

## Resumo

A diabetes é uma doença metabólica cuja prevalência tem aumentado de forma alarmante. A neuropatia é uma complicação que ocorre em aproximadamente 50% dos doentes diabéticos, dos quais cerca de 25% manifestam queixas de dor espontânea, alodínia e hiperalgesia. O estudo dos mecanismos responsáveis pela dor neuropática diabética tem-se direccionado para as causas periféricas mas o efeito analgésico de fármacos com actuação central e as alterações observadas no sistema nervoso central de indivíduos diabéticos sugerem a ocorrência de causas centrais. A presente dissertação de Doutoramento tem como objectivo geral estudar os mecanismos centrais subjacentes à dor neuropática diabética de modo a desenvolver futuramente estratégias preventivas ou de tratamento deste problema.

Como modelo animal de diabetes utilizámos o rato injectado com estreptozotocina (STZ), uma toxina que destrói selectivamente as células  $\beta$  pancreáticas, induzindo diabetes com características de tipo 1, tais como hiperglicemia, insulinopenia e diminuição dos níveis de IGF1 (*insulin-growth factor 1*). Utilizámos animais com 4 semanas de diabetes, dado que a este tempo os animais manifestam sinais comportamentais estáveis de hiperalgesia e alodínia mecânicas.

O trabalho inclui 6 publicações. Na primeira, utilizámos o estudo da indução do proto-oncogene *c-fos* em neurónios da medula espinhal para demonstrar que a diabetes induz hiperactividade espontânea dos neurónios da medula espinhal e hiperexcitabilidade dos mesmos em resposta a estímulos inócuos e nódicos. Estas alterações neuronais podem contribuir para a dor espontânea, hiperalgesia e alodínia na neuropatia diabética. Na segunda publicação, estudámos os possíveis mecanismos subjacentes às referidas alterações funcionais dos neurónios espinhais. Com base em estudos que apontavam para distúrbios no papel do GABA na medula espinhal de ratos diabéticos, avaliamos a neurotransmissão GABAérgica espinhal, tendo-se verificado aumento na expressão do GABA no corno dorsal da medula espinhal de ratos diabéticos. Estudámos a expressão do co-transportador iónico potássio-cloro do tipo 2 (KCC2) na medula espinhal dos ratos diabéticos, visto ter sido demonstrado que a actividade deste co-transportador contribui para a acção pós-sináptica do GABA. Os ratos diabéticos apresentaram menor expressão de KCC2 no corno dorsal da medula espinhal. O aumento da expressão de GABA em conjunto com a diminuição de expressão de KCC2 poderá inverter o papel inibitório do GABA na medula espinhal e contribuir para a hiperactividade neuronal espinhal.

As duas publicações seguintes destinaram-se a esclarecer os mecanismos indutores da diminuição da expressão espinhal do KCC2. Na terceira publicação, colocámos a hipótese da microglia e do BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) serem factores determinantes. A activação microglial aumentava significativamente no corno dorsal da medula espinhal dos ratos diabéticos, sem que ocorresse aumento de expressão de BDNF. A inibição da actividade microglial, por administração intratecal de minociclina, normalizou a expressão de KCC2 no corno dorsal da medula espinhal e reverteu totalmente a hiperactividade neuronal e hiperalgesia nos ratos diabéticos. O bloqueio da acção do BDNF, por administração intratecal de sequestrador de BDNF (TrKB-Fc), apresentou efeitos moderados. Este trabalho demonstrou que a microglia tem um papel-chave na modulação da actividade neuronal durante a diabetes, através dos

seus efeitos na expressão de KCC2. Na quarta publicação, a hipótese colocada foi a de que o stress oxidativo constitui outro mecanismo de regulação do KCC2. Os níveis de stress oxidativo na medula espinhal de ratos diabéticos estavam aumentados. O tratamento antioxidante com ácido alfa-lipóico reverteu o stress oxidativo e a hiperactividade neuronal na medula espinhal dos ratos diabéticos e aumentou moderadamente a expressão de KCC2. Estes resultados sugerem que o stress oxidativo contribui para a hiperactividade neuronal espinhal, através do seu efeito na expressão de KCC2.

As duas publicações finais da tese estudaram a modulação descendente da dor, direccionando-se para os efeitos da diabetes em centros-chave de controlo da dor. Na quinta publicação, verificámos que a diabetes induz hiperactividade neuronal na substância cinzenta periaqueductal (PAG), que era revertida pelo tratamento com gabapentina, um anticonvulsivante utilizado no tratamento da dor neuropática diabética. Adicionalmente, a gabapentina revertia a hiperalgesia mecânica e a hiperactividade neuronal na medula espinhal. Na sexta publicação, estudámos as regiões do tronco cerebral que servem de “*relay*” à PAG na modulação descendente da dor, nomeadamente a área serotoninérgica do bolbo rostroventromedial (RVM) e os grupos noradrenérgicos A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub> e A<sub>7</sub>. A imunodeteção de enzimas envolvidas na síntese de serotonina e noradrenalina, a hidroxilase do triptofano (Tph) e a tirosina hidroxilase (TH), respectivamente, mostrou que os ratos diabéticos tinham números superiores de neurónios serotoninérgicos no RVM e noradrenérgicos no A<sub>5</sub>, o que era acompanhado por aumento dos níveis espinhais de serotonina e noradrenalina, quantificados por ELISA. A actividade neuronal, avaliada pela expressão de formas fosforiladas de ERKs (*extracellular-regulated kinases*) nos neurónios serotoninérgicos, e de CREB (*cAMP regulated binding protein*) nos neurónios noradrenérgicos, estava aumentada no RVM e no A<sub>5</sub> dos ratos diabéticos. Este trabalho demonstrou que a diabetes afecta o sistema descendente de controlo da dor através da modulação serotoninérgica e noradrenérgica. O tratamento dos ratos diabéticos com doses de IGF1 que não revertem a hiperglicemia, normalizou a actividade dos neurónios da PAG, preveniu as alterações no sistema serotoninérgico e noradrenérgico, reverteu a hiperactividade espinhal e diminuiu os sinais comportamentais de hiperalgesia.

Colectivamente, os dados obtidos nesta dissertação de doutoramento demonstram que a etiologia da dor neuropática diabética não se resume apenas às alterações dos nervos periféricos, mas engloba alterações de áreas centrais envolvidas no controlo da dor. A diabetes induz hiperactividade e hiperexcitabilidade dos neurónios nociceptivos da medula espinhal, para as quais parece contribuir a perda de inibição GABAérgica mediada por redução na expressão de KCC2, a qual é provavelmente induzida por activação microglial e stress oxidativo na medula espinhal. A hiperactividade espinhal deverá aumentar a actividade dos neurónios da PAG e recrutar vias descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas envolvidas na modulação da dor, por activação dos neurónios do RVM e do A<sub>5</sub>. Torna-se agora necessário avaliar o papel da serotonina e noradrenalina na modulação da transmissão nociceptiva na medula espinhal durante a diabetes o que poderá abrir novas linhas de investigação no tratamento da dor neuropática diabética.

## Abstract

Diabetes is a metabolic disease with an alarmingly increasing prevalence. Neuropathy affects about 50% of diabetic patients and is associated with spontaneous pain, allodynia and hyperalgesia in 25% of the cases. The study of the mechanisms underlying diabetic neuropathic pain has been directed to the peripheral causes but considering the analgesic effect of central-acting drugs and the changes detected in the central nervous system of diabetic patients it is likely that central mechanisms are also involved. This PhD thesis aims at investigating the central mechanisms underlying diabetic neuropathic pain in order to develop new preventive or treatment strategies for this problem.

As animal model of diabetes, we used the rat injected with streptozotocin (STZ rats), a toxin that selectively destroys pancreatic  $\beta$  cells, inducing type 1 diabetes, characterized by hyperglycemia, insulin deficiency and decreased levels of insulin-growth factor 1 (IGF1). We used the animals at 4 weeks of diabetes since at this time the rats show stable behavioral signs of mechanical hyperalgesia and allodynia.

This dissertation includes six publications. In the first publication, we demonstrated that diabetes induces spontaneous hyperactivity and hyperexcitability of spinal nociceptive neurons in response to innocuous and noxious stimuli, using the *c-fos* method. These neuronal changes may contribute to spontaneous pain, allodynia and hyperalgesia during diabetic neuropathy. In the second publication, we studied the possible mechanisms underlying the functional changes occurring at spinal nociceptive neurons. Based on studies showing impairments in the role of GABA at the spinal cord of diabetic rats, we evaluated the spinal GABAergic neurotransmission and detected increased expression of GABA in the spinal dorsal horn of diabetic rats. We studied the expression of the ionic co-transporter potassium-chloride type 2 (KCC2) in the spinal cord of diabetic rats, as has been demonstrated that the activity of this co-transporter contributes to the postsynaptic action of GABA. Diabetic rats presented lower expression of KCC2 in the spinal dorsal horn. The increased expression of GABA along with the decreased expression of KCC2 may invert the inhibitory role of GABA at the spinal cord and contribute to spinal neuronal hyperactivity.

The following two publications aimed to clarify the mechanisms which induce the reduction in the expression of spinal KCC2. In the third publication, we considered the microglia and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as key factors. The microglial activation increased significantly in the spinal dorsal horn of diabetic rats, with no changes in the expression of BDNF. Inhibition of microglial activity by intrathecal administration of minocycline, normalized the expression of KCC2 in the spinal dorsal horn and reversed completely the neuronal hyperactivity and hyperalgesia in diabetic rats. Blocking the action of BDNF by intrathecal administrations of BDNF sequester (TrkB-Fc) showed moderate effects. This work demonstrated that microglia have a key role in the modulation of neuronal activity during diabetes through its effects on the expression of KCC2. In the fourth publication, we considered oxidative stress as another mechanism of regulation of KCC2. The levels of oxidative stress on the spinal cord of diabetic rats were increased. The antioxidant treatment with alpha-lipoic acid reversed the oxidative stress and neuronal hyperactivity in the spinal cord of diabetic rats and moderately increased the expression of KCC2. These results suggest that

oxidative stress contributes to the spinal neuronal hyperactivity through its effect on expression of KCC2.

The two final publications of the thesis studied the descending modulation of pain, focusing on the effects of diabetes in key centers of pain control. In the fifth publication, we observed that diabetes induces neuronal hyperactivity at the periaqueductal grey matter (PAG), which was reversed by treatment with gabapentin, an anticonvulsant used to treat diabetic neuropathic pain. Additionally, gabapentin reversed the mechanical hyperalgesia and neuronal hyperactivity at the spinal cord. In the sixth publication, we studied the regions of the brainstem that act as relay stations of the PAG descending pain modulation, including the serotonergic rostroventromedial medulla (RVM) and the A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub> and A<sub>7</sub> noradrenergic groups. The immunodetection of enzymes involved in the synthesis of serotonin and noradrenaline, tryptophan hydroxylase (TpH) and tyrosine hydroxylase (TH), respectively, showed that diabetic rats presented higher numbers of serotonergic and noradrenergic neurons at the RVM and A<sub>5</sub>. These changes were accompanied by increased levels of serotonin and noradrenaline at the spinal cord, as quantified by ELISA. The neuronal activity, as assessed by the expression of phosphorylated forms of extracellular-regulated kinases (ERKs) and cAMP-regulated binding protein (CREB) in serotonergic and noradrenergic neurons, respectively, was increased in the RVM and A<sub>5</sub> in the diabetic rat. This study showed that diabetes affects the pain control descending system by modulating the serotonergic and noradrenergic neurotransmission. The treatment of diabetic rats with IGF1, at doses that did not reverse the hyperglycemia, normalized the neuronal activity at the PAG, prevented the changes in the serotonergic and noradrenergic systems, reversed the spinal hyperactivity and ameliorated hyperalgesia detected in STZ rats.

Taken together, the results present in this PhD thesis demonstrate that the etiology of diabetic neuropathic pain is not confined to changes in peripheral nerves, but involves changes in central areas involved in pain control. Diabetes induces hyperactivity and hyperexcitability of spinal nociceptive neurons, probably due to the loss of GABAergic inhibition induced by decreased expression of KCC2, which is mediated by oxidative stress and microglial activation at the spinal cord. It is likely that spinal hyperactivity increases the activity of PAG neurons, recruiting the serotonergic and noradrenergic descending pathways involved in pain modulation, via activation of neurons at the RVM and at the A<sub>5</sub>. It is now necessary to evaluate the role of serotonin and noradrenaline in the modulation of spinal nociceptive transmission during diabetes, which could open new lines of research in the treatment of diabetic neuropathic pain.