme se apresenta na Tabela 2. Após a cirurgia cada um dos animais foi alojado individualmente e monitorizado para avaliar o seu comportamento e garantir o bem-estar geral.

Coordenadas (mm)	1ª inj.	2ª inj.
Dorso-ventral	-1.5	-1.7
Latero-medial	-1.4	-1.3
Rostro-caudal	-6.0	-6.4

Tabela 2 - Coordenadas estereotáxicas usadas para injectar o DRt esquerdo

⁴ T.U.-Transducing units

Os animais foram divididos em três grupos, um grupo injectado com o vector que expressa DOR - LV-DOR - (n=5), um segundo grupo injectado com o vector controlo - LV-EGFP- (n=5) e um grupo não injectado (n=6).

3. Avaliação comportamental do efeito dos vectores

Atendendo a que os animais com SNI desenvolvem de forma sustentada alodínia a estímulos mecânicos e ao frio (Decosterd & Woolf, 2000), o efeito dos vectores sobre estas alterações comportamentais foi testado, respectivamente, pelos testes de von Frey e acetona. Os testes foram realizados antes da indução do SNI, antes da injeção estereotáxica dos vectores (14 dias após SNI), e aos 7, 14, 21, 28, 38, 48 e 58 dias após injeção.

Antes da execução dos testes comportamentais, de modo a garantir a habituação dos animais ao investigador e à sala de comportamento, estes foram manuseados 10-15 minutos diariamente durante os 4 dias que antecederam a sua realização. Durante a execução dos testes, os animais eram colocados numa grelha de arame elevada e cobertos com caixas de PVC perfuradas e era primeiro realizado o teste de von Frey seguido pelo teste da acetona.

3.1. Avaliação da alodínia mecânica pelo teste de von Frey

Durante o teste, a superfície plantar lateral (área enervada pelo nervo sural) da pata posterior esquerda era estimulada com uma série de filamentos de von Frey de força ascendente (0,008g – 25g). Foi considerado como limiar de resposta, a menor força que induzia a retirada brusca da pata a 1 de 5 estímulos repetitivos (Tal & Bennett, 1994).

3.2. Avaliação da alodínia frio pelo teste da acetona

Durante este teste eram aplicados 40 µl de acetona na superfície lateral da pata posterior esquerda. A resposta observada era classificada de acordo com a seguinte escala, adaptada de Hao *et al.*, (1999):

- 0- ausência de resposta;
- 1- reacção de sobressalto mas sem elevação da pata;
- 2- elevação da pata <5 sec;
- 3- elevação prolongada da pata (5-30 sec) acompanhada por vezes do lambe e sacudir da mesma;
- 4- elevação prolongada da pata >30 sec.

O tratamento estatístico dos dados obtidos nos testes de von Frey e acetona foram analisados pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (software SPSS, versão 14.0).

4. Processamento histológico do material

4.1 Perfusão transcardíaca e fixação do material

Após a última avaliação comportamental, os animais foram anestesiados por injeção i.p. com hidrato de cloral a 35% diluído em soro (0.1 ml/100 g) e sacrificados por perfusão transcardíaca de acordo com o procedimento acima descrito.

Após perfusão, procedeu-se à disseção do bolbo raquidiano que foi seguidamente colocado na solução de fixador durante 4 horas e armazenado a 4°C numa solução de sacarose a 30% diluída em tampão fosfato. O bolbo raquidiano foi posteriormente cortado transversalmente num micrótopo de congelação a -20°C em secções coronais com 40 µm de espessura, recolhidas seriadamente (4 séries) e armazenadas numa solução de crioproteção a -20°C.

4.2. Identificação do local de injeção

Os cortes do bolbo raquidiano foram montados em lâminas revestidas com gelatina e corados pelo método formol-tionina adaptado de Donovan (1974). Os cortes foram seguidamente analisados num óptico de luz (Nikon) e o local de injeção

identificado pela presença do tracto da agulha nos cortes mais caudais do bolbo raquidiano.

Noutra série de cortes do bolbo raquidiano, os cortes foram montados em lâminas revestidas com gelatina e observados num microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha) para detectar a fluorescência verde emitida pela EGFP produzida pelas células transduzidas (Figura 4) pelo vector e analisar a extensão da área transduzida em torno do tracto da injeção. As imagens foram captadas usando o programa Axiovision (Imaging Associates).

Resultados

I. Análise do efeito de um vector derivado do HSV-1 que sobre-expressa pré-proencefalina no VLM num modelo de dor inflamatória

1. Localização da injeção dos vectores

A maioria das injeções estereotáxicas no VLM localizava-se no VLMLat. Trata-se da parte mais lateral do VLM, delimitada pelo núcleo espinhal do trigémio, parte caudal (Sp5C) e pelo núcleo reticular lateral (LRt; Figura 5 A). É a partir desta parte que se induz analgesia mais intensa e sustentada (Tavares & Lima, 2002).

A localização de cada injeção estereotáxica foi identificada pela presença do tracto da agulha nos cortes mais caudais do bolbo raquidiano. Na série de cortes de bolbo raquidiano corados pelo método formol-tionina, a zona envolvendo o tracto da agulha foi reconhecida por uma característica coloração menos marcada devida ao dano causado no tecido nervoso aquando da passagem da agulha (Figura 5C). Na outra série de cortes observados para detecção da fluorescência verde emitida pela EGFP produzida nas células transduzidas pelo vector, o tracto da agulha foi identificado pela observação de uma parte central mais escura, devida à destruição do tecido nervoso pela passagem da injeção, no meio de uma área contendo células transduzidas emitindo fluorescência (Figura 5B). Com base nestes critérios, só os resultados dos animais com o local de injeção centrado no VLMLat foram seleccionados para análise comportamental.

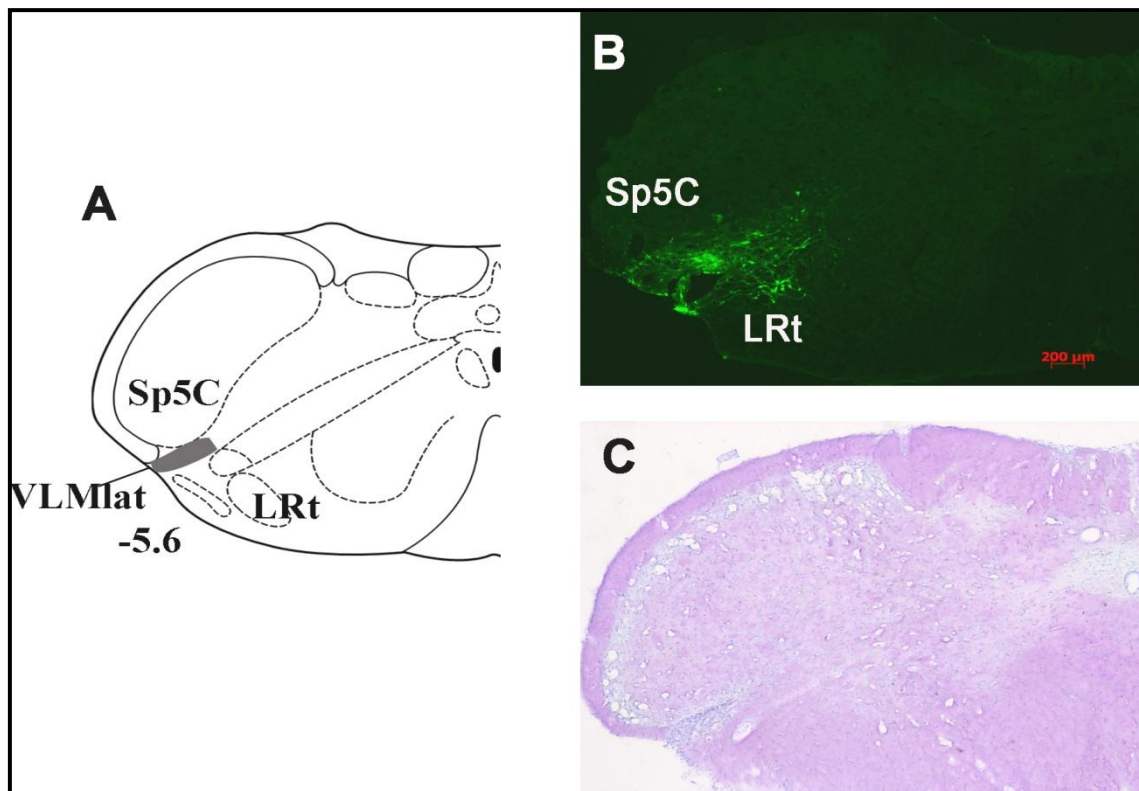


Figura 5 - Localização da injeção de HSV-PPE no VLM, centrado no VLMIat. A) Esquema de um corte coronal do bulbo a 5,6 mm caudais relativamente a linha interaural (adaptado de Paxinos e Watson, 1998), o VLMIat encontra-se delimitado pelo núcleo espinal do trigémio, parte caudal (Sp5C) e pelo núcleo reticular lateral (LRt); **B)** Fotografia de microscopia de fluorescência do local de injeção no VLMIat; **C)** Fotografia de microscopia óptica do local de injeção no VLMIat num corte corado por formol-tionina.

2. 2. Avaliação do efeito comportamental dos vectores no teste do formol

O teste do formol provoca uma resposta nociceptiva bifásica (Dubuisson *et al.*, 1977). A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção do formol e dura aproximadamente 5 minutos (Dubuisson *et al.*, 1977), enquanto a segunda fase se inicia 20 minutos após a injeção e dura aproximadamente 40 minutos (Bon *et al.*, 2002).

Durante a primeira fase, observou-se um número elevado de elevações espontâneas da pata injectada nos grupos controlo (HSV-LacZ e Veículo). No grupo HSV-PPE o número de elevações espontâneas era significativamente menor ($P < 0.01$; Figura 6) que nos grupos controlo. Os grupos HSV-LacZ e Veículo apresentavam valores muito similares.

Decorridos 15 minutos após a injeção de formol, registou-se uma diminuição abrupta do número de elevações espontâneas, comum aos 3 grupos.

Durante a segunda fase, observou-se um aumento do número de elevações espontâneas no grupo HSV-LacZ e veículo. Este aumento manteve-se ao longo de todo o período no grupo HSV-LacZ enquanto no grupo veículo o número de elevações espontâneas diminuía no final do período (60 minutos). Os dois grupos controlo são unicamente estaticamente diferentes aos 60 minutos ($p < 0.05$). No grupo HSV-PPE verificou-se um ligeiro aumento de elevações espontâneas mas este número é significativamente inferior ao do grupo veículo, dos 30 até aos 60 minutos, e ao do grupo HSV-LacZ a partir dos 45 minutos (Figura 6).

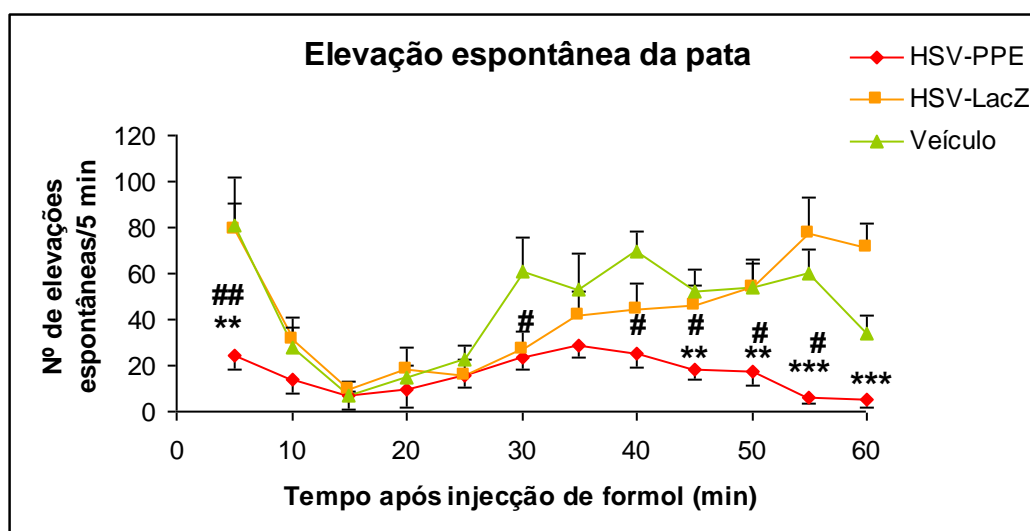


Figura 6 - Número de elevações espontâneas da pata injectada com formol, registadas em cada sessão de 5 minutos. HSV-PPE (n=7); HSV-LacZ (n=7) e Veículo (n= 3). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs HSV-LacZ; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs Veículo

3. 3. Avaliação do efeito dos vectores na expressão de *c-fos* na medula espinhal

A injeção do vector HSV-PPE, reduziu significativamente ($p < 0.05$) o número de neurónios espinhais que exprimiam a proteína Fos no corno dorsal quando comparado com a injeção do vector HSV-LacZ e do Veículo (Figura 7 A). Essa redução era notória tanto a nível das lâminas espinhais I-II ($p < 0.01$) como III-IV ($p < 0.05$).

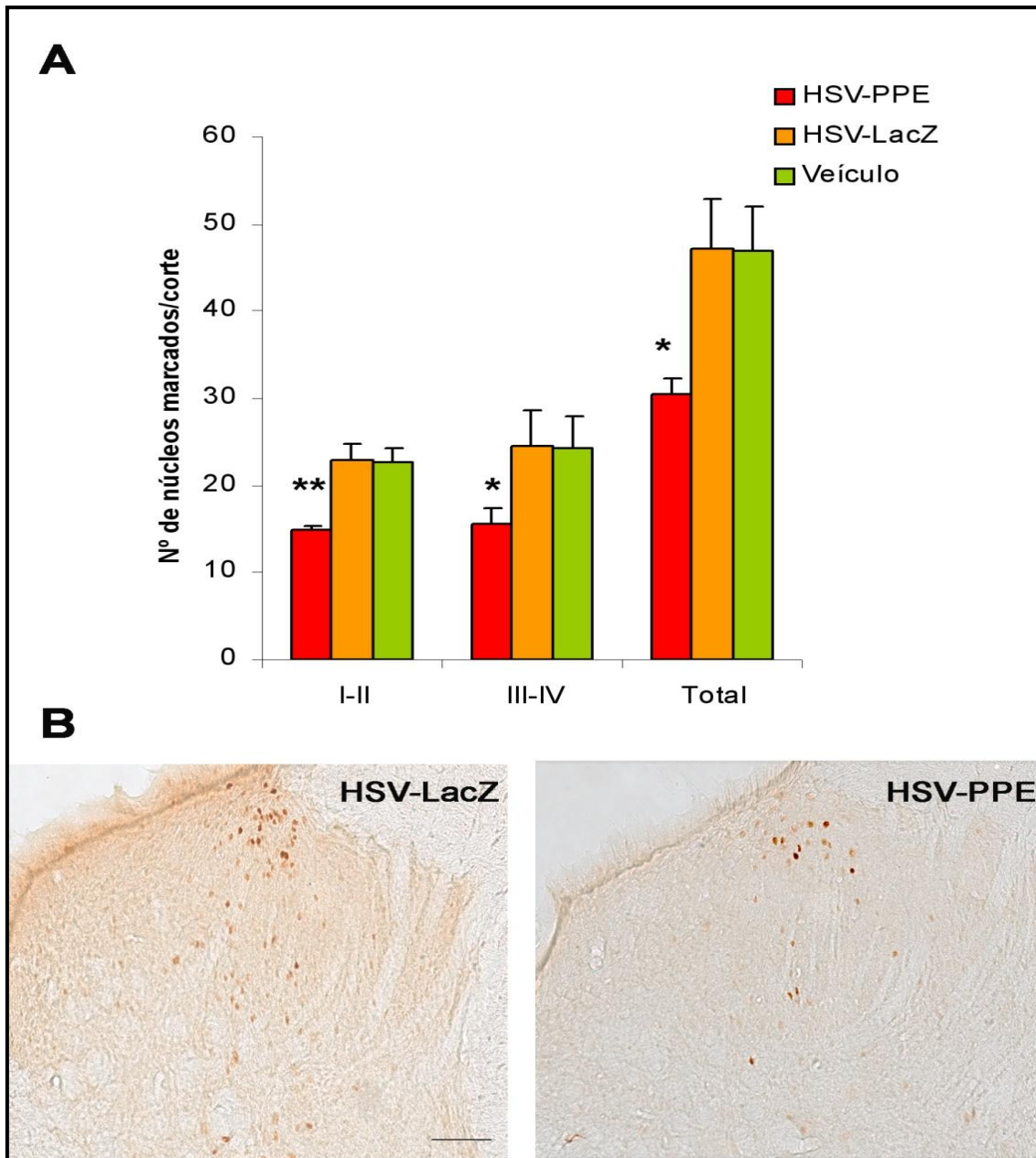


Figura 7 - Efeito do vector HSV-PPE na expressão do proto-oncogene *c-fos* no segmento espinal L4. A: Número de núcleos marcados nas lâminas I-II e III-IV no grupo HSV-PPE (n=7), ou HSV-LacZ (n=7) ou Veículo (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs HSV-LacZ ou Veículo. O grupo HSV-LacZ e Veículo não apresentam diferenças estatisticamente significativas; B: Fotografias de neurónios expressando o proto-oncogene *c-fos*, marcados pelo precipitado castanho-escuro da reacção de imunohistoquímica num corte de um animal injectado com HSV-LacZ ou HSV-PPE; Escala= 100 μ M

II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que sobre-exprime o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática

A. Caracterização da expressão de c-fos no modelo SNI

No modelo SNI, de entre os vários estímulos de indução de produção de c-fos utilizados, verificou-se que o estímulo táctil, não nódico foi o que induziu uma maior expressão de c-fos, em todas as lâminas espinhais observadas: I/II, III/IV e V/VI.

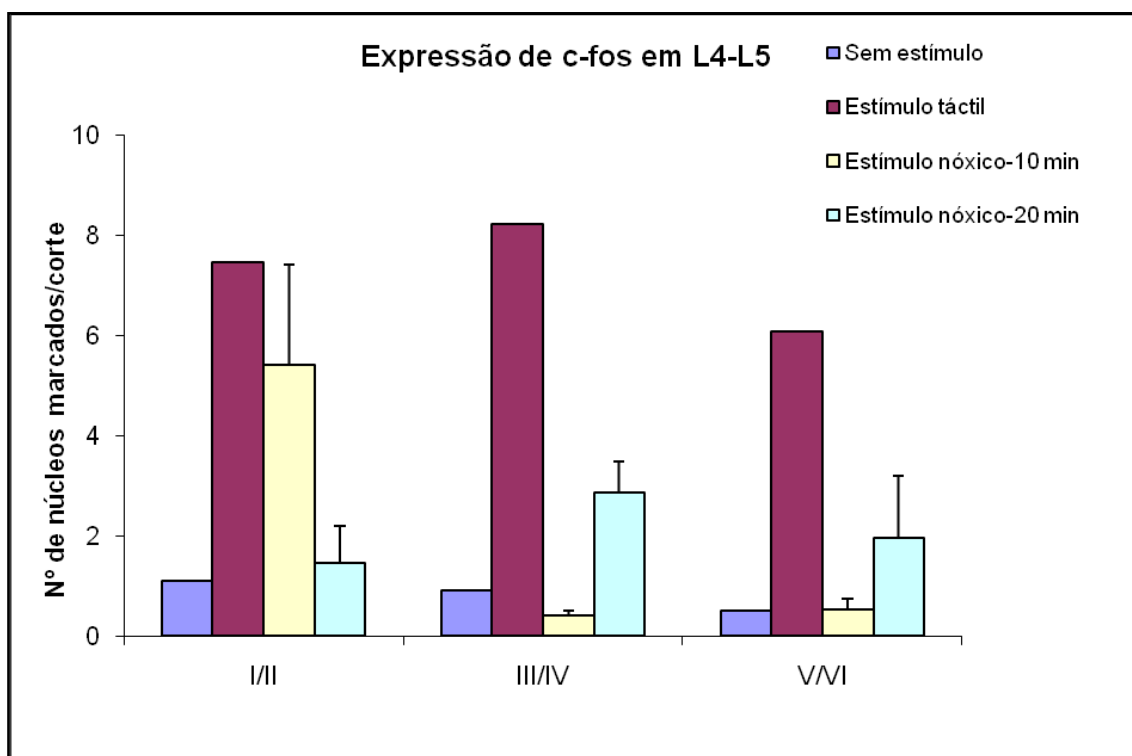


Figura 8 - Número de neurónios expressando o proto-oncogene *c-fos* nas lâminas espinhais I/II, III/IV e V/VI de segmentos de L4-L5 provenientes de animais com SNI sujeitos a diferentes estímulos de indução de c-fos: Sem estímulo (n=1), Estímulo táctil (n=1), Estímulo nódico- 10 min (n=2) e Estímulo nódico- 20 min (n=2).

B. Análise do efeito comportamental do vector lentivírico que sobre-expressa o receptor DOR no DRt.

1) Localização da injeção estereotáxica dos vectores

O DRt localiza-se lateralmente ao núcleo do tracto solitário (NTS), medialmente ao núcleo trigeminal espinhal, *pars caudalis* (Sp5C) e ventralmente ao núcleo cuneato (Cu; Figura 9 A).

Os locais de injeção foram identificados por duas técnicas distintas: formol-tionina (Figura 9 C) e detecção da fluorescência verde emitida pela EGFP. Neste último caso, foi também possível analisar a extensão da área transduzida em torno do tracto da injeção (Figura 9 B). Todos os animais incluídos no estudo tinham locais de injeção correctamente posicionados no DRt.

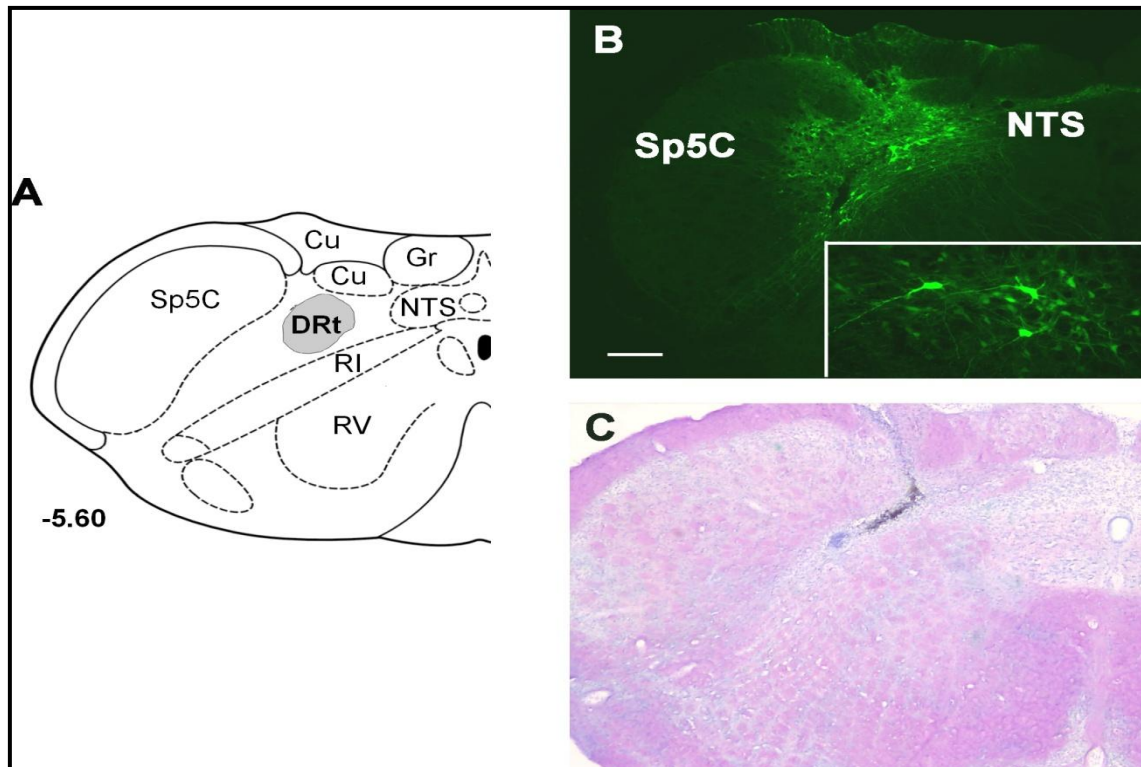


Figura 9 - Localização da injeção de LV-DOR no DRt. A) Esquema de um corte coronal do bolbo, localizado a 5,6 mm caudais relativamente a linha interaural (adaptado de Paxinos e Watson, 1998), o DRt encontra-se localizado lateralmente ao núcleo do tracto solitário (NTS), medialmente ao núcleo trigeminal espinhal, *pars caudalis* (Sp5C) e ventralmente ao núcleo cuneato (Cu); B) Fotografia de microscopia de fluorescência do local de injeção no DRt esquerdo e em destaque no canto inferior direito, amplificação mostrando em pormenor neurónios expressando EGFP; C) Fotografia de microscopia óptica do local de injeção no DRt num corte corado por formol-tionina; Escala=200µm

2) Avaliação comportamental do efeito do vector LV-DOR

2.1. Teste de Von Frey

Antes da indução do SNI, o limiar de remoção da pata aos estímulos mecânicos exercidos pelos filamentos de von Frey, situava-se em média à volta das 16 gramas para os três grupos. Após a indução do SNI e até aos 14 dias, esse limiar diminuiu gradualmente em todos os grupos. Ao fim desse tempo, os valores do limiar de resposta eram baixos, traduzindo um estado de alodínia mecânica profunda, e relativamente similares nos três grupos ($0,06 \pm 0,06$ g no grupo LV-DOR; $0,13 \pm 0,29$ g no grupo LV-EGFP; $0,03 \pm 0,004$ g no grupo SNI). O limiar de resposta dos animais do grupo SNI (não injectados) permaneceu baixo e estável até ao final da experiência ou seja até 74 dias após indução do SNI.

Após a injeção do vector LV-DOR e até ao final do tempo de teste (58 dias), o limiar de remoção da pata, manteve-se neste grupo muito similar ao observado no grupo SNI, salvo ligeiras oscilações não significativas. Nestes dois grupos, LV-DOR e SNI, os animais apresentaram até ao final da experiência, um limiar de resposta com valores próximos dos observados antes da injeção.

Após a injeção do vector LV-EGFP o limiar de remoção da pata manteve-se sensivelmente estável até 14 dias após a estereotaxia, altura a partir da qual se começou a registar um aumento gradual que culminou no 38º dia após a injeção ($0,68 \pm 1,78$ g). Até ao final da experiência observou-se uma diminuição gradual do limiar de resposta, ficando-se no entanto, no término do tempo (58 dias após estereotaxia) por um valor superior, mas estatisticamente não significativo, ao observado nos outros 2 grupos ($0,02 \pm 0,01$ g no grupo LV-DOR e $0,04 \pm 0,01$ g no grupo SNI vs $0,36 \pm 0,80$ g no grupo SNI; Figura 10).

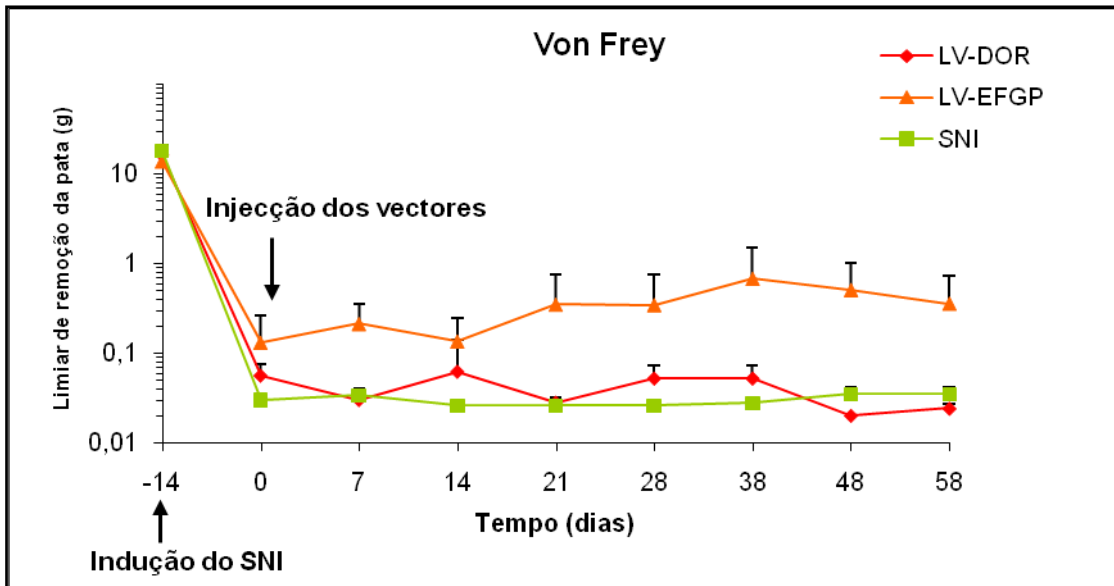


Figura 10 - Efeito do vector LV-DOR na alodínia mecânica avaliado pelo teste de von Frey. LV-DOR (n=5); LV-EFGP (n=5); SNI (n=6).

2.2. Teste de Acetona

Antes da indução do SNI, a duração de remoção da pata ao estímulo exercido, situava-se nos zero segundos para os três grupos.

Após indução do SNI, a intensidade da resposta aumentou gradualmente até aos 14 dias, traduzindo-se numa maior duração de remoção da pata acompanhada por vezes do lambar ou sacudir da mesma, comportamento comum aos três grupos. Aos 14 dias os valores de resposta eram altos, manifestando um estado de alodínia ao frio, e relativamente próximos nos três grupos (3 ± 0 no grupo LV-DOR; $3,5 \pm 1$ no grupo LV-EFGP; 3 ± 0 no grupo SNI). A resposta dos animais do grupo SNI (não injectados) permaneceu relativamente elevada e estável durante todo o tempo em que decorreu a experiência ou seja até 74 dias após indução do SNI.

Após injeção do vector LV-EFGP no DRt, observou-se uma ligeira diminuição, não significativa, da intensidade de resposta até ao 21º dia após a estereotaxia ($2,4 \pm 0,89$). A partir do 21º dia até ao 58º, os animais deste grupo apresentaram um comportamento relativamente igual ao do grupo anterior, não apresentando os grupos LV-EFGP e SNI diferenças estatisticamente significativas.

Após injeção do vector LV-DOR no DRt (14 dias após indução do SNI), a intensidade da resposta foi diminuindo gradualmente até ao 21º dia após a estereotaxia, altura em que atingiu o seu valor mais baixo e que se manteve até ao 28º (1,6 ± 1,34). Após este período e até ao 38º dia registou-se um ligeiro aumento (2,4 ± 0,55), tendo depois mantido-se relativamente estável até ao final da experiência (2 ± 0,71) e significativamente abaixo da resposta observada nos grupos controlo (LV-EGFP e SNI).

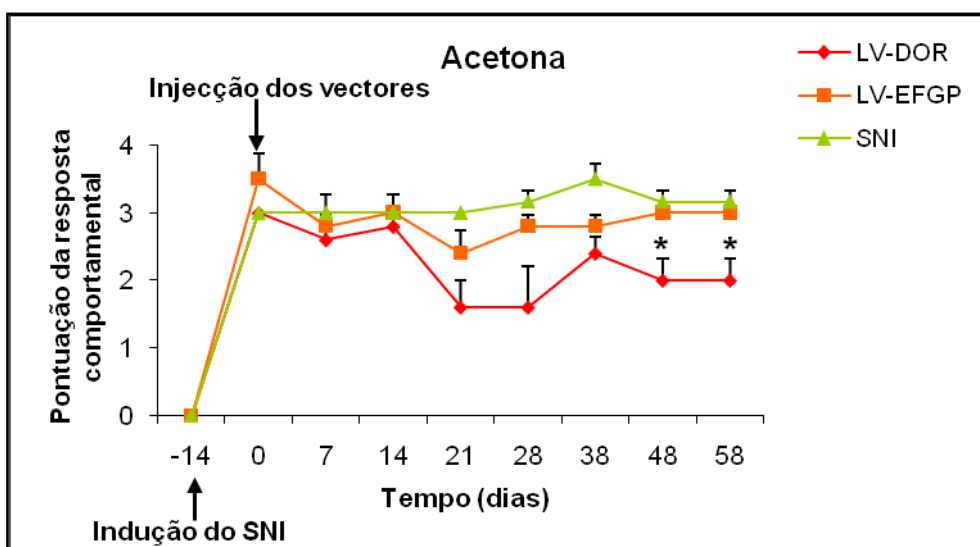


Figura 11 - Efeito do vector LV-DOR na alodínia ao frio avaliado pelo teste da acetona. LV-DOR (n=5); LV-EGFP (n=5); SNI (n=6). *p<0,05; vs LV-EGFP ou SNI. O grupo LV-EGFP e SNI não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Discussão

I. Análise do efeito analgésico da injeção no VLM de um vector derivado do HSV-1 que sobre-exprime pré-proencefalina - modelo de dor inflamatória

Neste estudo analisaram-se os efeitos da injeção no VLM de um vector derivado do HSV-1 e que sobre-exprimia pré-proencefalina (vector HSV-PPE). Utilizou-se um modelo de dor inflamatória - o teste do formol - pela sua validade pré-clínica na avaliação da eficácia de analgésicos e por permitir uma análise simultânea da actividade nociceptiva de neurónios espinhais, através da detecção imunocitoquímica da proteína Fos, produto de activação do proto-oncogene *c-fos*. A injeção de HSV-PPE induziu um efeito analgésico no teste do formol e reduziu a expressão do *c-fos*, apontando para utilidade analgésica da abordagem experimental ensaiada, que deverá ser atribuída a alterações da acção modulatória descendente do VLM. Atendendo a que a análise comportamental e o estudo da expressão do proto-oncogene *c-fos* têm especificidades próprias, é importante analisar os resultados de cada estudo separadamente.

1. Efeitos no teste do formol

O teste do formol é um modelo fiável de dor tónica, do tipo inflamatório (Dubuisson *et al.*, 1977). A administração subcutânea de formol na pata gera comportamentos diversos direccionados à pata como abanar, morder, lambar ou elevar espontaneamente. Considera-se que as elevações espontâneas da pata são o parâmetro mais fidedigno e de mais fácil análise e quantificação, já que a sua magnitude é directamente proporcional à concentração de formalina (Abbot *et al.*, 1995; Hao *et al.*, 2008; Goss *et al.*, 2001; Munro, 2009).

No teste do formol, as respostas comportamentais organizam-se de forma bifásica. A primeira fase - fase aguda - ocorre imediatamente após a injeção de formol e dura cerca de 10 minutos (Dubuisson *et al.*, 1977). A segunda fase - fase tónica - inicia-se cerca de 20 minutos após a injeção de formol, tem uma duração mais longa (cerca de 40 minutos; Bon *et al.*, 2002). Entre as duas fases descritas, ocorre um período de cerca

de 10 minutos, em que o comportamento animal se encontra numa fase de quiescência (Bon *et al.*, 2002; Dubuisson *et al.*, 1977). Tem sido referido haver mecanismos neurobiológicos distintos associados às duas fases do teste do formol. A resposta na fase aguda é atribuída à estimulação química directa de nociceptores aferentes primários tipo C à periferia (Hunskar & Hole, 1987). A fase tónica resulta da sensibilização de neurónios do corno dorsal - sensibilização central - devida à transmissão de informação nociceptiva dos aferentes primários durante a fase aguda ou mesmo à hiperactividade dos mesmos, induzida pelo processo inflamatório (Coderre *et al.*, 1993; Tjolsen *et al.*, 1992). Os dados parecem indicar que na fase tónica as influências supra-espinhais prevalecem pelo que a análise da fase tónica é indicadora do que ocorre com a modulação descendente da dor (Hao & Ogawa, 1998; Wheeler-Aceto & Cowan, 1991).

Neste trabalho, a injeção do vector HSV-PPE induziu uma redução significativa do número de elevações espontâneas em ambas as fases do teste do formol, em comparação com os dois grupos experimentais controlo (injectados com o vector controlo HSV-LacZ ou com veículo). As ligeiras diferenças entre os dois grupos controlo em alguns tempos do teste do formol (eg. 30 e 60 min) não são valorizáveis, atendendo ao facto de não serem estatisticamente significativos e a que o grupo veículo incluía apenas 3 animais. Para além disso, não havia diferenças entre os dois grupos controlo quando se analisava a expressão espinal de *c-fos*. Os resultados comportamentais obtidos mostram que a libertação de encefalina no VLM deve alterar a capacidade de modulação descendente daquela área bulbar. Importa lembrar que tal acção modulatória é dupla, i.é inibidora e facilitadora, e que pode ocorrer através de projecções directas para a medula espinal ou através de vias dissinápticas que envolvem a participação de outros centros encefálicos (Tavares & Lima, 2002; 2007). Relativamente à via directa VLM-medula espinal, desconhecem-se os neurotransmissores envolvidos e os circuitos em que tais axónios se articulam a nível espinal. Caso os neurónios do VLM que projectam directamente para a medula tenham sido fortemente transduzidos pelo vector HSV-PPE, é esperado que tenha ocorrido aumento da libertação de encefalinas no corno dorsal da medula espinal. A analgesia na primeira fase do teste do formol, poderia, portanto, ser devida à libertação de encefalinas. Efectivamente, sabe-se que a libertação de encefalinas na medula espinal estabiliza a membrana pós-sináptica das fibras C e inibe a libertação de neurotransmissores, como a substância P e o glutamato, bloqueando assim a passagem

de informação nociceptiva da periferia até ao corno dorsal da medula espinhal (Sessle, 2000).

Apesar da analgesia detectada na segunda fase do teste do formol não ser explicável pelo bloqueio da passagem de informação da periferia para a medula, dado que as acções centrais prevalecem na fase tónica, é interessante referir que alguns estudos sugerem que um bloqueio muito forte da transmissão de informação nociceptiva na primeira fase do teste do formol poderá atenuar a sensitização central associada à segunda fase do teste do formol (McCall *et al.*, 1996). Contudo, a analgesia na fase tónica do formol era muito marcada, fazendo supor que deverão ser accionados mecanismos adicionais. O conhecimento dos circuitos neuronais em que participam os neurónios transduzidos pelo vector HSV-PPE, poderá esclarecer os mecanismos envolvidos. É de notar que um importante contingente de neurónios do VLM transduzidos pelo vector HSV-PPE poderá não participar directamente na via VLM-medula, o que não exclui, contudo, a sua participação na modulação descendente exercida pelo VLM. Atendendo a que os neurónios do VLM que projectam para a medula participam também em acções de facilitação, é provável que os neurónios transduzidos pelo vector HSV-PPE sejam interneurónios que bloqueiam a actividade facilitadora daquelas células. Deste modo, a analgesia na segunda fase do teste do formol, poderá dever-se a um bloqueio da acção facilitatória do VLM e não à potenciação do seu papel antinociceptivo. Para esclarecer estas hipóteses será necessário esclarecer onde ocorre a libertação de encefalina (medula espinhal ou VLM), se esta ocorre de modo diferencial ao longo do teste do formol e qual a participação dos neurónios transduzidos na via de projecção VLM-medula. Estudos de microdiálise e a utilização de neurotraçadores que migram retrogradamente a partir da medula serão realizados pela equipa de investigação onde decorreu esta dissertação para esclarecer estas questões.

2. Efeitos na expressão espinhal do proto-oncogene *c-fos*

Conforme já referido nesta dissertação, o estudo da expressão do proto-oncogene *c-fos* em neurónios espinhais é um método fiável para monitorizar a activação nociceptiva a nível espinhal. No caso do teste do formol, e de modo análogo ao que ocorre com outros estímulos nociceptivos, foi demonstrado existir uma correlação

inversa entre a magnitude da analgesia e a expressão do *c-fos* na medula espinhal (Gogas *et al.*, 1991; Hammond *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1987). No presente estudo verificou-se que o vector HSV-PPE induziu analgesia em ambas as fases do teste do formol e reduziu significativamente o número de neurónios imunorreactivos à proteína Fos quer no corno dorsal da medula espinhal (lâminas I-III) quer na parte profunda (lâminas IV-V). Atendendo a que todo o corno dorsal é afectado pela injeção de HSV-PPE no VLM, é esperado que a diminuição da actividade nociceptiva dos neurónios espinhais possa afectar a transmissão supra-espinhal de informação nociceptiva, dado que esses neurónios participam nas principais vias espinho-fugais.

3. Perspectivas e implicações do estudo

A analgesia comportamental e inibição da expressão do *c-fos* induzidas pela injeção de HSV-PPE no VLM foi um resultado positivo deste trabalho. A intensidade e sustentabilidade da analgesia obtidas no teste do formol mostram que a terapia génica com utilização de formas não-replicativas do vector HSV-1 é uma metodologia que permite obter resultados duradouros. Contudo, um aspecto a considerar diz respeito à migração do vector HSV-1. Estudos realizados pelo grupo de trabalho onde decorreu esta dissertação de Mestrado, e que consistiram na injeção de HSV-LacZ no VLM, mostraram que há um contingente de neurónios encefálicos aferentes ao VLM que exprimem β -galactosidade (Martins *et al.*, 2008). Tal contingente era, contudo, muito moderado, com tempos de sobrevivência curtos (2 dias), tal como foram usados no presente estudo. A natureza encefalinérgica de alguns desses neurónios ficou demonstrada por estudos que envolveram a dupla detecção imunocitoquímica da β -galactosidade e da encefalina (Martins *et al.*, 2009). Curiosamente, estes neurónios localizavam-se no RVM e no grupo noradrenérgico A₅ da ponte, áreas que se admite participarem na modulação descendente oriunda do VLM, através de vias dissinápticas (Tavares *et al.*, 1996; 1997; Tavares & Lima, 2002). Deste modo, poderia sugerir-se que os efeitos antinociceptivos obtidos após injeção de HSV-PPE no VLM, eram devidos à transdução de neurónios daqueles aferentes do VLM que libertariam encefalina na medula espinhal através de colaterais, pelo que o papel do VLM era modesto. Contudo, diversas hipóteses sugerem que, o VLM desempenhou papel primordial nos efeitos antinociceptivos induzidos pelo HSV-PPE: 1) o número de neurónios transduzidos no

VLM era muito superior ao que ocorria nas restantes áreas encefálicas no tempo de sobrevivência em questão (Martins et al., 2008), e 2) a injeção de naloxona no VLM revertia a analgesia induzida pelo HSV-PPE (Martins *et al.*, 2009).

Conforme foi já referido, a analgesia intensa e sustentada induzida após injeção do vector HSV-PPE no VLM é um resultado positivo do trabalho. Não é, contudo, lícito retirar implicações translacionais directas dos nossos achados tanto mais que o VLM se encontra envolvido em funções vitais, como o controlo cardiovascular (Lima, 2009). Contudo, estes resultados podem abrir portas a outros estudos em que a aplicação de metodologias semelhantes a outras áreas encefálicas, bem caracterizadas morfo-funcionalmente, podem trazer resultados úteis para o controlo da dor.

II. Análise do efeito de um vector derivado de lentivírus que expressa o receptor delta opióide no DRt num modelo de dor neuropática

De modo análogo ao estudo I, neste estudo utilizaram-se duas abordagens – estudo da expressão do proto-oncogene *c-fos* e análises comportamentais que visavam, em última instância, definir a utilidade da sobre-expressão de receptores DOR no DRt em ratos com um modelo de dor neuropática (SNI). Enquanto a segunda abordagem está francamente estabelecida, o protocolo a utilizar na primeira teve que ser avaliado no sentido de definir qual o tipo e duração do estímulo a aplicar aos animais SNI

A. Caracterização da expressão de *c-fos* no modelo SNI

O objectivo deste estudo era, como já anteriormente referido, comparar a expressão de *c-fos* a nível da medula espinhal, induzida por um estímulo táctil inócuo que, de acordo com a literatura, sabíamos ser capaz de promover a expressão moderada de *c-fos* (Intondi *et al.*, 2008), com outros estímulos susceptíveis de induzir uma expressão mais significativa. O objectivo final era definir um protocolo de estimulação que pudesse ser utilizado na análise do efeito, presumivelmente analgésico, da manipulação do DRt pelo vector LV-DOR. De entre os vários estímulos utilizados, verificou-se que o estímulo táctil, inócuo induzia uma maior expressão de *c-fos*, em

todas as lâminas espinhais (I/II, III/IV e V/VI). Contudo, tratava-se de um número muito modesto de neurónios pelo que o estudo com *c-fos* não foi incluído nesta dissertação de Mestrado para avaliar os efeitos da manipulação do DRt pelo LV-DOR. Porém, pela importância da avaliação da actividade nociceptiva dos neurónios espinhais, importa continuar a definir o protocolo de estimulação, nomeadamente aumentando o tempo de aplicação do estímulo inócuo. De notar, contudo, que a definição de um protocolo de estimulação para indução de *c-fos* em modelos de dor crónica tem diversas dificuldades (Coggeshall, 2005). Sabia-se já que a expressão espinhal de *c-fos* aumentava na ausência de estímulo adicional ou após estímulo inócuo e encontrava-se demonstrada a distribuição pelas lâminas da medula espinhal (Abbadie & Besson, 1992; Lantéri-Minet *et al.*, 1993; Leah *et al.*, 1996; Ma & Woolf, 1996). Nos nossos resultados, o estímulo nódico de 10 minutos induzia mais *c-fos* precisamente nas lâminas I/II, enquanto o estímulo táctil induzia uma expressão mais generalizada nas diferentes lâminas da medula espinhal. No entanto, contrariamente ao esperado, era o estímulo inócuo (táctil) que apresentava maior indução. Urge aumentar o número de animais neste grupo experimental para confirmar a validade desta conclusão. Pode ser importante antecipar o tempo de perfusão (2 horas), atendendo a que foi já sugerido que a dor crónica ou uma inflamação sustentada podem antecipar o pico de expressão da proteína Fos (Draisci & Iadarola, 1989; Pinto *et al.*, 2008a).

B. Análise do efeito comportamental do vector lentivírico que sobre-expressa o receptor DOR no DRt.

Este estudo centrou-se na análise do efeito comportamental da injeção de LV-DOR no DRt num modelo de dor neuropática. Constatou-se a ausência de efeito na alodínia mecânica mas observou-se um efeito modesto sobre a alodínia ao frio. Neste estudo não foi avaliada a expressão de DOR após injeção do vector mas pretende-se de futuro avaliar essa expressão por técnicas de imunohistoquímica e *western blot*. A utilização de agonistas marcados dos DOR para estudar o *binding* após injeção do vector LV-DOR está também a ser equacionada.

4. 1. Teste de Von Frey

Neste teste os animais injectados com LV-DOR apresentaram um limiar de resposta com valores próximos dos observados antes da injeção e similares aos observados para os animais que não foram injectados. O grupo LV-EGFP apresentou uma ligeira melhoria após injeção, mas estatisticamente não significativa face ao que foi detectado nos outros dois grupos experimentais, pelo que não parece legítimo equacionar a hipótese de interferência da EGFP sobre a actividade pró-nociceptiva do DRt. Aliás, os resultados obtidos e que revelam ausência de efeito do DRt na modulação da alodínia mecânica estão de acordo com dados obtidos previamente após manipulação do DRt (Martins *et al.*, submetido). Poder-se-ia, também, propor que a falta de efeito se deve à expressão insuficiente de DOR induzida pelo vector LV-DOR. Contudo, é de notar que o vector teve um efeito, embora moderado, na alodínia ao frio. A existência de modulação descendente direccionada diferencialmente aos vários tipos de estímulos é um aspecto da neurobiologia da dor que tem vindo a ser constatado.

5. Teste de Acetona

No teste de acetona, que avalia a alodínia pelo frio, verificou-se que o grupo injectado com o vector LV-DOR apresentava uma diminuição moderada da intensidade da resposta significativamente abaixo da resposta observada nos grupos controlo (LV-EGFP e SNI), e que era estatisticamente significativa nos tempos finais do protocolo experimental. Por questões de limitação de tempo de realização da tese de Mestrado não foi possível explorar tempos superiores aos 58 dias. Contudo, interessava ver durante quanto tempo a analgesia induzida pelo vector LV-DOR se mantinha. É interessante que o efeito analgésico seja sustentado tanto mais que não é esperado que a expressão do transgene DOR esteja a aumentar ao longo do tempo. Atendendo a que se verificou que a expressão dos receptores DOR diminui no DRt após instalação de dor crónica inflamatória (Neto *et al.*, 2008), é possível que essa diminuição possa progredir ao longo do tempo de duração do SNI, ocorrendo uma *up-regulation* da actividade desses receptores. A combinação de estudos estruturais (expressão de DOR) com abordagens farmacológicas (instilação de agonistas) realizada ao longo do tempo de duração de SNI poderia contribuir para esclarecer estas questões.

Considerações Finais e Propostas de Trabalho Futuro

A modulação do sistema supra-espinhal de controlo da dor emergiu recentemente como uma possível alternativa para o controlo da dor crónica refractária. A possibilidade dessa modulação poder vir a ser feita por terapia genica tem movido muitas das pesquisas recentes nesta área, com alguns resultados a demonstrarem um possível papel para aquela técnica como arma terapêutica para uma situação tão debilitante e angustiante como pode ser a dor crónica. Contudo, é ainda necessário ultrapassar muitas limitações desta técnica, nomeadamente garantir a sua segurança absoluta e perpetuação dos efeitos. A utilidade da terapia genica no conhecimento neurobiológico do sistema supra-espinhal de controlo da dor é, contudo, incontestável. Os resultados obtidos têm sido essenciais para compreender diversos aspectos da neurobiologia do processo de modulação da dor a partir do encéfalo.

Neste trabalho, pela injeção do vector HSV-PPE, que sobre-exprime pré-proencefalina, no VLM, foi induzida analgesia comportamental e redução significativa da expressão de *c-fos* a nível espinhal num modelo animal de dor crónica do tipo inflamatório. A intensidade e sustentabilidade da analgesia obtida no teste de formol mostra que a terapia genica com utilização de formas não-replicativas do vector HSV-1 é uma metodologia que permite obter resultados sustentados. Por outro lado, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos como o conhecimento dos circuitos neuronais em que participam os neurónios transduzidos pelo vector HSV-PPE e esclarecer se a libertação de encefalina ocorre de modo diferencial ao longo do teste do formol.

A injeção de LV-DOR no DRt num modelo de dor neuropática permitiu verificar a ausência de efeito na alodínia mecânica e um efeito modesto sobre a alodínia ao frio.

Neste estudo não foi avaliada a expressão de DOR após injeção do vector mas pretende-se de futuro avaliar essa expressão por técnicas de imunohistoquímica e *western blot*, de modo a confirmar se uma possível expressão insuficiente dos receptores DOR poderá ter estado na origem do efeito modesto observado sobre a

alodínia ao frio. Atendendo a que o objectivo geral deste trabalho era equacionar a combinação de metodologias de manipulação do VLM e DRt e que os resultados obtidos mostram que o DRt modula diferencialmente modalidades sensoriais distintas, importa agora testar o efeito do vector LV-DOR no mesmo modelo de dor inflamatória usado no primeiro estudo. A combinação das duas abordagens poderá dar um resultado mais potente e sustentado no que respeita à indução de analgesia. Os resultados obtidos nesta dissertação de Mestrado podem servir de base a outros estudos em que se pretenda a aplicação de metodologias semelhantes a outras áreas encefálicas de mais fácil abordagem neurocirúrgica.

Bibliografia

Abbadie C, Besson JM, 1992. c-fos Expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neuroscience* 48:985–993.

Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF, 1995. The formalin test: scoring properties of first and second phases of pain response in rats. *Pain* 60:91-102.

Almeida A, StØrkson R, Lima D, Hole K and Tjølsen A, 1999. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *European Journal of Neuroscience* 11:110-122.

Almeida A, Tavares I, Lima D, 1995. Projection sites of superficial or deep dorsal horn in the dorsal reticular nucleus. *Neuroreport* 6:1245–1248.

Almeida A, Tavares I, Lima D, Coimbra A, 1993. Descending projections from the medullary dorsal reticular nucleus make synaptic contacts with spinal cord lamina I cells projecting to that nucleus: an electron microscopic tracer study in the rat. *Neuroscience* 55:1093–1106.

Basbaum AI, Fields HL, 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann. Rev. Neurosci.* 7:309–338.

Bernard JF, Villanueva L, Carroué J, Le Bars D, 1990. Efferent projections from the subnucleus reticularis dorsalis (SRD): a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study in the rat. *Neurosci. Lett.* 116:257–262.

Bon K, Wilson SG, Mogil JS, Roberts WJ, 2002. Genetic evidence for the correlation of deep dorsal horn Fos protein immunoreactivity with tonic formalin pain behavior. *J Pain* 3:181–189.

Bullitt E, 1990. Expression of c-fos-like protein as a marker of neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 296:517–530.

Chinnasamy N, Shaffer J, Chinnasamy D, 2009. Production of Multicistronic HIV-1 Based Lentiviral Vectors *Methods in Molecular Biology* 515:1-14.

Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL and Melzack R, 1993. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52:259-285.

Coggeshall RE, 2005. Fos, nociception and the dorsal horn. *Progress in neurobiology* 77(5):299-352.

Coimbra A, 1995. A dor como sintoma e como doença: Progressos recentes na compreensão dos seus mecanismos determinantes. Fundação Calouste Gulbenkian

Davis M, 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Ann. Rev. Neurosci.* 15:353–375.

Decosterd I, Woolf CJ, 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.

Donovick PJ, 1974. A metachromatic stain for neural tissue. *Stain Techn* 49:49-51.

Draisci G, Iadarola MJ, 1989. Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Brain research. Molecular brain research* 6(1):31-37.

Dubuisson D, Dennis SG, 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161–174.

Fields HL, Heinricher MM, 1985. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philos. Trans. of the R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 308:361–374.

Foong FW, Duggan AW, 1986. Brain-stem areas tonically inhibiting dorsal horn neurones: Studies with microinjection of the GABA analogue piperidine-4-sulphonic acid. *Pain* 27:361-371.

Gebhart GF, Ossipov MH, 1986. Characterization of inhibition of the spinal nociceptive tail-flick reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *J Neurosci* 6:701-713.

Gebhart GF, Randich A, 1990. Brainstem modulation of nociception in Klemm WR, Vertes RP (eds): *Brainstem Mechanisms of Behavior*, New York, NY, John Wiley & Sons, Inc, pp 315-352.

Gogas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI, 1991. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: Correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience* 41:617-628.

Goss JR, Mata M, Goins WF, Wu HH, Glorioso JC and Fink DJ, 2001. Antinociceptive effect of a genomic herpes simplex virus-based vector expressing human proenkephalin in rat dorsal root ganglion. *Gene Therapy* 8:551–556.

Grillo CA, Tamashiro KL, Piroli GG, Melhorn S, Gass JT, Newsom RJ, Reznikov LR, Smith A, Wilson SP, Sakai RR, Reagan LP, 2007. Lentivirus-mediated downregulation of hypothalamic insulin receptor expression. *Physiology & Behavior* 92:691–701.

Hall JG, Duggan AW, Morton CR, Johnson SM, 1982. The location of brainstem neurones tonically inhibiting dorsal horn neurones of the cat. *Brain Res* 244:215-222.

Hammond DL, Presley R, Gogas KR, Basbaum AI, 1992. Morphine or U-50,488 suppresses Fos protein-like immunoreactivity in the spinal cord and nucleus tractus solitarii evoked by noxious visceral stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 315:244-253.

Hao J, Liu MG, Yu YQ, Cao FL, Li Z, Lu ZM, Chen J, 2008. Roles of peripheral mitogen-activated protein kinases in melittin-induced nociception and hyperalgesia. *Neuroscience* 152:1067-1075.

Hao JX, Shi TJ, Xu IS, Kaupilla T, Xu XJ, Hokfelt T, Bartfai T, Wiesenfeld-Hallin Z, 1999. Intrathecal galanin alleviates allodynia-like behaviour in rats after partial peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*, 11:427-432.

Hao S, Ogawa H, 1998. Naltrexone, but not atropine or yohimbine, antagonizes suppression of formalin-induced spinal sensitization by intrathecal nociceptin. *Life Sciences* 63(11): A167-A173.

Hunskar S, Hole K, 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103-114.

Hunt SP, Pini A, Evan G, 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal neurons following sensory stimulation. *Nature* 328:632-634.

Intondi AB, Dahlgren MN, Eilers MA, Taylor BK, 2008. Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain. *Pain* 15; 137(2):352–365.

Janss AJ, Gebhart GF, 1988. Brainstem and spinal pathways mediating descending inhibition from the medullary lateral reticular nucleus in the rat. *Brain Res.* 440:109-122.

Jones SL, 1992. Noradrenergic modulation of noxious heat-evoked Foslike immunoreactivity in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 325:435–445.

Kang W, Wilson MA, Bender MA, Glorioso JC, Wilson SP, 1998. Herpes virus mediated preproenkephalin gene transfer to the amygdala is antinociceptive. *Brain Res.* 792:133–135.

Lantéri-Minet M, de Pommery J, Herdegen T, Weil-Fugazza J, Bravo R, Menetrey D, 1993. Differential time course and spatial expression of Fos, Jun, and Krox-24 proteins in spinal cord of rats undergoing subacute or chronic somatic inflammation. *J Comp Neurol* 333:223–235.

Leah JD, Porter J, de-Pommery J, Menetrey D, Weil-Fugazza J, 1996. Effect of acute stimulation on Fos expression in spinal neurons in the presence of persisting C-fiber activity. *Brain Res* 719:104–111.

Lima D, 1990. A spinomedullary projection terminating in the dorsal reticular nucleus of the rat. *Neuroscience* 34:577–589.

Lima D, 2009. Ascending pathways: anatomy and physiology. In "The senses: a comprehensive reference" "Pain" (Bushnell C and Basbaum I, Eds). Elsevier. 5:477-526.

Lima D, Mendes-Ribeiro JA, Coimbra A, 1991. The spino-lateroreticular system of the rat: Projections from the superficial dorsal horn and structural characterization of marginal neurons involved. *Neuroscience* 45:137-152.

Liu RH, Zhao ZQ, 1992. Selective blockade by yohimbine of descending spinal inhibition from lateral reticular nucleus but not from locus coeruleus in rats. *Brain Res* 142:65-68.

Lowenstein PR and Castro MG, 2001. Genetic engineering within the adult brain: implications for molecular approaches to behavioral neuroscience. *Physiol. Behav.* 73: 833-839.

Ma QP, Woolf CJ, 1996. Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain* 67:307–316.

Martino G, Poliani PL, Furlan R, Marconi P, Glorioso JC, Adorini L and Comi G, 2000. Cytokine therapy in immunemediated demyelinating diseases of the central nervous system: a novel gene therapy approach. *J. Neuroimmunol.* 107:184-190.

Martins I, Cabral L, Pinto A, Wilson SP, Lima D, Tavares I, 2009. Preproenkephalin overexpression in the caudal ventrolateral medulla reverses inflammatory pain. Program No.855.24/X29.Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neuroscience. Online.

Martins I, Pinto M, Wilson S, Tavares I, Lima D, 2008. Dynamic of migration of HSV-1 from a medullary pronociceptive centre: antinociception by overexpression of the preproenkephalin transgene *European Journal of Neuroscience* 28:2075-2083.

McCall WD, Tanner KD, Levine JD, 1996. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 208:45–48.

Munro G, 2009. Pharmacological assessment of the rat formalin test utilizing the clinically used analgesic drugs gabapentin, lamotrigine, morphine, duloxetine, tramadol and ibuprofen: Influence of low and high formalin concentrations. *European Journal of Pharmacology* 605:95–102.

Neto FL, Carvalhosa AR, Ferreira-Gomes J, Reguenga C, Castro-Lopes JM, 2008. Delta opioid receptor mRNA expression is changed in the thalamus and brainstem of monoarthritic rats. *J. Chem. Neuroanat.* 36:122–127.

Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Lijun W., Lu Y, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A, Muramatsu S, Nakano I and Ozawa K, 2002. Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. *Methods* 28:237-247.

Otoni EB, 2000. EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 32(3): 446-449.

Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin induced nociception. *Neuroscience* 102:937-944.

Paxinos G, Watson C, 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth Edition Academic Press

Pinto M, Castro AR, Tshudy F, Wilson SP, Lima D, Tavares I, 2008a. Opioids modulate pain facilitation from the dorsal reticular nucleus. *Molecular and Cellular Neuroscience* 39:508–518.

Pinto M, Sousa M, Lima D, Tavares I, 2008b. Participation of mu-opioid, GABA(B), and NK1 receptors of major pain control medullary areas in pathways targeting the rat spinal cord: implications for descending modulation of nociceptive transmission. *J. Comp. Neurol.* 510:175–187.

Pinto-Ribeiro F, Ansah O, Almeida A, Pertovaara A, 2006. Descending pain modulatory influence from the hypothalamic paraventricular nucleus through the caudal ventrolateral medulla in arthritic and control rats. *FENS Abstract* 3, A004.13.

Pohl M, Meunier A, Hamon M, Braz J, 2003. Gene Therapy of Chronic Pain. *Current Gene Therapy* 3:223-238.

Selden NRW, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW, 1991. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit contextual cues. *Neuroscience* 42:335–350.

Sessle BJ, 2000. Clinical Correlates Acute and Chronic Craniofacial Pain: Brainstem Mechanisms of Nociceptive Transmission and Neuroplasticity, and Their Clinical Correlates. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 11:57.

Simonato M, Manservigi R, Marconi P and Glorioso J, 2000. Gene transfer into neurones for the molecular analysis of behaviour: focus on herpes simplex vectors. *Trends Neurosci* 23:183-190.

Sindrup SH, Jensen TS, 1999. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83:389-400.

Smith C, Lachmann RH and Efsthathiou S, 2000. Expression from the herpes simplex virus type 1 latency-associated promoter in the murine central nervous system. *J. Gen. Virol.* 81:649-662.

Sotgiua ML, Valentea M, Storchia R, Caramentib G, Eliseo G, Biellaa M, 2008. Contribution by DRt descending facilitatory pathways to maintenance of spinal neuron sensitization in rats. *Brain research* 1188:69–75.

Tal M, Bennett GJ, 1994. Neuropathic pain sensations are differentially sensitive to dextrorphan. *5:1418-1541.*

Tavares I, Almeida A, Esteves F, Lima D, Coimbra A, 1998. The caudal ventrolateral medullary reticular formation is reciprocally connected with the spinal cord. *Soc Neurosci Abstr* 24:1132.

Tavares I, Lima D, 1994. Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. *Exp Brain Res* 99:455–463.

Tavares I, Lima D, 2002. The caudal ventrolateral medulla as an important inhibitory modulator of pain transmission in the spinal cord. *J. Pain* 3:337–346.

Tavares I, Lima D, 2007. From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate the supraspinal endogenous pain modulatory system. *J. Anat.* 211:261–268.

Tavares I, Lima D, Coimbra A, 1996. The ventrolateral medulla of the rat is connected with the spinal cord dorsal horn by an indirect descending pathway relayed in the A5 noradrenergic cell group. *J Comp Neurol* 374:84-95.

Tavares I, Lima D, Coimbra A, 1997. The pontine A5 noradrenergic cells which project to the spinal cord dorsal horn are reciprocally connected with the caudal ventrolateral medulla in the rat. *Eur J Neurosci* 9:2452-2461.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI, 1995. Persistent cardiovascular and behavioural nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci* 15:7575-7584.

Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51:5-18.

Villanueva L, Desbois C, Le Bars D, Bernard JF, 1997. Organization of diencephalic projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a retrograde and anterograde tracer study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 390:133–160.

Wheeler-Aceto H, Cowan A, 1991. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 104:35-44.

Wilson SP, Yeomans DC, Bender MA, Lu Y, Goins WF, Glorioso JC, 1999. Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 3211–3216.

Yamada M, Oligino T, Mata M, Goss JR, Glorioso JC and Fink DJ, 1999. Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4078-4083.

Zimmermann M, 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.

Zufferey R, Donello JE, Trono D and Hope TJ, 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 73:2886-2892.