

IV

SUMMARY
AND CONCLUSIONS

*RESUMO
E CONCLUSÕES*

In this work, we investigated the putative involvement of Drg11 in the development of the nociceptive system, in particular at the DRG-spinal level, as suggested by the study by Saito and Collaborators (1995) showing that this transcription factor is expressed in the DRG and spinal superficial dorsal horn.

Through the manufacture of a polyclonal antibody against DGR11, we were able to demonstrate that Drg11 is expressed throughout embryonic development, from as early as the embryonic age 10.5 (E10.5) until early postnatal age, in first and second order sensory structures along the entire neuroaxis (**Publication I**). At the spinal level, DRG11 immunostaining was observed in small diameter DRG neurons and the superficial dorsal horn, while at the supraspinal level, it was observed in several cranial sensory ganglia and the respective relay nuclei in the brainstem. This distribution pointed out a putative role for DRG11 in the formation of the first link of the ascending sensory pathway, not only at the spinal level but also along the brain.

In order to ascertain whether DRG11 specifically commands the development of the nociceptive system, we underwent the phenotypic characterization of a Drg11 knockout mice (*Drg11^{-/-}*) (**Publication II**). *Drg11^{-/-}* mice exhibited reduced reflex responses to mechanical, thermal and chemical painful stimuli, together with anatomical and neurochemical abnormalities in the superficial dorsal horn and misdistribution of their primary afferents, which entered the spinal gray with a marked delay.

We then addressed the involvement of Drg11 in the development of primary afferent nociceptive neurons (**Publication III**) and observed that, in mice deprived of Drg11, primary afferent neurons follow normal differentiation and project normally to their peripheral targets until neonatal age. Shortly after birth, however, about 1/3 both of peptidergic and non-peptidergic, putative nociceptive neurons followed apoptosis, which paralleled marked impairment of peripheral innervation of the skin, viscera and deep tissues. These data indicate that Drg11 is not required for the normal differentiation of small diameter, putative nociceptive primary afferents, but essential for the survival of a significant fraction of those neurons immediately after birth.

The analysis of the differentiation of spinal cord dorsal horn neurons in wild type and *Drg11^{-/-}* mice followed (**Publication IV**). Drg11 was shown to be required for the differentiation, after E 14.5, of a subset, amounting to 73%, of nociceptive glutamatergic superficial dorsal horn neurons, which could be subdivided in 3 different categories expressing either (i) Drg11, Tlx3 and Lmx1b, (ii) Drg11 and Lmx1b, or (iii) Drg11 alone. Moreover, Golgi studies confirmed the absence, in *Drg11^{-/-}* mice, of a large amount of small, spiny neurons in the spinal superficial cord dorsal horn, while *c-fos* induction studies revealed defective noxious-evoked activation at the superficial but not the deep dorsal horn. Besides demonstrating that Drg11 is required for the proper development of a major fraction of glutamatergic superficial dorsal horn neurons, these data indicate that the lack of this excitatory, mostly local circuit neuronal population does not result in decreased nociceptive activation at the deep dorsal horn, which, together with the depressed nociceptive behavior observed in these animals (**Publication II**), underlies the importance of the spinal superficial nociceptive relay in pain processing. In addition, taking into account the normal embryonic development of primary afferents in the absence of Drg11, reported in **publication IV**, these data support the hypothesis that postnatal death of primary afferent neurons in this condition is accounted for by the lack of a neuronal target in the spinal gray.

Lastly, we investigated the contribution of a Drg11 splice variant to the observed differential role of Drg11 in the DRG and spinal cord (**Publication V**). We verified that both Drg11 and its isoform are present in both regions along development, although a marked decrease in the relative concentration of the DRG11 isoform takes place after E18.5 in the spinal cord, but not in the DRG. This finding suggested a role for the Drg11 isoform as a repressor of the establishment of synaptic connections between primary afferents and superficial dorsal horn neurons, which is known to take place between E18.5 and birth.

Altogether the studies that compose this thesis unravel a role for Drg11 in the development of the first arm of the ascending nociceptive pathway, and reveal that Drg11 may both command the differentiation of a large fraction of glutamatergic nociceptive superficial dorsal horn neurons and the establishment of its afferent connections from the DRG.

Neste trabalho, investigámos o envolvimento do gene *Drg11* no desenvolvimento do sistema nociceptivo, nomeadamente ao nível do gânglio raquidiano e medula espinhal, tal como sugerido pelo estudo de Saito e colaboradores (1995) que mostrava que este factor de transcrição é expresso no gânglio raquidiano e no corno dorsal superficial da medula espinhal.

Através da produção de um anticorpo policlonal contra DGR11, demonstrámos que o *Drg11* é expresso durante o desenvolvimento embrionário, logo a partir da idade embrionária 10,5 (E10.5) até a idade pós-natal precoce, em estruturas de primeira e segunda ordem sensorial ao longo da neuroeixo (**Publicação I**). Ao nível da medula espinhal, o *Drg11* foi observado por imunohistoquímica em neurónios pequenos do gânglio raquidiano e nas lâminas superficiais da medula espinhal, enquanto que ao nível supra-espinhal, observou-se no gânglio sensorial do trigémio e em vários núcleos de projecção no tronco cerebral. Essa distribuição sugeriu um possível papel do *Drg11* na formação da primeira ligação da via ascendente sensorial, não só a nível espinhal, como também ao longo do encéfalo.

A fim de se verificar se *Drg11* está envolvido especificamente no desenvolvimento do sistema nociceptivo, realizámos a caracterização fenotípica de ratinhos knockout *Drg11* (*Drg11*^{-/-}) (**Publicação II**). Ratinhos *Drg11*^{-/-} apresentaram uma redução das respostas a estímulos dolorosos de natureza mecânica, térmica e química, juntamente com alterações anatómicas e neuroquímicas ao nível do corno dorsal superficial, para além uma má distribuição dos seus aferentes primários, que entram na substância cinzenta da medula espinhal com um atraso significativo.

Em seguida, observámos o papel do *Drg11* no desenvolvimento de neurónios nociceptivos aferentes primários (**Publicação III**) e observámos que, em ratinhos *Drg11*^{-/-}, os neurónios aferentes primários diferenciavam-se normalmente e projectavam normalmente para os seus alvos periféricos até a idade neonatal. No entanto, após o nascimento, cerca de 1/3 dos neurónios nociceptivos peptidérgicos e não peptidérgicos sofriam apoptose que era seguida de deficiente inervação periférica da pele, vísceras e dos tecidos profundos. Estes dados indicam que o *Drg11* não é necessário para a diferenciação normal de neurónios nociceptivos aferentes primários, mas é essencial para a sobrevivência de uma parcela significativa desses neurónios imediatamente após o nascimento.

Seguiu-se a análise diferencial de neurónios das lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal em ratinhos *Drg11*^{-/-} e wildtype (**Publicação IV**). O *Drg11* mostrou-se necessário para a diferenciação de uma subpopulação, depois de E14,5, que correspondia a 73% dos neurónios glutamatérgicos presentes no corno dorsal, e que podem ser subdivididos em três categorias diferentes que expressam tanto (i) *Drg11*, *Tlx3* e *Lmx1b*, (ii) *Drg11* e *Lmx1b*, (iii) apenas *Drg11*. Além disso, realizámos estudos com impregnação pelo método de Golgi Rio-Hortega que confirmaram a ausência, em ratinhos *Drg11*^{-/-}, de uma grande quantidade de pequenos neurónios espinhosos no corno dorsal superficial da medula espinhal, enquanto que estudos de indução do protooncogene *c-fos* revelou uma diminuída activação no corno dorsal superficial mas não no corno dorsal profundo, após estimulação nóxica. Além de demonstrar que *Drg11* é necessário para o bom desenvolvimento de uma grande fracção de neurónios glutamatérgicos do corno dorsal, estes dados indicam que a falta desta população excitatória não resulta em diminuição da activação nociceptiva no corno dorsal profundo, que juntamente com a resposta comportamental diminuída após estimulação dolorosa observada nestes animais (**publicação II**), reforça a importância das lâminas superficiais no processamento nociceptivo. Além disso, tendo em conta o desenvolvimento embrionário normal dos aferentes primários, na ausência de *Drg11*, mencionado na **publicação IV**, esses dados apoiam a hipótese de que a morte pós-natal dos neurónios aferentes primários nesta condição é explicada pela falta de um alvo neuronal espinhal.

Finalmente, investigámos a contribuição de uma isoforma do *Drg11* no papel diferencial do *Drg11* observado no gânglio raquidiano e da medula espinhal (**Publicação V**). Verificámos que tanto o *Drg11* como a sua isoforma estão presentes em ambas as regiões ao longo do desenvolvimento, apesar de uma diminuição acentuada na concentração relativa da isoforma *Drg11* que ocorre após E18.5 na medula espinhal, mas não no gânglio raquidiano. Este achado sugere um papel para a isoforma *Drg11* como um repressor do estabelecimento de conexões sinápticas entre os aferentes primários e os neurónios superficiais do corno dorsal, que se sabe ocorrer entre E18.5 e o nascimento.

No seu conjunto, os estudos que compõem esta tese, permitem revelar um papel para *Drg11* no desenvolvimento do primeiro componente da via nociceptiva ascendente, e revelam que o *Drg11* é necessário para a diferenciação de uma grande fracção de neurónios glutamatérgicos nociceptivos presentes nas lâminas superficiais do corno dorsal e no estabelecimento de sinapses com o gânglio.

