

A Neuropatia Diabética Afecta a Activação dos Neurónios Nociceptivos da Medula Espinhal: Um Estudo no Rato Injectado com Estreptozotocina

C. Morgado ^{1,2}, I. Tavares ^{1,2}

1- Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Portugal

2- IBMC-Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal.

Resumo

Introdução: As alterações morfofuncionais dos nervos periféricos estão na etiologia da dor associada à neuropatia diabética, embora estudos recentes apontem também para o envolvimento de estruturas centrais.

Objectivo: O objectivo deste estudo foi avaliar as alterações funcionais dos neurónios nociceptivos da medula espinhal em ratos injectados com estreptozotocina (STZ), em condições basais e após estimulação, usando a activação do protooncogene *c-fos* como marcador de activação neuronal.

Material e Métodos: Os ratos STZ foram avaliados ao longo do tempo (1, 2 e 4 semanas após injeção de STZ) quanto aos comportamentos de resposta à dor e à expressão de *c-fos*. Procedeu-se, também, à avaliação da expressão de *c-fos* após estimulação inócua e nóxica. O número de neurónios imunorreactivos foi quantificado nas lâminas I-II e III-V do corno dorsal da medula espinhal.

Resultados: A expressão de *c-fos* aumentou ao longo do tempo, sendo significativamente superior 4 semanas após injeção. A estimulação inócua não induziu aumento na expressão de *c-fos*, enquanto os estímulos nóxicos mecânicos e térmicos induziram um aumento significativo, sendo mais acentuado nos ratos STZ após estimulação mecânica.

Conclusões: A diabetes induz activação espontânea dos neurónios nociceptivos da medula espinhal e afecta as suas respostas aos estímulos nóxicos mecânicos, podendo estas alterações funcionais estar na origem da dor espontânea e hiperalgesia mecânica.

Abstract

Background: Morphofunctional changes of peripheral nerves seem to underlie the pain associated with diabetic neuropathy, but recent studies suggested also a central nervous system involvement.

Aim: This study aimed to evaluate the functional changes of spinal nociceptive neurons in streptozotocin (STZ) injected rats, in baseline conditions and in response to peripheral stimulation, using *c-fos* expression as a marker of neuronal activation.

Material and Methods: A time-course evaluation of behavioural responses to painful stimuli and of spinal dorsal horn *c-fos* expression was performed in STZ rats. *c-fos* expression was also evaluated after innocuous and noxious stimulation. The number of immunoreactive neurons was quantified in spinal laminae I-II and III-V.

Results: STZ rats presented a time-course increase in *c-fos* expression, which is significantly higher at 4 weeks post-injection when compared with the others time-points. Innocuous stimulation did not induce increase in *c-fos* levels, while mechanical and thermal stimulation increased significantly the number of Fos-IR neurons. This increase was more pronounced in mechanical - stimulated STZ rats.

Conclusions: Diabetes induces spontaneous activation of spinal dorsal horn neurons and affects their responses to mechanical stimulation. These functional changes may underlie the spontaneous pain and mechanical hyperalgesia observed during diabetes.

INTRODUÇÃO

O estudo dos mecanismos da dor neuropática associada à diabetes, caracterizada por alodínia, hiperalgesia mecânica e perda de sensibilidade térmica, tem versado, essencialmente, o sistema nervoso periférico ⁽¹⁻⁵⁾. Os efeitos centrais são ainda desconhecidos, embora estudos recentes sugiram a ocorrência de alterações estruturais e funcionais na medula espinhal durante a diabetes. De facto, os doentes diabéticos que sofrem de polineuropatia simétrica periférica apresentam uma diminuição na área total da medula espinhal ⁽⁶⁾ e os registos electrofisiológicos mostraram um aumento da acti-

vidade espontânea e induzida por estímulos inócuos e nóxicos nos neurónios do corno dorsal da medula espinhal de ratos diabéticos ^(7,8). A somar a estas alterações observaram-se distúrbios neuroquímicos no corno dorsal da medula espinhal de ratos diabéticos, envolvendo sistemas excitatórios ⁽⁹⁻¹²⁾ e inibitórios ⁽¹³⁾. Estes achados sugerem que a diabetes tem efeitos centrais, afectando a função da medula espinhal. Sendo a medula espinhal uma importante região do sistema nervoso central envolvida na modulação/transmissão da informação nociceptiva para o cérebro é provável que as alterações sensoriais e a dor reflectam disfunções desta região e, eventualmente, de outras regiões supraespinhais envolvidas na modulação descendente da dor e que recebam ou enviem informação para o corno dorsal da medula espinhal.

A expressão de *c-fos* permite avaliar a activação nociceptiva de um grande número de neurónios e determinar a localização dos neurónios activados nas várias lâminas da medula espinhal, sendo uma metodologia amplamente utilizada em estudos de dor ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Um aumento significativo da sua expressão no corno dorsal da medula espinhal foi observado

Correspondência:

Isaura Tavares
Instituto de Histologia e Embriologia
Faculdade de Medicina do Porto
Alameda Prof. Hernani Monteiro
4200-319 Porto
Tel.: +351 22 5513654
Fax: +351 22 5513655
E-mail: isatav@med.up.pt

em situações dolorosas induzidas por neuropatia traumática, na ausência de estimulação⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ e após aplicação de estímulos inócuos⁽²⁰⁻²⁵⁾, evidenciando a ocorrência de alterações plásticas no corno dorsal da medula espinhal em estados de dor crónica neuropática. Estando a diabetes associada a uma grave condição neuropática, é importante analisar o efeito desta patologia na medula espinhal. O modelo animal de diabetes tipo I mais utilizado é o rato injectado com estreptozotocina (rato STZ), uma toxina que destrói as células β pancreáticas. Este modelo experimental foi já utilizado em estudos de *c-fos* para avaliação da actividade neuronal em diferentes áreas cerebrais, observando-se aumento de expressão em algumas regiões cerebrais^(26,27) e diminuição noutras⁽²⁷⁻²⁹⁾. Este facto evidencia que a expressão do *c-fos* não é um resultado directo da STZ, mas sim um efeito da condição diabética.

Neste estudo avaliámos a actividade basal dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal em ratos STZ ao longo do tempo e em resposta a estímulos cutâneos inócuos e nódicos, usando a expressão de *c-fos* como marcador da activação neuronal. De forma a caracterizar as respostas comportamentais à dor e confirmar a presença de neuropatia foram realizados testes para avaliação da nocicepção mecânica e térmica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram usados ratos machos Wistar (Charles River, Barcelona, Espanha), com 250-350g no início do trabalho experimental. Os animais foram alojados aos pares, num compartimento com temperatura constante ($22\pm 2^\circ\text{C}$), humidade controlada ($55\pm 5\%$) e um ciclo de luz de 12 horas e receberam alimento e água *ad libitum*. O trabalho experimental respeitou as recomendações éticas para o estudo da dor em animais⁽³⁰⁾ e a Directiva 86/609/EEC do Conselho da Comunidade Europeia.

1- Indução da Diabetes

A diabetes foi induzida segundo protocolo previamente estabelecido⁽³¹⁾. Os animais foram injectados intraperitonealmente (i.p) com uma solução de STZ (50 mg/Kg de peso corporal; Sigma-aldrich, St. Louis, EUA) em soro fisiológico e foi-lhes fornecido uma solução açucarada (10% de sacarose) nos primeiros três dias após injeção, de forma a prevenir o choque hipoglicémico. Os ratos controlo foram injectados com igual volume de soro fisiológico. A glicemia foi determinada três dias após a injeção numa amostra de sangue colhida a partir da veia posterior da cauda, utilizando o aparelho Accu Chek Sensor Comfort (Roche Diagnostics, Alemanha). Apenas os ratos com glicemia superior a 300 mg/dl foram considerados diabéticos e incluídos no grupo STZ.

2- Avaliação Comportamental em Resposta à Dor

Foi realizada avaliação comportamental em resposta a estímulos mecânicos e térmicos ao longo do tempo a um total

de 12 animais (6 ratos controlo e 6 ratos STZ). Os testes foram executados no dia prévio à injeção e após 1, 2 e 4 semanas. Os animais foram diariamente manipulados pelo mesmo experimentador durante os 8 dias que precederam a aplicação dos testes por motivos de habituação ao experimentador e às condições experimentais.

A sensibilidade a estímulos nódicos mecânicos foi avaliada por aplicação do teste de Randall-Sellito (Ugo Basile; Comerio VA, Itália). Foi aplicada sobre a pata direita do animal uma força ascendente e registado o valor da força (em grammas) que induziu a sua retirada. O limiar de dor mecânica foi definido como a média de 3 ensaios sucessivos, realizados a intervalos de 5 minutos. A avaliação da sensibilidade térmica foi realizada pelo teste de flexão da cauda (Ugo Basile, Comerio VA, Itália). Fez-se incidir um feixe de calor (52°C) na face interna da cauda do animal e registou-se o tempo decorrido desde o início da aplicação até à retirada da cauda, definido como latência térmica. O limiar de dor térmica foi definido como a média dos valores de latência térmica obtidos em 3 ensaios sucessivos, realizados a intervalos de 5 minutos. Foi estabelecido um valor máximo de latência térmica de 24 minutos, de forma a evitar lesões tecidulares.

Na análise estatística dos resultados da avaliação comportamental ao longo do tempo foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post-hoc* de Tukey para múltiplas comparações. Para as comparações entre grupos usou-se o teste *t* Student.

3- Avaliação da Expressão de *c-fos*

Foi avaliada a expressão de *c-fos* em condições basais antes e 1, 2 e 4 semanas após injeção de STZ. Os animais ($n=5$ para cada tempo) foram anestesiados i.p com hidrato de cloral a 35% (1ml/kg de peso corporal) e sacrificados por perfusão transcardíaca com 200 ml de tampão de sais fosfato (PBS), seguido de 1000 ml de paraformaldeído em 0.1 M de PBS, pH 7.4. Foram dissecados os segmentos espinhais L1-L2, pós-fixados em paraformaldeído durante 4 horas e conservados durante a noite numa solução de 30% de sacarose em tampão fosfato. Quatro semanas após indução da diabetes, um grupo adicional de animais diabéticos e controlo ($n=5$ por grupo e por estímulo) foi sujeito a estimulação cutânea inócua, nódica mecânica ou térmica na face interna da coxa esquerda, como descrito anteriormente^(32,33). A escolha deste tempo para a execução do protocolo de estimulação deveu-se ao facto de ser o tempo no qual os ratos STZ mostraram alterações mais marcadas no comportamento em resposta à dor e na expressão basal de *c-fos*. A estimulação inócua consistiu em toque suave com duração de 15 segundos, segundo protocolo previamente publicado⁽²⁰⁾. Utilizou-se uma pinça "dentes de rato" para aplicação do estímulo nódico mecânico, conforme descrito anteriormente⁽³²⁻³⁴⁾. Para a estimulação nódica térmica fez-se incidir um feixe de calor radiante (HLTC-200T, npi electronic GmbH), a uma temperatura de $65\pm 2^\circ\text{C}$, controlada pela aplicação de uma sonda sobre a superfície cutânea, e em pulsos de 30 segundos⁽³²⁻³⁴⁾. Todos os estímulos foram aplicados a cada 2

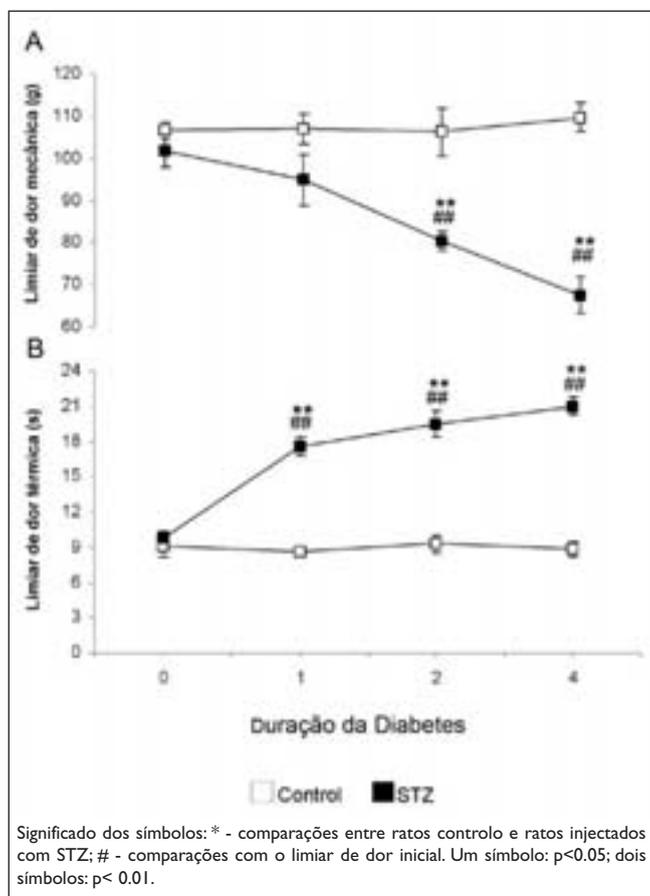


Figura 1 - Alterações no limiar de dor mecânica (A) e térmica (B) ao longo do tempo. Os ratos STZ apresentam hiperalgesia mecânica e hipotalgesia térmica respectivamente desde as 2 ou 1 semanas após injeção de STZ e até ao final do estudo experimental.

minutos durante 2 horas. Após terminado o período de estimulação, os animais foram manipulados segundo o mesmo protocolo utilizado no grupo dos ratos não estimulados. Foram obtidos cortes transversais, com 40 μ m de espessura, dos segmentos L1-L2 utilizando um micrótopo de congelação e 1 em cada 4 cortes foram colhidos em PBS a 0.1 M e processados em reacção imunocitoquímica contra *c-fos*, segundo o método da peroxidase-avidina-biotina (método ABC) já descrito (34). Resumidamente, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogénio a 1% durante 10 minutos para inibição da actividade endógena da peroxidase, seguido de incubação durante 2 horas em solução de bloqueio (10% de soro de porco + 0.3% de Triton X a 25% em PBS (PBST) + glicina a 0.1 M). Os cortes foram depois incubados durante uma noite a 4°C em anticorpo contra o *c-fos* produzido em coelho (Ab5; Oncogene), diluído de 1:10000 em PBST. Após sucessivas lavagens com PBST, procedeu-se à incubação em anticorpo secundário biotinilado (imunoglobulina porco anti-coelho, DakoCytomation), a uma concentração de 1:200, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Os cortes foram depois lavados com PBST e incubados durante 1 hora no complexo avidina-biotina (Vectastain, Laboratórios Vector), e revelados com diaminobenzidina (DAB; 10 mg DAB em 20 ml de Tris-HCL 0.05 M, pH 7.6 com 5 μ l de peróxido de hidrogénio a 30%). Por fim, os cortes

foram lavados em PBS e devidamente preparados para visualização microscópica.

A expressão de *c-fos* foi determinada por quantificação do número de neurónios imunorreactivos (Fos-IR) nos cornos dorsais da medula espinal, em 20 cortes aleatoriamente seleccionados dos segmentos L1-L2 (10 cortes por segmento), com a ajuda de um microscópio acoplado a uma câmara lúcida. Os neurónios Fos-IR foram posicionados em duas áreas distintas do corno dorsal: a parte superficial (lâminas I-II) e a parte profunda (lâminas III-V) (35). Utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post-hoc* de Tukey, para comparação dos números médios de neurónios Fos-IR. Os resultados estão apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

Os ratos injectados com STZ apresentaram hiperglicemia (concentração de glicose sanguínea > 300 mg/dl) 3 dias após a injeção e mantiveram-se nessa condição durante todo o estudo. Quatro semanas após injeção, os ratos STZ apresentavam valores de glicemia significativamente superiores aos dos ratos controlo (grupo STZ: 484.1 \pm 32.21 mg/dl; grupo controlo: 136.9 \pm 18.71 mg/dl) e peso corporal significativamente inferior (grupo STZ: 285 \pm 13.4 g; Grupo controlo: 420 \pm 5.6). Os ratos STZ apresentaram os sintomas típicos da diabetes, como descrito em referências do modelo animal (31,36-38), mantendo as restantes características semelhantes às encontradas no grupo controlo.

1- Resultados da Avaliação Comportamental

Não foram observadas diferenças entre os grupos nas respostas nociceptivas aos estímulos mecânicos e térmicos antes da injeção com STZ ou soro (Figura 1).

Respostas ao teste de Randall-Sellito: O limiar de dor mecânica dos ratos STZ diminuiu gradualmente durante as 4 semanas de duração do estudo (Figura 1A), sendo essa redução significativa 2 semanas após a injeção com STZ e mais pronunciada às 4 semanas (diminuição de cerca de 31% em relação aos valores iniciais).

Respostas ao teste de flexão da cauda: O limiar de dor térmica nos ratos STZ aumentou significativamente 1 semana apenas após a injeção e manteve-se praticamente inalterado durante todo o estudo (Figura 1B).

2- Estudo da Expressão de *c-fos*

2.1- Expressão Basal de *c-fos* ao Longo do Tempo

Foi encontrado apenas um pequeno número de neurónios Fos-IR no corno dorsal da medula espinal nos ratos avaliados antes da injeção com STZ (tempo 0). O número de neurónios Fos-IR aumentou gradualmente ao longo do tempo, sendo significativamente superior às 4 semanas quando comparado com os tempos anteriores, quer nas lâminas superficiais quer nas lâminas profundas do corno dorsal (Figura 2).

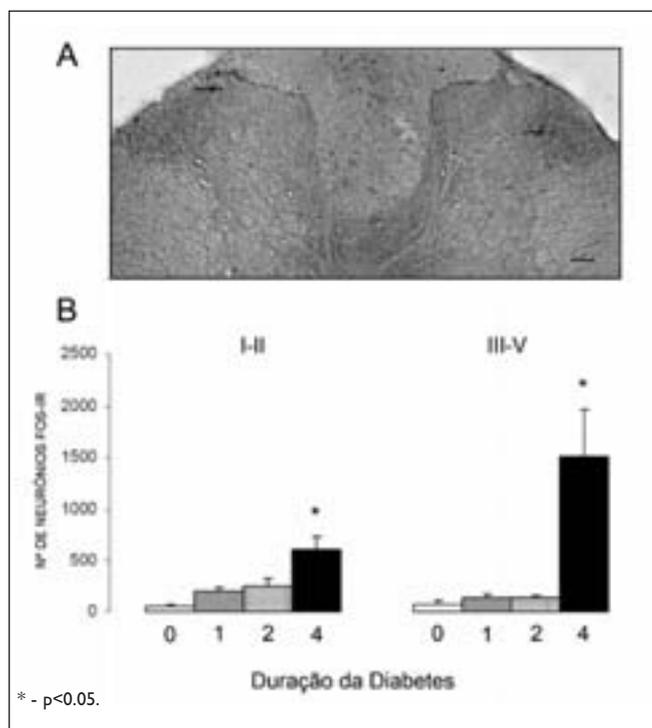


Figura 2 - Expressão basal de *c-fos* ao longo do tempo. A imagem representa um corte transversal do segmento L₂ de um rato STZ (A) onde se visualizam neurónios Fos-IR (setas) num rato não estimulado e sacrificado 4 semanas após injeção de STZ. O gráfico (B) apresenta o número médio de neurónios Fos-IR (\pm EPM) quantificados bilateralmente nas lâminas I-II e III-V nos diferentes tempos de duração da diabetes. Os ratos STZ apresentam um aumento gradual nos níveis de *c-fos*, sendo este significativamente maior 4 semanas após a injeção de STZ. Escala: 100 μ m.

2.2- Expressão de *c-fos* Induzida por Estimulação Inócua e Nóxica

Estimulação mecânica inócua: A estimulação mecânica inócua não induziu um aumento significativo no número de neurónios Fos-IR no corno dorsal em nenhum dos grupos (Figuras 3A, B; 4A, B). Embora os ratos STZ tenham apresentado um número de neurónios Fos-IR significativamente maior nas lâminas I-II do que os ratos controlo após estimulação inócua, isto é devido aos altos níveis na expressão basal de *c-fos* observados no primeiro grupo e não devido aos efeitos da estimulação inócua. Verificou-se que os ratos STZ após estímulo inócua apresentavam um número de neurónios Fos-IR semelhante ao observado nos ratos STZ não estimulados (Figura 4A).

Estimulação mecânica nóxica: O número de neurónios Fos-IR no corno dorsal da medula espinal dos ratos controlo e ratos STZ sujeitos a estimulação mecânica nóxica (Figura 3C, D) foram significativamente superiores ao observado nos respectivos grupos experimentais não estimulados (Figura 4C, D). O aumento de expressão de *c-fos* foi mais marcado nas lâminas I-II nos ratos STZ, apresentando um número de neurónios Fos-IR significativamente maior do que os ratos controlo.

Estimulação térmica nóxica: O número de neurónios Fos-IR nas lâminas I-II dos ratos controlo e ratos STZ sujeitos a estimulação térmica nóxica (Figura 3E, F) foram significativa-

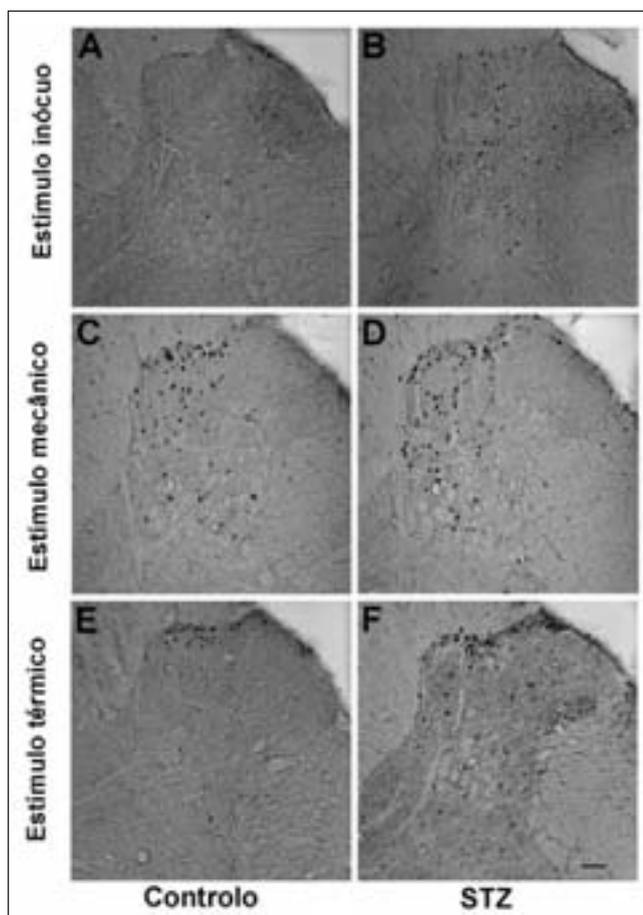


Figura 3 - Expressão de *c-fos* no segmento espinal L₂ induzida por estimulação inócua (A, B), nóxica mecânica (C, D) e nóxica térmica (E, F) nos ratos controlo (A, C, E) e ratos STZ (B, D, F). Escala: 100 μ m.

mente superiores ao observado nos respectivos grupos experimentais não estimulados (Figura 4E, F), não se observando alterações nas lâminas profundas (Figura 4F). Não se verificaram diferenças na expressão de *c-fos* induzida por estímulo térmico entre o grupo controlo e o grupo STZ (Figura 4E, F).

DISCUSSÃO

Utilizando a expressão de *c-fos* como marcador da activação neuronal, este estudo evidencia, pela primeira vez, que a diabetes induz alterações funcionais no corno dorsal da medula espinal na diabetes. O crescente aumento de actividade ao longo do tempo no corno dorsal da medula espinal dos ratos STZ constituiu o achado mais relevante do presente estudo, podendo estar relacionada com o aparecimento da dor espontânea e da hipersensibilidade a estímulos nóxicos mecânicos que ocorre na diabetes⁽²⁻⁴⁾. Estes achados estão de acordo com os dados electrofisiológicos obtidos neste modelo animal^(7,8). No entanto, os estudos electrofisiológicos têm a limitação de não permitir avaliar um grande número de neurónios nem correlacionar as suas respostas com a localização na medula espinal, um facto importante atendendo à distribuição diferencial das subpopulações neuronais pelas lâminas da medula espinal⁽³⁵⁾. O método de *c-fos* permitiu observar a activação dos neurónios nas diferen-

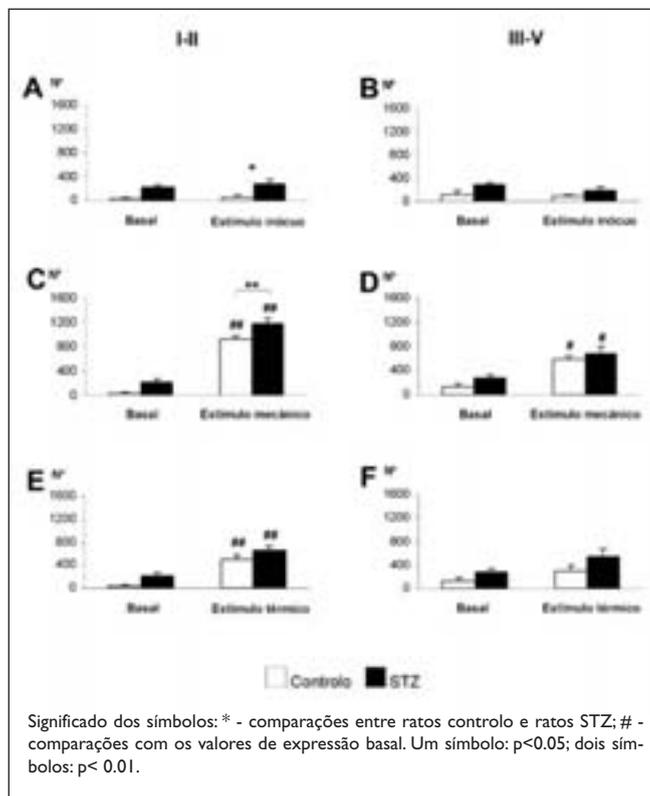


Figura 4 - Efeitos da estimulação inócua (A, B), nóxica mecânica (C, D) e nóxica térmica (E, F) na expressão de *c-fos*. Os gráficos apresentam o número médio de neurónios Fos-IR (\pm EPM) quantificados nas lâminas I-II (A, C, E) ou III-V (B, D, F) do corno dorsal ipsilateral. A estimulação inócua não induziu a expressão de *c-fos* quando comparado com os valores basais. Os efeitos da estimulação nóxica mecânica na expressão de *c-fos* foram mais marcados do que os da estimulação nóxica térmica.

tes lâminas, observando-se uma afectação de todo o corno dorsal. Atendendo a que os neurónios dos corno dorsal superficial e profundo da medula espinal participam nas principais vias espinhofugais^(39,40), estas alterações funcionais podem afectar, de uma forma importante, a transmissão ascendente da informação nociceptiva. De facto, foi já demonstrado, por registos electrofisiológicos, que alguns neurónios que apresentavam um aumento da actividade basal durante a diabetes pertenciam ao tracto espinotalâmico⁽⁸⁾. A hiperactividade basal dos neurónios espinhais pode dever-se a um aumento da chegada de informação vinda da periferia devido à actividade ectópica das fibras nervosas periféricas nos ratos diabéticos⁽⁴¹⁾. No entanto, pode também ser induzida por alterações plásticas da medula espinal, ou mesmo, de regiões supraespinhais envolvidas na modulação descendente da dor⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

Contrariamente ao que se verifica em estudos com modelos animais de neuropatia traumática^(16,20,23-25), a estimulação inócua não induziu expressão de *c-fos* nos ratos diabéticos, mesmo após estimulação prolongada. Atendendo a que a alodínia mecânica é uma característica da neuropatia diabética^(7,8,31), é provável que os níveis altos de *c-fos* basal nos ratos diabéticos estejam a mascarar a expressão de *c-fos* induzida pela estimulação mecânica inócua.

Comparativamente aos níveis basais, a estimulação mecânica nóxica induziu um aumento na expressão de *c-fos* quer em

neurónios do corno superficial quer do corno profundo da medula espinal, sendo esse aumento mais significativo nas lâminas superficiais dos ratos diabéticos do que em ratos controlo. O aumento acentuado da actividade nociceptiva espinal verificada após estimulação mecânica é, provavelmente, uma das causas da hiperalgesia mecânica observada na diabetes^(35,45,46), visto os níveis de expressão de *c-fos* induzidos por estímulos nóxicos estarem correlacionados com as respostas comportamentais à dor⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. A estimulação nóxica térmica induziu um aumento na expressão de *c-fos* apenas nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal, sem se verificarem diferenças significativas no número de neurónios activados entre o grupo diabético e grupo controlo. A activação neuronal induzida pelo estímulo mecânico é claramente mais marcada do que a induzida pelo estímulo térmico, estando de acordo com os estudos que mostram que a diabetes afecta mais gravemente as respostas mecânicas do que as térmicas^(8,50). Esta diferença de activação também se verifica nos ratos controlo, estando de acordo com estudos anteriores que demonstraram uma maior expressão de *c-fos* após estímulo mecânico quando comparado com um estímulo térmico de igual intensidade^(32,33,51).

Atendendo a que os ratos diabéticos desenvolvem hipoalgesia térmica^(7,36,46,52), como confirmado no presente estudo, o aumento da actividade neuronal após estimulação nóxica térmica é difícil de explicar. Esta activação pode, porém, englobar maioritariamente neurónios inibitórios e não excitatórios, na medida em que foi previamente demonstrado que o *c-fos* pode, também, expressar-se em neurónios que contenham neurotransmissores inibitórios⁽⁵³⁾ ou que possam estar sob o efeito de acções inibitórias⁽³⁴⁾ e, por isso, a sua activação estar associada a hipoalgesia.

A insulinopenia, característica da diabetes tipo I, e que ocorre nos ratos STZ parece estar associada à fisiopatologia das alterações que afectam os nervos periféricos. De facto o tratamento com insulina, com ou sem normalização dos valores glicémicos, previne e reverte as alterações dos nervos periféricos e melhora as respostas comportamentais à dor^(54,56). Atendendo a estes resultados e com base na observação da existência de receptores para a insulina na medula espinal^(57,58), é provável que a insulina influencie a função dos neurónios espinhais, podendo a sua deficiência estar na origem das alterações funcionais observadas nesses neurónios. O principal objectivo do presente estudo foi avaliar o efeito da diabetes per se nas respostas dos neurónios do corno dorsal, não tendo sido avaliado o efeito do tratamento insulínico ou de outros agentes farmacológicos. No entanto, é muito importante determinar qual a contribuição relativa da hiperglicemia e da insulinopenia nas alterações da actividade neuronal da medula espinal durante a diabetes.

Em suma, este estudo demonstra hiperactividade crescente dos neurónios do corno dorsal da medula espinal em condições basais, sendo mais marcada 4 semanas após a indução da diabetes. Estes achados, juntamente com as observações prévias de alterações funcionais^(7,8) e estruturais⁽⁶⁾ da medula espinal, demonstram que a actividade neuronal na medula espinal está afectada de uma forma importante e alertam

para a possibilidade da ocorrência de alterações em regiões supraespinhais que estejam em comunicação com esta importante região do sistema nociceptivo durante a diabetes.

Agradecimentos

O trabalho foi realizado com o apoio de bolsas de investigação da Fundação AstraZeneca, da Sociedade Portuguesa de Diabetologia/Novo Nordisk, Bolsa de Doutoramento da FCT (SFRH/ BD/ 21555/2005) e projecto da FCT (PTDC/SAU-OSM/64643/2006).

BIBLIOGRAFIA

1. Sima AA. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 2445-2464.
2. Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000; 47: 123-128.
3. Simmons Z, Feldman EL. Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol.* 2002; 15: 595-603.
4. Podwall D, Gooch C. Diabetic neuropathy: clinical features, etiology, and therapy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2004; 4: 55-61.
5. Krishnan ST, Rayman G. New treatments for diabetic neuropathy: symptomatic treatments. *Curr Diab Rep.* 2003; 3: 459-467.
6. Eaton SE, Harris ND, Rajbhandari SM, et al. Spinal-cord involvement in diabetic peripheral neuropathy. *Lancet.* 2001; 358: 35-36.
7. Pertovaara A, Wei H, Kalmari J, et al. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. *Exp Neurol.* 2001; 167: 425-434.
8. Chen SR, Pan HL. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol.* 2002; 87: 2726-2733.
9. Diemel LT, Brewster WJ, Fernyhough P, et al. Expression of neuropeptides in experimental diabetes; effects of treatment with nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994; 21: 171-175.
10. Kamei J, Ogawa M, Kasuya Y. Development of supersensitivity to substance P in the spinal cord of the streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990; 35: 473-475.
11. Field MJ, McCleary S, Boden P, et al. Involvement of the central tachykinin NK1 receptor during maintenance of mechanical hypersensitivity induced by diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 285: 1226-1232.
12. Tomiyama M, Furusawa K, Kamijo M, et al. Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 136: 275-281.
13. Morgado C, Pinto-Ribeiro F, Tavares I. Diabetes affects the expression of GABA and potassium chloride cotransporter in the spinal cord: a study in streptozotocin diabetic rats. *Neurosci Lett.* (submitted).
14. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull.* 1998; 45: 1-8.
15. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 1987; 328: 632-634.
16. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol.* 2005; 77: 299-352.
17. Kajander KC, Madsen AM, Iadarola MJ, et al. Fos-like immunoreactivity increases in the lumbar spinal cord following a chronic constriction injury to the sciatic nerve of rat. *Neurosci Lett.* 1996; 206: 9-12.
18. Williams S, Evan G, Hunt SP. C-fos Induction in the spinal cord after peripheral nerve lesion. *Eur J Neurosci.* 1991; 3: 887-894.
19. Jergova S, Cizkova D. Long-term changes of c-fos expression in the rat spinal cord following chronic constriction injury. *Eur J Pain.* 2005; 9: 345-354.
20. Catheline G, Le Guen S, Honore P, et al. Are there long-term changes in the basal or evoked Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord of the mononeuropathic rat? *Pain.* 1999; 80: 347-357.
21. Bester H, Beggs S, Woolf CJ. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol.* 2000; 428: 45-61.
22. Dai Y, Iwata K, Kondo E, et al. A selective increase in Fos expression in spinal dorsal horn neurons following graded thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy. *Pain.* 2001; 90: 287-296.
23. Kosai K, Tateyama S, Ikeda T, et al. MK-801 reduces non-noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of rats with chronic constriction nerve injury. *Brain Res.* 2001; 910: 12-18.
24. Tsai Y, So EC, Chen HH, et al. Effect of intrathecal octreotide on thermal hyperalgesia and evoked spinal c-fos expression in rats with sciatic constriction injury. *Pain.* 2002; 99: 407-413.
25. Tokunaga A, Kondo E, Fukuoka T, et al. Excitability of spinal cord and gracile nucleus neurons in rats with chronically injured sciatic nerve examined by c-fos expression. *Brain Res.* 1999; 847: 321-331.
26. Revsin Y, Saravia F, Roig P, et al. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type I diabetes. *Brain Res.* 2005; 1038:22-31.
27. Zheng H, Li Y-F, Weiss M, et al. Neuronal expression of fos protein in the forebrain of diabetic rats. *Brain Res.* 2002; 956: 268-275.
28. Jang M-H, Chang H-K, Shin M-C, et al. Effect of ginseng radix on c-fos expression in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Sci.* 2003; 91: 149-152.
29. Gouty S, Regalia J, Cai F, et al. -Lipoic acid treatment prevents the diabetes-induced attenuation of the afferent limb of the baroreceptor reflex rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2003; 108: 32-44.
30. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983; 16: 109-110.
31. Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Methods Mol Med.* 2004; 99: 55-65.
32. Lima D, Avelino A, Coimbra A. Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport.* 1993; 4: 747-750.
33. Tavares I, Lima D, Coimbra A. Neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord projecting to the medullary ventrolateral reticular formation express c-fos after noxious stimulation of the skin. *Brain Res.* 1993; 623: 278-286.
34. Castro AR, Pinto M, Lima D, et al. Imbalance between the expression of NK1 and GABAB receptors in nociceptive spinal neurons during secondary hyperalgesia: a c-Fos study in the monoarthritic rat. *Neuroscience.* 2005; 132: 905-916.

35. Molander C, Xu Q, Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol*, 1984; 230:133-141.
36. Calcutt NA, Freshwater JD, Mizisin AP. Prevention of sensory disorders in diabetic Sprague-Dawley rats by aldose reductase inhibition or treatment with ciliary neurotrophic factor. *Diabetologia*. 2004; 47: 718-724.
37. Lee JH, McCarty R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain*. 1992; 50: 231-236.
38. Courteix C, Eschaliere A, Lavarenne J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain*. 1993; 53: 81-88.
39. Todd AJ, Ribeiro-da-Silva A. Molecular architecture of the dorsal horn. In *The neurobiology of pain*, Hunt S, Koltzenburg M. (Eds). Oxford University Press Inc: New York, 2005; 65-94.
40. Lima D. Anatomical basis for the dynamic processing of nociceptive input. *Eur. J. Pain*. 1998; 2: 195-202.
41. Burchiel KJ, Russell LC, Lee RP, et al. Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats. A possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain. *Diabetes*. 1985; 34: 1210-1213.
42. Gogas KR, Cho HJ, Botchkina GI, et al. Inhibition of noxious stimulus-evoked pain behaviors and neuronal fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat by supraspinal morphine. *Pain*. 1996; 65: 9-15.
43. Jones SL. Noxious heat-evoked fos-like immunoreactivity in the rat lumbar dorsal horn is inhibited by glutamate microinjections in the upper cervical spinal cord. *Brain Res*. 1998; 788: 337-340.
44. Ren K, Ruda MA. Descending modulation of Fos expression after persistent peripheral inflammation. *Neuroreport*. 1996; 7: 2186-2190.
45. Clark CM, Jr., Lee DA. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995; 332: 1210-1217.
46. Fox A, Eastwood C, Gentry C, et al. Critical evaluation of the streptozotocin model of diabetic neuropathy in the rat. *Pain*. 1999; 81: 307-316.
47. Bullitt W, Lee CL, Light A, et al. The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-fos expression in the rodent spinal cord. *Brain Res*. 1992; 580: 172-179.
48. Presley RW, Menetrey D, Levine JD, et al. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J. Neurosci*. 1990; 10: 323-335.
49. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev*. 1998; 28: 370-490.
50. Raz I, Hasdai D, Seltzer Z, et al. Effect of hyperglycemia on pain perception and on efficacy of morphine analgesia in rats. *Diabetes*. 1988; 37: 1253-1259.
51. Almeida A, Lima D. Activation by cutaneous or visceral noxious stimulation of spinal neurons projecting to the medullary dorsal reticular nucleus in the rat: a c-fos study. *Eur J Neurosci*. 1997; 9: 686-95.
52. Malcangio M, Tomlinson DR. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain*. 1998; 76: 151-157.
53. Todd AJ, Spike RC, Brodbelt AR, et al. Some inhibitory neurons in the spinal cord develop c-fos-immunoreactivity after noxious stimulation. *Neuroscience*. 1994; 63: 805-816.
54. Calcutt N, Jorge MC, Yaksh TL, et al. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 1996; 68: 293-299.
55. Courteix C, Bardin M, Massol J, et al. Daily insulin treatment relieves long-term hyperalgesia in streptozotocin diabetic rats. *NeuroReport* 1996; 7: 1922-1924.
56. Biessels G-J, Cristino NA, Rutten G-J, et al. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Course of development and effects of insulin treatment. *Brain* 1999; 122: 757-768.
57. Folli F, Bonfanti L, Renard E, et al. Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci*. 1994; 14: 6412-6422.
58. Sugimoto K, Murakawa Y, Sima A. Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Peripheral Nervous System* 2002; 7: 44-53.

