

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

A INERVAÇÃO PARASSIMPÁTICA COLINÉRGICA CRANIANA E AS CEFALÉIAS
PRIMÁRIAS: O PAPEL DA ACETILCOLINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
VASODILATAÇÃO DURAL NEUROGÊNICA

Autor: Fernando Kowacs

Orientador: Profa. Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves

TESE DE DOUTORADO

2004

Catálogo-na-Publicação

K885 Kowacs, Fernando
A inervação parassimpática colinérgica craniana e as cefaléias primárias: o papel da acetilcolina em um modelo experimental de vasodilatação dural neurogênica / Fernando Kowacs; orientador: Márcia Lorena Fagundes Chaves. — 2004.
99 f.

Tese (doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

1. Acetilcolina 2. Animais 3. Cefaléia 4. Receptores colinérgicos 5. Vasodilatação I. Chaves, Márcia Lorena Fagundes II.
Título

CDD 616.857
NLM WL 344

(Bibliotecária responsável: Viviane Castanho – CRB-10/1130)

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro e Ignez.

Agradeço,

À Professora Doutora Márcia Lorena Fagundes Chaves, pela orientação, confiança e amizade.

Ao Professor Doutor Clovis Roberto de Magalhães Francesconi, Chefe do Serviço de Neurologia do HCPA, pelo apoio permanente desde a criação do Ambulatório de Cefaléia deste Serviço e pelas valiosas observações feitas em relação a este trabalho.

Ao Dr. Mário Martins Henrique, pelo tratamento de colega e amigo.

Ao Professor Peter J. Goadsby, pela inspiração intelectual e pelas oportunidades concedidas.

Ao Doutor David John Williamson, pela orientação durante o trabalho experimental.

À CAPES, pela bolsa concedida durante os meus cursos de mestrado e de doutorado, e à Merck, Sharp & Dohme no Brasil, pelo auxílio financeiro concedido através do Programa Merck Sharp & Dohme de Estágio em Enxaqueca no Exterior, o qual possibilitou a realização do estudo experimental que é parte desta tese.

Ao Professor Doutor Airton Schneider, aos colegas Dr. Alan Christmann Fröhlich e Dra. Mariana Peixoto Socal, à Acadêmica Jéssica Brugnera Mesquita e às Bibliotecárias Mabel Fernandes Figueiró e Débora Sousa Andriotti, da Biblioteca Virtual do Hospital Moinhos de Vento, pelo auxílio pronto e valioso.

Às minhas filhas, esposa, sogra e irmãos, pelo apoio durante mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1 A ANATOMIA FUNCIONAL DO SISTEMA PARASSIMPÁTICO CRANIANO ...	20
1.1 Os núcleos do tronco cerebral e o controle autonômico hipotalâmico .	20
1.2 O gânglio pterigopalatino	21
1.3 Os minigânglios cavernosos e carotídeos.....	23
1.4 A inervação parassimpática colinérgica da vasculatura cerebral.....	27
1.5 A transmissão colinérgica e os mecanismos centrais de controle do tônus vascular cerebral	29
1.6 A inervação parassimpática colinérgica dos vasos da dura-máter	31
2 O SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO NAS CEFALÉIAS PRIMÁRIAS	33
2.1 As alterações autonômicas cranianas.....	33
2.2 O equilíbrio autonômico nos indivíduos portadores de migrânea e de cefaléia em salvas.....	34
2.2.1 <i>Testagem de reflexos cardiovasculares.....</i>	<i>34</i>
2.2.2 <i>Monitorização prolongada do ritmo cardíaco e da pressão arterial.....</i>	<i>36</i>
3 OS MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES DA DURA-MÁTER	37
3.1 Microscopia <i>in vivo</i>	37
3.2 Fluxometria por <i>laser</i> Doppler	38
3.3 Inflamação dural neurogênica	39

OBJETIVOS.....	40
REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA).....	42
ARTIGO CIENTÍFICO (VERSÃO EM LÍNGUA INGLESA).....	57
ARTIGO CIENTÍFICO (VERSÃO EM LÍNGUA PORTUGUESA).....	76
ANEXOS.....	95
1 DETALHAMENTO DA TÉCNICA UTILIZADA NO EXPERIMENTO.....	96
1.1 Animais.....	96
1.2 Anestesia.....	96
1.3 Preparação cirúrgica.....	97
1.3.1 <i>Canulação da traquéia e dos vasos femorais.....</i>	<i>97</i>
1.3.2 <i>Preparação da “janela craniana” fechada.....</i>	<i>97</i>
1.3.3 <i>Posicionamento do eletrodo estimulador.....</i>	<i>98</i>
1.4 Medição do diâmetro dos vasos da dura-máter.....	98

PREFÁCIO

Esta Tese segue o modelo recomendado nas “Instruções para apresentação de Dissertações e Teses”, parte do manual “Organização, Normas e Procedimentos”, publicado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 1999. O experimento realizado é relatado sob a forma de um artigo elaborado de acordo com as normas do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, em versões nos idiomas inglês e português. A revisão da literatura, discutida de forma sucinta no artigo em questão, é apresentada de forma mais abrangente em um capítulo que o precede. Existem, portanto, três listas de referências bibliográficas: a primeira é relacionada aos capítulos de introdução e de revisão de literatura e as demais são relacionadas às diferentes versões do artigo científico. Apesar de descrita nos artigos científicos, a metodologia empregada nos experimentos é apresentada de modo mais detalhado no Anexo I.

O termo “migrânea” foi adotado pela Comissão de Tradução e Revisão da Sociedade Brasileira de Cefaléia, em substituição ao termo “enxaqueca”, na tradução autorizada da obra “Classification and Diagnostic Criteria for Headache Disorders, Cranial Neuralgias and Facial Pain”, editada pela Sociedade Internacional de Cefaléia (*International Headache Society*) em 1988. Nesta Tese, a orientação da Sociedade Brasileira de Cefaléia foi seguida, apesar do termo migrânea ainda não ter sido incorporado aos dicionários da língua portuguesa.

O estudo descrito nesta tese foi realizado durante período de treinamento na Unidade de Cefaléia do Instituto de Neurologia do *University College London*, em Londres, sob a supervisão do Professor Peter J. Goadsby e patrocínio, através de bolsa de aperfeiçoamento, da Merck, Sharp & Dohme do Brasil. O trabalho de

laboratório teve lugar no Centro de Pesquisas em Neurociências da empresa farmacêutica Merck, Sharp & Dohme, em Terlings Park, Harlow, Inglaterra, com o acompanhamento do Doutor David John Williamson.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A cefaléia é um sintoma bastante comum na população, atingindo quase a totalidade dos indivíduos em algum momento da vida (1-3). Apesar de poder se apresentar como manifestação de alterações na macroestrutura do sistema nervoso central ou de várias afecções sistêmicas, na maioria das vezes é o sintoma cardinal de um grupo de doenças chamadas de cefaléias primárias, das quais as principais são a migrânea (comumente conhecida como enxaqueca), a cefaléia tipo tensional e a cefaléia em salvas (*cluster headache*) (4). A natureza episódica e a ausência de mortalidade destas fazem com que sejam negligenciadas como problema de saúde pública, mas as duas primeiras são doenças que têm uma prevalência alta e que acarretam um prejuízo significativo sobre a qualidade de vida dos indivíduos afetados, além de um ônus à sociedade, através do custo associado ao cuidado médico e à perda de produtividade (1, 5-9). A cefaléia em salvas e as demais cefaléias trigêmino-autonômicas (*hemicrania paroxística* e a síndrome SUNCT: *short-lasting unilateral neuralgiform headache attacks with conjunctival injection and tearing*) são relativamente raras, porém podem provocar sofrimento individual intenso (10).

A compreensão da fisiopatologia das cefaléias primárias, principalmente da migrânea, avançou significativamente desde o início da década de 1980, a partir da investigação sistemática das alterações da perfusão cerebral ocorridas durante a crise migranosa (11). A concepção da migrânea como uma doença dos vasos sanguíneos, hegemônica a partir dos estudos de Wolff descrevendo o efeito vasoconstritor da ergotamina sobre as artérias extracranianas durante as crises (12), gradualmente deu lugar à concepção da mesma como um transtorno originado por alterações funcionais ou estruturais sutis do sistema nervoso central que

acarretam uma suscetibilidade aumentada à dor de cabeça, juntamente com outras manifestações neurológicas, e que são determinadas em maior ou menor grau por herança familiar (13, 14). Alterações funcionais em áreas específicas do encéfalo, diferentes daquelas relacionadas à percepção de dor inespecífica, foram demonstradas durante crises de migrânea, cefaléia em salvas e síndrome SUNCT, por estudos de neuroimagem funcional realizados através da tomografia por emissão de pósitron (PET) (15-18) e da ressonância magnética funcional (19-22). Além disso, a existência de alterações estruturais envolvendo a substância cinzenta do hipotálamo posterior foi evidenciada em um estudo de morfometria cerebral por ressonância magnética *voxel-a-voxel* em pacientes acometidos por cefaléia em salvas (23). A porção rostral do tronco cerebral, na migrânea, e o hipotálamo, na cefaléia em salvas e na síndrome SUNCT, são considerados por alguns autores, notadamente aqueles ligados ao grupo do Instituto de Neurologia do *University College London*, como os pontos onde residem as alterações primárias destas doenças, ou ao menos, como os pontos geradores das crises (10, 14, 24). O envolvimento da vasculatura craniana, notadamente a dilatação dos vasos da dura-máter, é considerado, no entanto, parte da seqüência de eventos que leva à expressão das crises de algumas cefaléias primárias, como demonstrado pela eficácia de medicações agonistas serotoninérgicas - com efeito vasoconstritor craniano - no tratamento das crises de migrânea e de cefaléia em salvas (14, 25). Foi demonstrado que a vasodilatação observada em algumas cefaléias primárias é provocada pela liberação de peptídeos vasoativos pelas terminações das fibras que inervam a vasculatura craniana – o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonine gene-related peptide*, CGRP) (26) na migrânea, e o peptídeo intestinal vasoativo (*vasoactive intestinal peptide*, *vasoactive intestinal polypeptide*, VIP) na cefaléia em salvas (27, 28) e na hemicrania paroxística (29). O primeiro é liberado pela ativação antidrômica do nervo trigêmeo e o segundo, um dos

neurotransmissores presentes nas fibras parassimpáticas cranianas vasomotoras (30, 31), pelo aumento do efluxo parassimpático através do nervo facial.

Várias manifestações clínicas podem acompanhar a dor nas crises das cefaléias primárias. Fenômenos como a náusea, a intolerância aos estímulos sensoriais diversos e os distúrbios autonômicos cranianos manifestam-se em intensidade e combinações variadas, conforme a moléstia específica (4). Os fenômenos autonômicos cranianos não ocorrem nas crises de cefaléia tipo tensional e na maior parte das crises de migrânea (32), porém, juntamente com a menor duração das crises e a estrita unilateralidade da dor, são componentes fundamentais das cefaléias trigêmino-autonômicas (4).

O compartilhamento do mesmo sistema de expressão da dor craniana por diferentes tipos de cefaléias primárias, envolvendo tanto a ativação trigeminal quanto, em maior ou menor grau, a ativação parassimpática craniana (33), baseia-se na existência de um sistema de inervação dos vasos intracranianos, o sistema trigeminovascular (34). Neste, uma conexão funcional dá origem ao reflexo trigêmino-autonômico, cuja via aferente é o nervo trigêmeo e a via eferente o nervo facial, e cuja ativação seria determinada pela severidade da dor e pelo tipo de cefaléia primária em questão (35). É na cefaléia em salvas, na hemicrania paroxística e na síndrome SUNCT, as ditas cefaléias trigêmino-autonômicas, que a manifestação deste reflexo compõe o quadro clínico na qualidade de peça fundamental.

A segunda edição da Classificação Internacional das Cefaléias, elaborada e editada pela Sociedade Internacional de Cefaléia (*International Headache Society, IHS*) (4), divide as cefaléias primárias em quatro grupos: migrânea, cefaléia tipo tensional, cefaléia em salvas e outras cefaléias trigêmino-autonômicas e “outras cefaléias primárias”. O sistema de classificação é hierarquizado e permite estabelecer um diagnóstico em até quatro níveis em algumas situações. Apesar de haver mais dez

grupos que abrangem as cefaléias secundárias e as neuralgias cranianas, estes não serão abordados por não serem de interesse nesta revisão. A Tabela 1 mostra as subcategorias das cefaléias primárias, até o segundo nível.

O sistema de classificação da IHS apresenta critérios diagnósticos para cada tipo de cefaléia, envolvendo basicamente a duração e a frequência das crises, as características da dor e os fenômenos associados. Além disso, é fornecida uma breve descrição do quadro clínico e uma lista da nomenclatura previamente utilizada. A Tabela 2 mostra os requisitos para o diagnóstico de migrânea sem aura e migrânea com aura e as Tabelas 3 a 4 aqueles necessários para o diagnóstico das cefaléias trigêmino-autonômicas.

Tabela 1 - Cefaléias primárias conforme a *International Headache Society*

<i>Primeiro nível</i>	<i>Segundo nível</i>
1. Migrânea	1.1 Migrânea sem aura 1.2 Migrânea com aura 1.3 Síndromes periódicas da infância que são precursoras habituais da migrânea 1.4 Migrânea retiniana 1.5 Complicações da migrânea 1.6 Migrânea provável
2. Cefaléia tipo tensional	2.1 Cefaléia tipo tensional episódica infreqüente 2.2 Cefaléia tipo tensional episódica freqüente 2.3 Cefaléia tipo tensional crônica 2.4 Cefaléia tipo tensional provável
3. Cefaléia em salvas e outras cefaléias trigêmino-autonômicas	3.1 Cefaléia em salvas 3.2 Hemicrania paroxística 3.3 SUNCT * 3.4 Cefaléia trigêmino-autonômica provável
4. Outras cefaléias primárias	4.1 Cefaléia idiopática em punhalada 4.2 Cefaléia primária da tosse 4.3 Cefaléia primária do exercício 4.4 Cefaléia primária associada à atividade sexual 4.5 Cefaléia hipócnica 4.6 Cefaléia primária em trovoada 4.7 Hemicrania contínua 4.8 Cefaléia persistente diária desde a instalação

* Crises de cefaléia unilateral neuralgiforme de curta duração com injeção conjuntival e lacrimejamento

Adaptado da Referência (4)

Tabela 2 - Critérios diagnósticos para migrânea sem aura e migrânea com aura

1.1 Migrânea sem aura

- A. Ao menos 5 crises preenchendo os critérios B-D
 - B. Crises de cefaléia durando 4 a 72 horas (não tratadas ou tratadas sem sucesso)
 - C. A cefaléia tem ao menos duas das seguintes características:
 - 1. localização unilateral
 - 2. qualidade pulsátil
 - 3. intensidade moderada ou forte
 - 4. agravada por ou causando a esquivas de atividades físicas rotineiras (p.e. caminhar ou subir escadas)
 - D. Ao menos um dos seguintes, durante a cefaléia:
 - 1. náusea e/ou vômitos
 - 2. fotofobia e fonofobia
 - E. Não atribuída a outro distúrbio
-

1.2 Migrânea com aura

- A. Ao menos 2 crises preenchendo o critério B
 - B. Aura migranosa preenchendo os critérios B e C para uma das subformas 1.2.1-1.2.6
 - C. Não atribuída a outro distúrbio
- Critérios B e C das subformas aura típica com cefaléia migranosa, 1.2.1; aura típica com cefaléia não-migranosa, 1.2.2 e aura típica sem cefaléia, 1.2.3 *
- B. Aura consistindo em apenas um dos seguintes, mas sem diminuição de força:
 - 1. sintomas visuais completamente reversíveis, incluindo manifestações positivas e/ou negativas
 - 2. sintomas sensoriais completamente reversíveis, incluindo manifestações positivas e/ou negativas
 - 3. distúrbio disfásico da fala totalmente reversível
 - C. Ao menos dois dos seguintes:
 - 1. sintomas visuais homônimos e/ou sintomas sensoriais unilaterais
 - 2. ao menos um sintoma da aura desenvolve-se gradualmente em período ≥ 5 min e/ou diferentes sintomas da aura ocorrem sucessivamente em período ≥ 5 min
 - 3. cada sintoma tem duração ≥ 5 min e ≤ 60 min
-

Adaptado da Referência (4)

* para os critérios de aura das subformas 1.2.3, 1.2.4, 1.2.5, mais raras, ver Referência (4)

Tabela 3 - Critérios diagnósticos para cefaléia em salvas e hemicrania paroxística

3.1 Cefaléia em salvas

- A. Ao menos 5 crises preenchendo os critérios B-D
 - B. Dor intensa ou muito intensa unilateral orbitária, supra-orbitária e/ou temporal, com duração de 15 a 180 minutos, se não tratada
 - C. A cefaléia é acompanhada por ao menos um dos seguintes:
 - 1. injeção conjuntival e/ou lacrimejamento ipsilateral/is
 - 2. congestão nasal e/ou rinorréia ipsilateral/is
 - 3. edema palpebral ipsilateral
 - 4. sudorese frontal e facial ipsilaterais
 - 5. miose e/ou ptose ipsilateral/is
 - 6. uma sensação de inquietude e/ou agitação
 - D. As crises têm uma freqüência de uma em dias alternados até 8 por dia
 - E. Não atribuída a outro distúrbio
-

3.2 Hemicrania paroxística

- A. Ao menos 20 crises preenchendo os critérios B-D
 - B. Crises de dor severa unilateral orbitária, supra-orbitária ou temporal, com duração de 2 a 30 minutos
 - C. A cefaléia é acompanhada por ao menos um dos seguintes:
 - 1. injeção conjuntival e/ou lacrimejamento ipsilateral/is
 - 2. congestão nasal e/ou rinorréia ipsilateral/is
 - 3. edema palpebral ipsilateral
 - 4. sudorese frontal e facial ipsilaterais
 - 5. miose e/ou ptose ipsilateral/is
 - D. As crises têm uma freqüência acima de 5 por dia por mais da metade do tempo, apesar de que períodos com uma freqüência menor podem ocorrer
 - E. As crises são completamente prevenidas por doses terapêuticas de indometacina
 - F. Não atribuída a outro distúrbio
-

Adaptado da Referência (4)

Tabela 4 - Critérios diagnósticos para SUNCT

3.3 Crises de cefaléia unilateral neuralgiforme de curta duração com injeção conjuntival e lacrimejamento (SUNCT)

- A. Ao menos 20 crises preenchendo os critérios B-D
 - B. Crises de dor unilateral orbitária, supra-orbitária ou temporal, pulsátil ou perfurante, com duração de 5 a 240 segundos
 - C. A dor é acompanhada por injeção conjuntival e lacrimejamento ipsilaterais
 - D. As crises ocorrem com uma freqüência de 3 a 200 por dia
 - E. Não atribuída a outro distúrbio
-

Adaptado da Referência (4)

A cefaléia tipo tensional caracteriza-se por crises de dor de cabeça geralmente bilateral, não pulsátil, não tão intensa como a que ocorre nas crises de migrânea e que não se agrava aos movimentos. A presença de fenômenos associados, como a náusea e a intolerância aos estímulos sensoriais e os fenômenos autonômicos cranianos, respectivamente típicos da migrânea e das cefaléias trigêmino-autonômicas, não é comum neste tipo de cefaléia. Não há sintomas premonitórios, aura ou sinais de ativação autonômica, e o componente genético, que parece existir no tipo crônico, é pouco significativo (4, 36).

A migrânea é uma doença crônica de herança familiar, caracterizada por crises recorrentes de dor de cabeça com duração habitual de 4 a 72 horas e atributos típicos como a intensidade moderada ou forte, o caráter pulsátil, a localização unilateral e o agravamento com a movimentação. A dor é acompanhada por fenômenos como náusea, vômitos e, menos freqüentemente, diarreia, além de hipersensibilidade aos estímulos sensoriais, manifesta por fotofobia, fonofobia e intolerância a odores. Nem todos os indivíduos acometidos, no entanto, apresentam todas as características ou fenômenos associados (ver Tabela 2) (4, 14). Alguns pacientes podem apresentar os chamados sintomas premonitórios, algumas horas ou até dois dias antes do início da crise de dor: alterações do humor,

comportamento e vigilância; fadiga, dificuldade de concentração, rigidez cervical, sensibilidade aumentada para som e/ou luz, náusea, visão borrada, palidez e perversão do apetite (37-39). Quinze por cento dos indivíduos afetados apresentam sintomas transitórios de disfunção focal do córtex ou do tronco cerebral que se instalam gradualmente ao longo de alguns minutos e duram menos de 1 hora, consistindo no fenômeno da aura migranosa (ver Tabela 2). A dor costuma suceder a aura, mas pode ocorrer antes ou simultaneamente à mesma, ou mesmo não se apresentar. A prevalência da migrânea varia de acordo com a região, o sexo e a idade, sendo maior na Europa e nas Américas que na África e na Ásia, por razões ainda desconhecidas. Depois da puberdade, a prevalência é maior nas mulheres, e é durante a fase mais produtiva dos indivíduos - entre os 25 e os 55 anos de idade - que atinge o seu pico, o que explica em parte seu grande impacto econômico (40). A prevalência-ano nos países ocidentais é de aproximadamente 6% nos homens e 15% a 18% nas mulheres (14). No Brasil, a prevalência-ano, detectada em dois estudos populacionais, é de 9,9% em crianças e adolescentes de 10 a 18 anos (3) e de 22,1% em adultos (1).

A cefaléia em salvas é uma cefaléia primária caracterizada por crises de dor muito intensa, estritamente unilateral, localizada na região periorbitária e temporal e acompanhada por fenômenos autonômicos, também estritamente unilaterais e ipsilaterais à dor (ver Tabela 3). Estes são, de forma simplificada, relacionados à ativação parassimpática (lacrimejamento, congestão nasal, rinorréia, sudorese frontal/facial, edema palpebral) e à disfunção simpática (miose e ptose) (10, 41). A inquietude e a agitação que acontecem na grande maioria dos pacientes durante as crises são importantes no diagnóstico diferencial com a migrânea e foram incluídas entre os critérios diagnósticos da cefaléia em salvas na segunda edição da Classificação Internacional das Cefaléias (4). Além disso, as crises têm uma duração relativamente curta e geralmente ocorrem mais de 1 vez ao dia (ver Tabela

3), às vezes apresentando uma periodicidade circadiana marcada, ocorrendo sempre nos mesmos horários. Cerca de 15% dos pacientes apresentam a cefaléia em salvas crônica, onde não há períodos de remissão maiores que duas semanas, durante um ano (o período de remissão necessário para o diagnóstico foi modificado para um mês na segunda edição da Classificação Internacional das Cefaléias, ainda não utilizada para estudos de prevalência). A maioria dos pacientes apresenta a forma episódica da cefaléia em salvas, onde as crises ocorrem apenas durante períodos que duram de semanas a meses (um a três meses habitualmente) e podem ocorrer muitas vezes também com uma periodicidade pronunciada. A cefaléia em salvas atinge mais os homens que as mulheres (5 para 1), manifesta-se geralmente entre os 20 e os 40 anos de idade e tem uma prevalência de aproximadamente 0,1% na população adulta (42).

A hemicrania paroxística é uma cefaléia primária bastante rara, descrita em 1974 por Sjaastad e Dale (43). Duas apresentações são reconhecidas: a hemicrania paroxística crônica e a hemicrania paroxística episódica, diferenciadas através dos mesmos critérios utilizados na diferenciação dos tipos de cefaléia em salvas (4). Apesar das grandes semelhanças da hemicrania paroxística com a cefaléia em salvas (ver Tabela 3), notadamente em relação às características da dor e aos fenômenos autonômicos associados à esta, as diferenças são inequívocas e suficientes para caracterizá-las como entidades nosológicas distintas. Na hemicrania paroxística, as crises de dor são mais breves e mais freqüentes, a inquietude e a agitação durante as crises acontece em uma parcela menor dos pacientes (44), a prevalência é maior nas mulheres e existe uma resposta específica, rápida e completa à indometacina.

A síndrome SUNCT, outra cefaléia primária bastante rara descrita por Sjaastad (45) em 1989, caracteriza-se por crises breves de dor periorbitária unilateral (20 a 90 segundos de duração), acompanhadas por sinais de ativação parassimpática

cranial intensa, ipsilateral à dor, principalmente injeção conjuntival e lacrimejamento (ver Tabela 4). As crises podem ocorrer em uma frequência de até trinta crises por hora e instalam-se em poucos segundos, desaparecendo também de forma rápida. Existe um padrão de agrupamento das crises em períodos de alguns dias a vários meses, separados por períodos de remissão com duração de alguns meses. Ao contrário do que acontece na cefaléia em salvas, as crises não são acompanhadas por inquietude e agitação e podem ser precipitadas pelo toque na face, cabelo ou couro cabeludo e pelos atos de lavar o rosto, escovar os dentes, mastigar, falar, tossir ou mover o pescoço. Apesar da semelhança em relação aos desencadeantes das crises, fatores que diferenciam a síndrome SUNCT da neuralgia trigeminal são a localização periorbitária, a ausência de período refratário, a maior duração das crises, a falta de resposta à carbamazepina e o predomínio de pacientes do sexo masculino. Não há resposta significativa às drogas utilizadas no tratamento preventivo ou agudo das crises de migrânea ou de cefaléia em salvas, assim como à indometacina. A lamotrigina, o topiramato e a gabapentina são drogas aparentemente úteis, porém sua eficácia ainda não foi avaliada de forma sistemática (10, 46, 47).

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 A ANATOMIA FUNCIONAL DO SISTEMA PARASSIMPÁTICO CRANIANO (48-51)

1.1 Os núcleos do tronco cerebral e o controle autonômico hipotalâmico

Os neurônios pré-ganglionares do sistema parassimpático craniano localizam-se na coluna motora visceral geral, localizada na ponte e no bulbo, sob o assoalho do quarto ventrículo, e no mesencéfalo, em posição ventral em relação ao aqueduto. Estes neurônios fazem parte dos núcleos do terceiro, sétimo, nono e décimo nervos cranianos e recebem inervação oriunda do hipotálamo. O controle hipotalâmico dos núcleos parassimpáticos se dá principalmente a partir do núcleo paraventricular, cujos neurônios projetam-se lateralmente pelo feixe prosencefálico medial e pelo tegmento dorsolateral no mesencéfalo, na ponte e no bulbo. Além disso, outros centros hipotalâmicos também contribuem para o controle visceromotor, como a zona hipotalâmica lateral, o núcleo hipotalâmico dorsomedial e o hipotálamo posterior. Além do hipotálamo, núcleos do próprio tronco cerebral participam da regulação do sistema nervoso autônomo, como a formação reticular bulbopontina, os núcleos da rafe e neurônios da região ventrolateral do bulbo.

Cada núcleo do tronco cerebral que contém neurônios pré-ganglionares parassimpáticos inerva estruturas viscerais cranianas ou tóraco-abdominais específicas. O núcleo de Edinger-Westphal, que faz parte do complexo de núcleos do nervo motor ocular comum, localizado no mesencéfalo, dá origem a fibras que trafegam por este nervo e fazem sinapse com neurônios pós-ganglionares no gânglio ciliar. Estes inervam o músculo ciliar e o músculo constritor da íris.

As fibras dos neurônios do núcleo salivatório superior, localizado na porção mais caudal da ponte, fazem parte do nervo facial e passam pelo gânglio geniculado sem

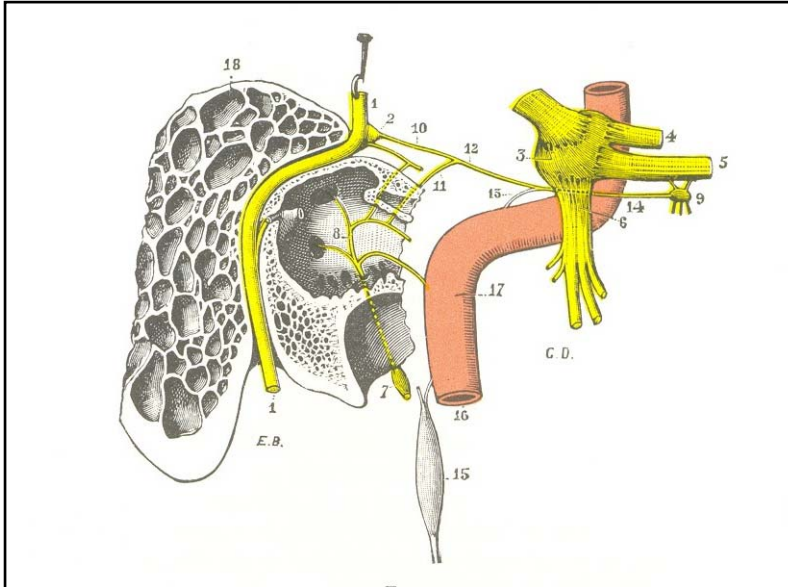
fazer sinapse. Estas fibras encontram os neurônios pós-ganglionares em dois gânglios localizados no esplanocrânio: a porção que trafega pelo nervo intermediário (nervo de Wrisberg) faz sinapse no gânglio pterigopalatino, cujos neurônios pós-ganglionares inervam as glândulas lacrimais e as da mucosa nasal, além da vasculatura intracraniana; as demais vão fazer sinapse no gânglio submandibular, onde se originam as fibras que inervam as glândulas salivares submandibulares e sublinguais. O núcleo salivatório inferior localiza-se próximo ao núcleo salivatório superior, porém após a transição pontobulbar, e contém neurônios pré-ganglionares cujas fibras cursam pelo nervo glossofaríngeo (nono nervo craniano) e fazem sinapse com neurônios do gânglio ótico, que controlam a produção de saliva pela glândula parótida. O núcleo do nervo vago (décimo nervo craniano) também se encontra na coluna motora visceral geral, em posição caudal ao núcleo salivatório inferior. Suas fibras pré-ganglionares dirigem-se a gânglios localizados nas vísceras do tórax e do abdômen, chamados de gânglios terminais, onde fazem sinapse.

1.2 O gânglio pterigopalatino

O gânglio pterigopalatino, também chamado gânglio de Meckel, mede 3 a 4 milímetros de diâmetro e é ligado ao sistema trigeminal e ao nervo facial. Encontra-se na fossa pterigomaxilar, à frente do orifício anterior do canal vidiano, sendo ligado ao nervo maxilar superior por duas raízes que emergem deste logo após sua entrada na fossa pterigomaxilar (ver Figura 1, pág. 23). As fibras pré-ganglionares parassimpáticas oriundas do núcleo salivatório superior trafegam pelo nervo facial sem fazer sinapse no gânglio geniculado e abandonam este pelo nervo petroso superficial maior, dirigindo-se ao gânglio pterigopalatino (52) através do nervo vidiano, formado pela união do nervo petroso superficial maior com o nervo petroso profundo (ramo do nervo carotídeo interno). Do gânglio pterigopalatino partem

fibras que inervam as glândulas lacrimais, as glândulas da mucosa nasal e a vasculatura intracraniana, conforme citado acima. Também foi demonstrada, no macaco, a presença de fibras pós-ganglionares parassimpáticas que se originam no gânglio pterigopalatino e inervam as artérias coróides (53). Na mucosa nasal do gato, a quantidade de peptídeo intestinal vasoativo e de colinoacetiltransferase, um marcador específico dos neurônios colinérgicos, diminuiu em 70% a 80% após a ressecção do gânglio pterigopalatino, mantendo-se inalterada após a simpatectomia combinada com denervação trigeminal (54). Além disto, a análise imunistoquímica quantitativa mostrou que praticamente todos os neurônios do gânglio pterigopalatino do gato são reativos ao VIP e que, portanto, há coexistência deste com a acetilcolina em parte dos seus neurônios. Conforme um estudo realizado com traçador axonal retrógrado e denervação seletiva, as fibras VIP-érgicas que inervam a artéria cerebral média do rato originam-se dos gânglios pterigopalatino e ótico e dos minigânglios da artéria carótida interna (55). Nesta mesma publicação são relatados o desaparecimento das fibras VIP-érgicas da porção anterior do polígono de Willis e a diminuição acentuada das mesmas na artéria cerebral média, na artéria cerebral posterior e na porção rostral da artéria basilar após a ressecção bilateral do gânglio pterigopalatino. O papel das fibras parassimpáticas pós-ganglionares que se originam no gânglio pterigopalatino e dirigem-se à vasculatura cerebral foi melhor entendido a partir de um experimento onde se observou o aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) do rato, medido por espectrometria de massa, após a estimulação elétrica do gânglio pterigopalatino (56).

Figura 1 - Vista lateral semi-esquemática do gânglio pterigopalatino humano com suas diferentes raízes. Extraído da referência (48).



1 - nervo facial; 2 - gânglio geniculado; 3 - gânglio de Gasser; 4 - n. oftálmico; 5 - n. maxilar superior; 6 - n. maxilar inferior; 7 - n. glossofaríngeo; 8 - n. carotídeo interno; 9 - gânglio pterigopalatino; 10 - n. petroso superficial maior; 11 - n. petroso profundo; 12 - filete cranial do n. vidiano; 13 - filete carotídeo do n. vidiano; 14 - n. vidiano; 15 - gânglio simpático cervical superior; 16 - carótida interna; 17 - plexo carotídeo; 18 - rochedo temporal, cortado paralelamente à porção descendente do aqueduto de Falópio.

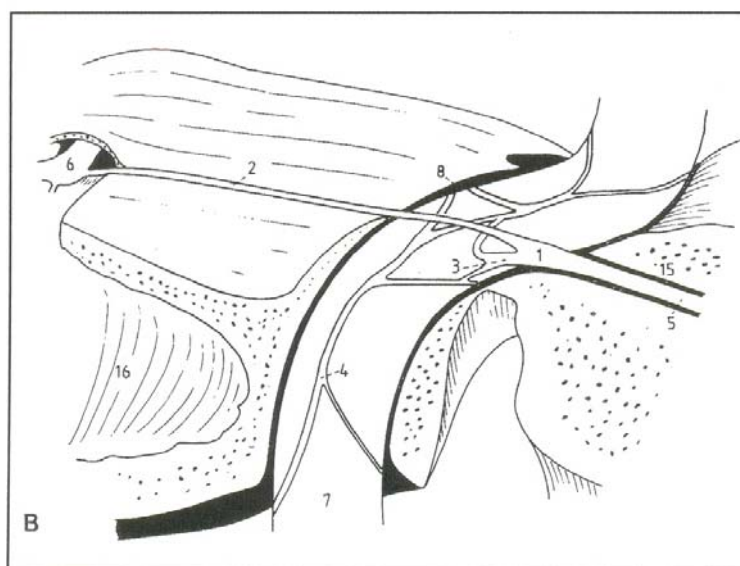
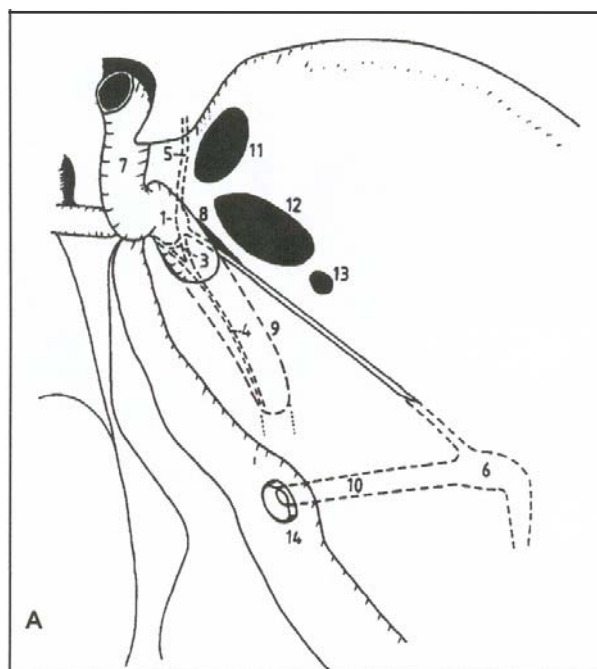
1.3 Os minigânglios cavernosos e carotídeos

Em um estudo anatômico em humanos, neurônios similares àqueles encontrados nos gânglios autonômicos foram encontrados do seio cavernoso, agrupados em pequenos gânglios ou situados ao longo de fibras nervosas nas proximidades da artéria carótida interna e do nervo abducente (57). Um estudo anatômico em macacos mostrou que fibras da primeira divisão do nervo trigêmeo projetam-se para a artéria cerebral média a partir do seio cavernoso, juntamente com fibras autonômicas. Neurônios da segunda divisão do nervo trigêmeo dirigem-se ao “plexo cavernoso”, como chamado pelos autores, através de ramos do nervo órbito-ciliar que penetram no crânio a partir da fossa pterigopalatina. Todos os ramos do “plexo

cavernoso”, neste estudo, continham tanto fibras sensitivas trigeminais quanto fibras autonômicas (58). Através de outro estudo realizado em macacos, onde foram utilizadas técnicas de imunistoquímica e de traçador axonal retrógrado, foi demonstrada a conexão de fibras parassimpáticas provenientes do gânglio pterigopalatino e positivas para VIP e colinoacetiltransferase com o gânglio da carótida interna, após transitarem pela região do seio cavernoso. Fibras parassimpáticas – junto com fibras sensitivas trigeminais – atingem também a artéria basilar e o tentório, acompanhando superficialmente os nervos abducente e troclear, rumo à sua origem (59). A anatomia da região do seio cavernoso nos seres humanos foi descrita de forma detalhada por Suzuki e Hardebo (60) (ver Figura 2, pág. 26), que estudaram-na com o auxílio de técnicas de imunistoquímica para colinoacetiltransferase, VIP, CGRP e substância P. Foram preparadas peças contendo: a) um segmento da artéria carótida interna, o nervo da carótida interna, o nervo petroso profundo, a porção intracraniana do nervo petroso superficial maior e a porção proximal do nervo vidiano; b) a porção cavernosa da artéria carótida interna e os nervos troclear, abducente e oftálmico; c) dura-máter frontobasal. Foram detectadas fibras parassimpáticas e nociceptivas junto à artéria carótida interna intracraniana, provavelmente direcionadas às suas ramificações intracranianas e também à musculatura lisa da sua *vasa vasorum* e da sua própria parede. Dois agregados de células ganglionares foram encontrados próximos um ao outro na junção do nervo petroso superficial maior com o nervo petroso profundo. Estes agrupamentos foram denominados gânglios da carótida interna, e estão posicionados na superfície ventrolateral desta artéria, em situação extradural, logo após sua entrada no crânio através do forâmen rasgado. Ao estudar a região do seio cavernoso, os autores não só confirmaram a existência do gânglio cavernoso no ser humano (ver acima), como também constataram sua natureza parassimpática, através do estudo imunistoquímico que mostrou a presença

maciça de VIP e colinoacetiltransferase nas suas células. Este gânglio é formado por agregados confluentes de células nervosas localizados entre a artéria carótida interna e o nervo abducente, na porção rostral do seio cavernoso, e parece receber fibras pré-ganglionares provenientes do gânglio pterigopalatino, através dos ramos orbitais. É importante ressaltar que a ligação entre o gânglio pterigopalatino e os vasos piaais ocorre de outra maneira no rato, pois as fibras atingem a porção rostral do polígono de Willis através do forâmen etmoidal e da dura-máter frontobasal (55, 60). Os autores enumeram as estruturas possivelmente inervadas pelas fibras parassimpáticas pós-ganglionares oriundas do gânglio cavernoso: a artéria carótida interna e as suas ramificações intracranianas mais proximais, a artéria basilar e seus ramos (através da ligação à superfície do nervo abducente), as estruturas da órbita e a dura-máter circunjacente, bem como a cápsula da hipófise e outras estruturas próximas.

Figura 2 - Ilustração esquemática da superfície interna da fossa craniana média (A) e visão lateral do canal carotídeo e estruturas circunjacentes, do lado direito (B), após remoção da dura-máter e do gânglio trigeminal (seres humanos). Extraído da referência (59).



1 - gânglio carotídeo interno; 2 - n. petroso superficial maior; 3 - n. petroso profundo; 4 - n. carotídeo interno com plexo; 5 - n. vidiano; 6 - gânglio geniculado; 7 - a. carótida interna; 8 - forâmen rasgado; 9 - canal carotídeo; 10 - n. facial; 11 - forâmen redondo; 12 - forâmen oval; 13 - forâmen espinhoso; 14 - meato auditivo interno; 15 - canal pterigóide; 16 - cavidade timpânica.

1.4 A inervação parassimpática colinérgica da vasculatura cerebral

Em 1975, através de técnicas histológicas convencionais, foi constatada a existência de densos plexos adrenérgicos e colinérgicos inervando as grandes artérias do sistema carotídeo e basilar, nos seres humanos e em várias outras espécies de mamíferos (61). No mesmo ano, foi caracterizada a presença de inervação vasodilatadora nas artérias cerebrais do gato, e sua origem nos gânglios cervicais superiores foi descartada (62). No ano seguinte, através de método histoquímico (a partir da atividade da acetilcolinesterase), neurônios colinérgicos foram detectados nas artérias da base do cérebro humano (63). A acetilcolina provoca a dilatação de segmentos da artéria cerebral média do gato em baixas concentrações, mas em concentrações altas provoca a contração da mesma. Ambos os efeitos são inibidos pelo bloqueio muscarínico com atropina (64). A influência colinérgica sobre o fluxo sangüíneo cerebral foi testada em um experimento com coelhos no qual este foi medido, no núcleo caudado, por termodiluição (65). A injeção intracarotídea do carbacol, droga colinomimética, provocou o aumento do fluxo sangüíneo no núcleo caudado, efeito este inibido em 70% a 90% pelo bloqueio muscarínico com atropina. Além disso, o carbacol inibiu a redução do fluxo sangüíneo no núcleo caudado induzida pela estimulação elétrica do gânglio cervical superior, porém este efeito não foi afetado pelo bloqueio ganglionar por hexametônio ou pela atropina. A existência de um mecanismo colinérgico não-muscarínico de inibição simpática foi proposta, em adição ao efeito muscarínico direto sobre as células da parede do vaso. O efeito vasodilatador do carbacol em várias outras regiões do cérebro do coelho, bem como a inibição deste efeito pela atropina, foi comprovado em outro estudo feito pelo mesmo grupo (66). Dois estudos realizados no gato anestesiado buscaram demonstrar a ocorrência de alterações no fluxo sangüíneo cerebral provocadas pela estimulação elétrica

ortodrômica do nervo facial previamente isolado do tronco cerebral (67, 68). No primeiro deles (67), o fluxo sanguíneo cerebral regional e a utilização de glicose foram determinadas através do uso de radiotraçador e do método da 2-deoxiglicose. Foi demonstrado um aumento generalizado do fluxo sanguíneo no córtex e na substância branca, independente da atividade metabólica cerebral, já que não houve, concomitantemente, qualquer alteração na taxa de utilização da glicose. No segundo estudo (68), a técnica da fluxometria por *laser* Doppler foi utilizada para monitorar continuamente o fluxo sanguíneo cerebral durante a estimulação elétrica ortodrômica do nervo facial, enquanto que a análise quantitativa foi realizada mais uma vez através do uso de radiotraçador. Houve aumento significativo do fluxo no córtex parietal, novamente não provocado por aumento do metabolismo, conforme demonstrado pelo aumento do conteúdo de oxigênio venoso. A mediação da resposta dilatadora por um ou mais gânglios autonômicos ficou evidente devido ao fato de que esta foi anulada por intermédio bloqueio ganglionar pelo hexametônio, fato não observado após o bloqueio muscarínico pela atropina.

A origem das fibras parassimpáticas que inervam a artéria cerebral média do gato foi demonstrada em estudo que empregou uma técnica de imunistoquímica associada a traçadores axonais. Os traçadores aplicados à artéria cerebral média foram detectados no gânglio pterigopalatino e no gânglio ótico (69), comprovando a observação de que a estimulação elétrica do nervo facial, glossofaríngeo ou vago provocava a dilatação das artériasiais [Chorobski e Penfield, *apud* Walters (69)]. Em 1984, foi demonstrada a capacidade do peptídeo intestinal vasoativo de promover o relaxamento *in vitro* das artérias cerebrais do gato e a presença de uma substância VIP-símile em vesículas pré-juncionais de neurônios perivasculares não pertencentes ao sistema simpático (70). A quantidade de fibras contendo acetilcolinesterase e/ou VIP inervando a circulação cerebral rostral do rato foi

reduzida em aproximadamente 30% após a ressecção do gânglio pterigopalatino, tanto nas grandes artérias da base do cérebro como nos pequenos vasos piais da convexidade (71), em contraste com o estudo descrito acima, envolvendo a mucosa nasal do gato, onde a redução foi de 70% a 80% (ver item 1.2). A inervação colinérgica da vasculatura pial foi demonstrada no rato através do uso de anticorpos contra a colinoacetiltransferase, sendo que as fibras contendo este marcador também foram positivas para o peptídeo intestinal vasoativo. O uso de traçador axonal retrógado aplicado na parede da artéria cerebral média indicou que estas fibras originam-se nos gânglios pterigopalatino, ótico e carotídeo interno (72). O mesmo grupo demonstrou a coexistência do neuropeptídeo Y (NPY), um neuropeptídeo característico do sistema simpático, com a colinoacetiltransferase e o VIP, em algumas fibras que inervam a artéria cerebral média do rato e que são originárias dos três gânglios acima (73). Esta coexistência deve ser interpretada, no entanto, sob a luz do conhecimento acerca da plasticidade da expressão fenotípica dos neurônios autonômicos (74, 75).

1.5 A transmissão colinérgica e os mecanismos centrais de controle do tônus vascular cerebral

A mediação colinérgica da vasodilatação cortical induzida pela estimulação do núcleo cerebelar fastigial foi estudada no rato, com o emprego do bloqueio atropínico local (76) ou sistêmico (77). Arneric e colaboradores (76) comprovaram a existência de um mecanismo vasodilatador central mediado por receptores muscarínicos localizados na vasculatura do córtex cerebral. O fluxo sanguíneo cerebral foi medido através da detecção do acúmulo de radiotraçador em diferentes áreas do córtex e do núcleo caudado. Foram comparados os valores dos animais-controle (monitorização da temperatura, pH, pO₂ e pCO₂ corticais e aplicação de veículo ou atropina no córtex) com os valores dos ratos que tiveram o núcleo

cerebelar fastigial estimulado estereotaxicamente. A estimulação do núcleo fastigial provocou um aumento significativo do FSC cortical, inibido pelo bloqueio muscarínico com atropina aplicada localmente. Esta, no entanto, não afetou o FSC cortical de repouso dos animais-controle, como também não inibiu o aumento do FSC induzido pela hipercarbia. Iadecola e colaboradores (77) demonstraram o bloqueio da resposta vasodilatadora cerebral cortical provocada pela estimulação do núcleo fastigial através da administração sistêmica de atropina, em um modelo semelhante ao descrito acima. Os autores concluíram que o efeito vasodilatador cortical da estimulação do núcleo fastigial é mediado por receptores muscarínicos e aventaram a hipótese de que a vasculatura seria inervada através de vias puramente intracerebrais. Esta hipótese foi posteriormente refutada através de um estudo imunistoquímico de fluorescência indireta dupla no qual foi demonstrada a ausência de fibras diretamente provenientes do sistema nervoso central inervando os vasos piais e a dura-máter do rato (78). Neste estudo foram utilizados anticorpos contra a periferina, uma proteína filamentar intermediária expressa em todos os neurônios cujos axônios estão localizados fora do sistema nervoso central. Os autores concluíram que, ao contrário dos neurônios e dos axônios presentes no córtex cerebral, que se mostraram positivos somente para um marcador para células nervosas maduras (a proteína filamentar de baixa massa molecular, NF-L), todas as fibras que inervam a dura-máter e os vasos piais pertencem ao sistema nervoso periférico, pois apresentaram positividade tanto para a NF-L como para a periferina. A inervação do cérebro e da dura-máter necessariamente pertenceria, portanto, a um dos três tipos de inervação periférica que se projetam para as estruturas intracranianas: as fibras simpáticas, as parassimpáticas e as sensitivas.

1.6 A inervação parassimpática colinérgica dos vasos da dura-máter

A natureza das fibras nervosas presentes na dura-máter da cobaia foi investigada em um estudo imunoistoquímico e de histofluorescência que visou demonstrar a presença de acetilcolinesterase, noradrenalina, VIP e substância P (79). As fibras contendo acetilcolinesterase e aquelas contendo noradrenalina foram encontradas em grande quantidade, ao passo que ambos os tipos de fibras peptidérgicas foram encontradas em menor número. Por outro lado, não foram realizados estudos de coexistência entre diferentes neurotransmissores em uma mesma célula. Foram detectados plexos nervosos acompanhando todos os componentes da vasculatura dural (artérias, veias e capilares) e apenas uma minoria das fibras não se encontrava próxima a algum vaso. Esta relação íntima com a vasculatura sugeriu aos autores que estas fibras tivessem uma função basicamente vasomotora, com algumas fibras tendo papel primariamente sensitivo, especialmente as fibras P-érgicas. Um estudo realizado no rato buscou descrever a origem da inervação da artéria meníngea média através da aplicação do traçador retrógrado *True blue* (TB) e da posterior reação imunoistoquímica visando a detecção de alguns neuropeptídeos (NPY, VIP, CGRP e substância P) nas células marcadas pelo TB (80). O traçador marcou células no gânglio cervical superior, no gânglio ótico, no gânglio pterigopalatino, no gânglio trigeminal e no gânglio dorsal da segunda raiz nervosa cervical (C2). Como citado, a presença de marcadores da acetilcolina não foi investigada, mas a maioria das células marcadas pelo *True blue* no gânglio pterigopalatino e no gânglio ótico mostraram-se positivas para o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o que demonstra a natureza parassimpática das fibras pós-ganglionares originárias destes gânglios e que se dirigem à vasculatura dural. Como esperado, a maior parte dos neurônios marcados no gânglio trigeminal e no gânglio dorsal de C2 foram reativos para CGRP e alguns o foram à substância P. As células do gânglio cervical superior, por sua vez, mostraram-se, na sua maioria,

positivas para o neuropeptídeo Y. Com exceção dos achados relativos ao gânglio dorsal de C2, os resultados são notavelmente similares àqueles obtidos pelos mesmos autores ao estudarem a inervação da artéria temporal superficial através desta metodologia (81). Outras evidências em favor da existência de inervação colinérgica dural proveniente do gânglio pterigopalatino foram obtidas em estudo realizado no rato, no qual a dura-máter foi dissecada e analisada após a estimulação elétrica do gânglio pterigopalatino ou após a estimulação farmacológica pelo carbacol intracarotídeo (82). O extravasamento de proteína plasmática marcada foi analisado através de microscopia por fluorescência e de fluorometria quantitativa da dura-máter, tendo sido demonstrado um incremento significativo do extravasamento de proteína plasmática – marcador de inflamação neurogênica – principalmente na proximidade dos vasos durais. Esta resposta foi praticamente restrita à dura-máter ipsilateral à estimulação elétrica e foi inexistente em ratos pré-tratados com atropina. Nos ratos estimulados com carbacol, foi observada uma resposta semelhante, inclusive no que tange ao efeito do bloqueio muscarínico com atropina. A resposta ao carbacol intracarotídeo, ao contrário do que foi observado na estimulação elétrica do gânglio pterigopalatino, foi bilateral.

A inervação da artéria meníngea média humana foi estudada detalhadamente por Edvinsson e colaboradores com a utilização de técnicas de imunoistoquímica, de microscopia eletrônica e de reatividade vasomotora (83). No estudo imunoistoquímico (ver a seguir) e histoquímico (atividade da acetilcolinesterase) foram utilizadas as artérias meníngeas médias de seis pacientes neurocirúrgicos. O marcador inespecífico para células neuronais PGP 9.5 revelou uma inervação densa na adventícia e na zona limítrofe entre esta e a camada média da parede arterial. A atividade da acetilcolinesterase e a imunorreatividade para o VIP e para o peptídeo histidina-metionina (PHM) foi notada em fibras esparsas, em contraste com a maciça presença de fibras reativas aos anticorpos para a tirosina-hidroxilase

e para o neuropeptídeo Y, demonstrando o predomínio da inervação simpática. Uma quantidade intermediária de fibras mostrou-se reativa aos anticorpos para o CGPR, à substância P e ao neuropeptídeo K. Segmentos anulares das artérias estudadas foram suspensos por ganchos ligados a um dinamômetro e submetidos a banhos com diferentes substâncias para avaliação da sua resposta contrátil. O neuropeptídeo Y e a noradrenalina causaram uma contração dos segmentos de artéria meníngea média, enquanto que os transmissores parassimpáticos acetilcolina, VIP e PHM e os transmissores sensitivos CGRP e substância P provocaram o seu relaxamento. O relaxamento induzido pela acetilcolina foi significativamente reduzido nas artérias cujo endotélio havia sido removido. Este fenômeno foi observado também no caso do relaxamento provocado pela substância P, mas não naquele provocado pelos peptídeos VIP, PHM e CGRP ou na contração associada à noradrenalina ou ao NPY. O bloqueio muscarínico com atropina provocou um deslocamento significativo da curva concentração-resposta da acetilcolina em direção a maiores concentrações desta.

2 O SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO NAS CEFALÉIAS PRIMÁRIAS

2.1 As alterações autonômicas cranianas

A ativação parassimpática craniana é nítida durante as crises de algumas das cefaléias primárias, conforme descrito no capítulo introdutório. Além disso, a existência, no período intercrítico, de uma deficiência simpática restrita à inervação ocular em uma parte dos pacientes com cefaléia em salvas foi constatada de forma consistente por estudos de avaliação da função pupilar (84-86). No entanto, tanto o déficit simpático observado durante as crises de cefaléia em salvas quanto o déficit simpático residual presente no período intercrítico (87) são considerados como

tendo natureza pós-ganglionar e são atribuídos à compressão das fibras simpáticas que envolvem a artéria carótida interna no seu trajeto através do canal carotídeo. Esta compressão seria causada pela vasodilatação carotídea induzida, durante as crises, pela ativação parassimpática craniana (86, 88). Cabe a lembrança de que estudos farmacológicos detalhados da função pupilar em pacientes com cefaléia em salvas não demonstraram um padrão típico de lesão simpática de primeiro, segundo ou terceiro neurônios, levando os autores a considerar a disfunção simpática como um quadro “Horner-símile” (89, 90).

2.2 O equilíbrio autonômico nos indivíduos portadores de migrânea e de cefaléia em salvas

O equilíbrio autonômico sistêmico dos indivíduos portadores de migrânea ou de cefaléia em salvas durante o período intercrítico foi objeto de vários estudos, realizados com metodologia variada e produziram resultados conflitantes, sem que um padrão de disfunção autonômica sistêmica característico destas doenças tenha sido identificado (91). Estes estudos basearam-se na testagem de reflexos cardiovasculares ou na análise dos resultados da monitorização do ritmo cardíaco e da pressão arterial por períodos prolongados, empregando técnicas de análise espectral.

2.2.1 Testagem de reflexos cardiovasculares

Em um estudo transversal aberto controlado, 188 pacientes com migrânea e oitenta e cinco indivíduos-controle foram investigados através de testes da função autonômica cardiovascular (respiração profunda, manobra de Valsalva, teste da inclinação, preensão manual sustentada) (92). Os parâmetros dos quatro testes mostraram-se reduzidos nos pacientes com migrânea, sugerindo hipoatividade simpática e parassimpática, mais intensa nos pacientes com crises freqüentes. Em outro estudo transversal, envolvendo pacientes com migrânea, pacientes com

cefaléia em salvas e controles, foi realizada a avaliação de cinco diferentes reflexos autonômicos cardiovasculares (93). Os pacientes com migrânea apresentaram resultados alterados em duas provas de função simpática (teste da hipotensão postural e teste da resposta pressórica à preensão manual sustentada) e em uma prova de função parassimpática (teste da respiração profunda). Nos pacientes com cefaléia em salvas, foi detectada uma diminuição da resposta cronotrópica no teste da respiração profunda. Os autores propuseram a existência de uma disfunção intercristica simpática na migrânea e parassimpática na cefaléia em salvas. No entanto, a definição arbitrária dos valores considerados normais e a escolha dos controles entre o *staff* hospitalar tornam difícil a generalização dos resultados. Em outro estudo, a resposta pupilar ao estímulo doloroso do nervo sural mostrou-se reduzida de forma unilateral em pacientes com cefaléia em salvas episódica (durante o período ativo, porém fora de crise) e de forma bilateral em pacientes com cefaléia em salvas crônica (94). Metodologia e resultados semelhantes haviam sido previamente descritos pelo mesmo grupo, no relato de um estudo que envolveu pacientes portadores de migrânea (95). Os autores concluíram haver evidências da existência de um desequilíbrio neurovegetativo central nestas doenças, consistindo em hiperatividade simpática ou hipoatividade parassimpática. Treze pacientes do sexo feminino portadoras de migrânea sem aura e dezoito controles do mesmo sexo e idade foram submetidas a vários testes autonômicos, fisiológicos e farmacológicos: teste da inclinação, manobra de Valsalva, respiração profunda, preensão manual sustentada, resfriamento da face, infusão de noradrenalina e infusão de clonidina (96). As pacientes portadoras de migrânea sem aura apresentaram valores diferentes do grupo controle apenas em relação à frequência cardíaca basal, à alteração da pressão arterial diastólica durante o teste do resfriamento da face e à alteração da pressão sistólica durante o teste da preensão manual sustentada. Os autores concluíram que, apesar de haver uma leve

hiperatividade simpática basal nos pacientes com migrânea sem aura, seu tônus simpático e parassimpático centrais e o seu controle autonômico cardiovascular são normais. Em um estudo envolvendo 38 crianças com diagnóstico de síndrome periódica da infância, considerada uma precursora da migrânea, os resultados de testes da função cardiovascular autonômica (respiração profunda, manobra de Valsalva, ortostatismo e preensão manual sustentada) foram comparados com valores-padrão (97). Apenas um dentre onze parâmetros esteve alterado no grupo estudado (alteração na oscilação da frequência cardíaca no ortostatismo), sendo considerado um achado de importância secundária. A investigação de cinquenta e seis pacientes com migrânea e de trinta e um indivíduos-controle, com relação à análise espectral do intervalo R-R e da pressão diastólica durante o teste do ortostatismo, além da testagem convencional de reflexos cardiovasculares (teste da inclinação, manobra de Valsalva, respiração profunda e ortostatismo) não evidenciou diferenças entre os dois grupos (98).

2.2.2 Monitorização prolongada do ritmo cardíaco e da pressão arterial

A monitorização eletrocardiográfica de vinte e sete portadores de migrânea e de vinte e quatro voluntários saudáveis durante quarenta e oito horas, seguida pela análise espectral das flutuações do ritmo cardíaco demonstrou a existência de hipofunção parassimpática no grupo de pacientes com migrânea em relação ao grupo controle (99).

3 OS MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES DA DURA-MÁTER

3.1 Microscopia *in vivo*

Esta foi a técnica empregada no experimento que será exposto na forma de artigo científico, mais adiante, tendo sido este realizado de acordo com as rotinas descritas por Williamson (100). O procedimento de terminação da anestesia obedeceu as recomendações da literatura específica (101) (ver Anexo I). Desde a sua divulgação, em 1997, esta metodologia tem sido útil para a compreensão da farmacologia da vasodilatação dural e das medicações utilizadas no tratamento da migrânea e da cefaléia em salvas (102). Consiste no monitoramento *in vivo* do diâmetro de um ramo da artéria meníngea média do rato anestesiado, através do osso parietal adelgado mas não perfurado (“janela craniana”), com o uso de um microscópio intravital (ver Figura 3, pág. 38), permitindo o estudo do efeito de diferentes fármacos administrados sistemicamente (103). A aplicação de estímulos elétricos de curta duração e baixa intensidade através de um eletrodo bipolar apostado à superfície da “janela craniana”, próximo ao vaso de interesse, resultou em um modelo experimental de vasodilatação neurogênica (ver Figura 4, pág. 38) que apresenta algumas vantagens teóricas em relação a outros modelos animais de migrânea (104-106).

Figura 3 - Artéria da dura-máter do rato anestesiado antes (a) e depois (b) da administração intravenosa de substância P, visualizada através da microscopia *in-vivo* da janela craniana fechada. Extraído da referência (103).

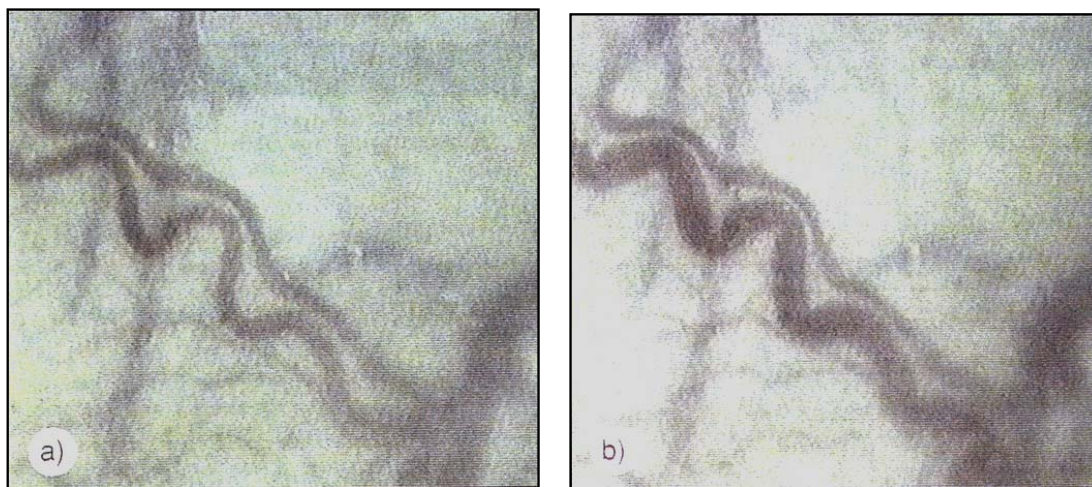
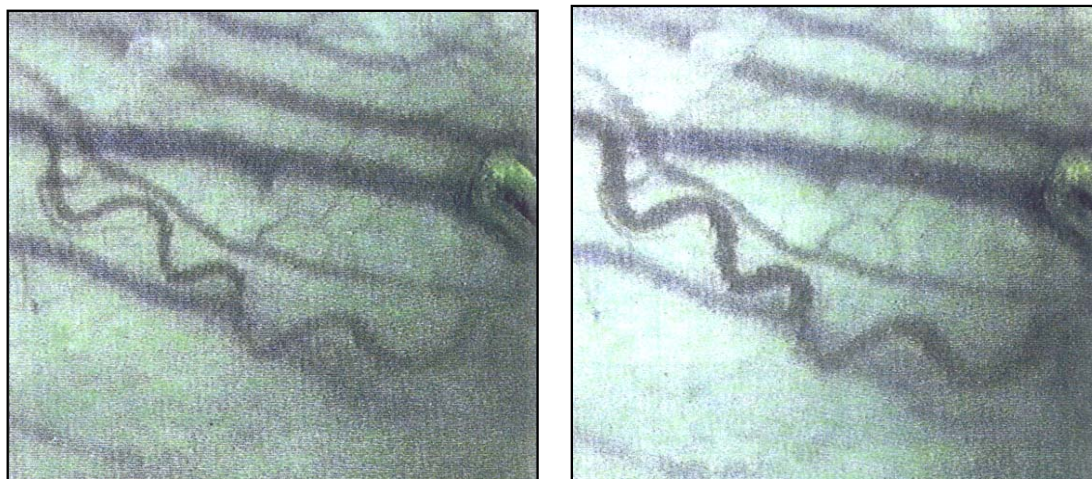


Figura 4 - Artéria da dura-máter do rato anestesiado antes (E) e depois (D) da aplicação de estímulo elétrico de curta duração e baixa intensidade, visualizada através da microscopia *in-vivo* a janela craniana fechada. Extraído da referência (104).



3.2 Fluxometria por *laser* Doppler

O conceito de vasodilatação neurogênica foi aplicado em um estudo onde o estímulo elétrico vasodilatador foi aplicado diretamente sobre a dura-máter, junto aos ramos da artéria meníngea média, após a realização de craniotomia parietal

(107). A vasodilatação dural, no entanto, foi inferida a partir do aumento do fluxo sanguíneo detectado por um sensor de *laser* Doppler justaposto a um vaso. A produção de dor pela distensão da parede dos vasos durais e o caráter pulsátil freqüente da dor na migrânea sugerem que esta distensão esteja envolvida na crise migranosa (12). Nesse contexto, o registro do fluxo sanguíneo oferece uma medida indireta do fenômeno da vasodilatação dural, podendo ser influenciado por fatores como velocidade e concentração celulares, pressão de perfusão e fluxo dos vasos piais e cerebrais (103, 105). A abertura da caixa craniana, por sua vez, propicia a ocorrência de edema cerebral e alteração na pressão intracraniana. Apesar de resultados semelhantes terem sido obtidos com os dois métodos (108, 109), o método da microscopia *in vivo* apresenta as vantagens de avaliar de modo direto a vasodilatação dural e de preservar o ambiente intracraniano e a reatividade vascular.

3.3 Inflamação dural neurogênica

O modelo da inflamação neurogênica mede a presença de albumina iodada ou de corante na dura-máter e nos lábios, no rato ou na cobaia, após a estimulação elétrica ou química do gânglio trigeminal. Esta estimulação provoca o extravasamento de plasma na dura-máter, possivelmente pela liberação antidrômica de neuropeptídeos causada pela despolarização de fibras C trigeminais (110). Em virtude da eficácia dos ergóticos, neste modelo, em bloquear a inflamação neurogênica (111), esta foi proposta como um componente importante do mecanismo fisiopatológico da migrânea e da cefaléia em salvas (112). No entanto, o uso deste modelo na investigação farmacológica da migrânea, bem como o papel atribuído à inflamação neurogênica na fisiopatologia desta, sofreu críticas importantes após a demonstração da ineficácia clínica de inibidores potentes da inflamação neurogênica no tratamento da migrânea (102).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos deste experimento são:

- a) testar, utilizando um método de visão direta e registro quantitativo, a hipótese de que a acetilcolina provoca a dilatação dos vasos da dura-máter no rato anestesiado;
- b) em sendo confirmada a hipótese acima, definir o tipo de receptor colinérgico responsável por este efeito;
- c) através do uso da estimulação elétrica da superfície craniana do rato e da técnica de registro do diâmetro vascular dural citada acima, reproduzir um modelo experimental de vasodilatação neurogênica e testar a hipótese de que esta seja mediada, em parte, pela acetilcolina.

REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA)

REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA)

1. Queiroz LP. Um estudo epidemiológico de cefaléia no Distrito Sede do Município de Florianópolis [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2001.
2. Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. Epidemiology of headache in a general population--a prevalence study. *J Clin Epidemiol* 1991;44(11):1147-57.
3. Barea LM, Tannhauser M, Rotta NT. An epidemiologic study of headache among children and adolescents of southern Brazil. *Cephalalgia* 1996;16(8):545-9.
4. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders - 2nd ed. *Cephalalgia* 2004;24(Suppl 1):1-54.
5. Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* 2001;41(7):646-57.
6. Osterhaus JT, Gutterman DL, Plachetka JR. Healthcare resource and lost labour costs of migraine headache in the US. *Pharmacoeconomics* 1992;2(1):67-76.
7. Rasmussen BK. Epidemiology of headache. *Cephalalgia* 2001;21(7):774-7.

8. Vincent M, Rodrigues AJ, De Oliveira GV, De Souza KF, Doi LM, Rocha MB, et al. [Prevalence and indirect costs of headache in a Brazilian Company]. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56(4):734-43.
9. Steiner TJ, Scher AI, Stewart WF, Kolodner K, Liberman J, Lipton RB. The prevalence and disability burden of adult migraine in England and their relationships to age, gender and ethnicity. *Cephalalgia* 2003;23(7):519-27.
10. Matharu MS, Goadsby PJ. Trigeminal autonomic cephalgias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72(Suppl II):II19-II26.
11. Olesen J, Larsen B, Lauritzen M. Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann Neurol* 1981;9(4):344-52.
12. Wolff HG. *Headache and Other Head Pain*. First ed. New York: Oxford University Press; 1948.
13. Goadsby PJ. Pathophysiology of Migraine: A Disease of the Brain. In: Goadsby PJ, Silberstein SD, editors. *Headache*. Boston: Butterworth-Heinemann; 1997. p. 5-24.
14. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine - current understanding and treatment. *N Engl J Med* 2002;346(4):257-70.
15. Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med* 1994;331(25):1689-92.

16. Weiller C, May A, Limmroth V, Juptner M, Kaube H, Schayck RV, et al. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* 1995;1(7):658-60.
17. May A, Bahra A, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Hypothalamic activation in cluster headache attacks. *Lancet* 1998;352(9124):275-8.
18. Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet* 2001;357(9261):1016-7.
19. May A, Bahra A, Buchel C, Turner R, Goadsby PJ. Functional magnetic resonance imaging in spontaneous attacks of SUNCT: short-lasting neuralgiform headache with conjunctival injection and tearing. *Ann Neurol* 1999;46(5):791-4.
20. Cao Y, Welch KM, Aurora S, Vikingstad EM. Functional MRI-BOLD of visually triggered headache in patients with migraine. *Arch Neurol* 1999;56(5):548-54.
21. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, et al. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(8):4687-92.
22. Cao Y, Aurora SK, Nagesh V, Patel SC, Welch KM. Functional MRI-BOLD of brainstem structures during visually triggered migraine. *Neurology* 2002;59(1):72-8.
23. May A, Ashburner J, Buchel C, McGonigle DJ, Friston KJ, Frackowiak RS, et al. Correlation between structural and functional changes in brain in an idiopathic headache syndrome. *Nat Med* 1999;5(7):836-8.

24. May A. Headache: lessons learned from functional imaging. *Br Med Bull* 2003;65:223-34.
25. Matharu MS, Boes CJ, Goadsby PJ. Management of trigeminal autonomic cephalgias and hemicrania continua. *Drugs* 2003;63(16):1637-77.
26. Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in the cerebral circulation: relevance to headache. *Cephalalgia* 1995;15:272-278.
27. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain* 1994;117 (Pt 3):427-34.
28. Fanciullacci M, Alessandri M, Figini M, Geppetti P, Michelacci S. Increase in plasma calcitonin gene-related peptide from extracerebral circulation during nitroglycerin-induced cluster headache attack. *Pain* 1995;60:119-123.
29. Goadsby PJ, Edvinsson L. Neuropeptide changes in a case of chronic paroxysmal hemicrania - evidence for trigemino-parasympathetic activation. *Cephalalgia* 1996;16(6):448-50.
30. Edvinsson L, Ekman R. Distribution and dilatory effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebral vessels. *Peptides* 1984;5:329-331.
31. Hara H, Jansen I, Ekman R, Hamel E, Mackenzie ET, Uddman R, et al. Acetylcholine and vasoactive intestinal peptide in cerebral blood vessels: effect of extirpation of the sphenopalatine ganglion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:204-211.
32. Barbanti P, Fabbrini G, Pesare M, Vanacore N, Cerbo R. Unilateral cranial autonomic symptoms in migraine. *Cephalalgia* 2002;22(4):256-9.

33. Goadsby PJ. The pharmacology of headache. *Prog Neurobiol* 2000;62(5):509-25.
34. May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19(2):115-27.
35. Goadsby PJ, Matharu MS, Boes CJ. SUNCT syndrome or trigeminal neuralgia with lacrimation. *Cephalalgia* 2001;21:82-83.
36. Silberstein SD, Lipton RB, Goadsby PJ. *Headache in Clinical Practice*. 2nd ed. London: Martin Dunitz; 2002.
37. Blau JN. Migraine prodromes separated from the aura: complete migraine. *Br Med J* 1980;281(6241):658-60.
38. Waelkens J. Warning symptoms in migraine: characteristics and therapeutic implications. *Cephalalgia* 1985;5(4):223-8.
39. Giffin NJ, Ruggiero L, Lipton RB, Silberstein SD, Tvedskov JF, Olesen J, et al. Premonitory symptoms in migraine: an electronic diary study. *Neurology* 2003;60(6):935-940.
40. Lipton RB, Hamelsky SW, Stewart WF. Epidemiology and impact of headache. In: Silberstein SD, Lipton RB, Dalessio DJ, editors. *Wolff's Headache and Other Head Pain*. 7th ed. New York: Oxford University Press; 2001. p. 85-107.
41. Ekblom K, Hardebo JE. Cluster headache: aetiology, diagnosis and management. *Drugs* 2002;62(1):61-9.

42. Rasmussen BK. Epidemiology of cluster headache. In: Olesen J, Goadsby PJ, editors. Cluster Headache and Related Conditions. New York: Oxford University Press; 1999. p. 23-6.
43. Sjaastad O, Dale I. Evidence for a new (?), treatable headache entity. Headache 1974;14(2):105-8.
44. Antonaci F, Sjaastad O. Chronic paroxysmal hemicrania (CPH): a review of the clinical manifestations. Headache 1989;29(10):648-56.
45. Sjaastad O, Saunte C, Salvesen R, Fredriksen TA, Seim A, Roe OD, et al. Shortlasting unilateral neuralgiform headache attacks with conjunctival injection, tearing, sweating, and rhinorrhea. Cephalalgia 1989;9(2):147-56.
46. Newman, Goadsby PJ. Unusual Primary Headache Disorders. In: Silberstein SD, Lipton RB, Dalessio DJ, editors. Wolff's Headache and Other Head Pain. 7th ed. New York: Oxford University Press; 2001. p. 310-21.
47. Pareja JA. SUNCT syndrome: the clinical picture. In: Olesen J, Goadsby PJ, editors. Cluster Headache and Related Conditions. New York: Oxford University Press; 1999. p. 71-77.
48. Testut L, Latarjet A. Tratado de Anatomia Humana. Novena ed. Barcelona: Salvat Editores; 1979.
49. Martin J. Neuroanatomy Text and Atlas. 2nd ed. Stamford: Appleton & Lange; 1996.
50. Kiernan JA. Barr's The Human Nervous System - An Anatomical Viewpoint. 7th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1998.

51. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of Neural Science. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
52. Suzuki N, Hardebo JE, Skagerberg G, Owman C. Central origins of preganglionic fibers to the sphenopalatine ganglion in the rat. A fluorescent retrograde tracer study with special reference to its relation to central catecholaminergic systems. *J Auton Nerv Syst* 1990;30(2):101-9.
53. Ruskell GL. Facial parasympathetic innervation of the choroidal blood vessels in monkeys. *Exp Eye Res* 1971;12(2):166-72.
54. Lundberg JM, Anggard A, Emson P, Fahrenkrug J, Hokfelt T. Vasoactive intestinal polypeptide and cholinergic mechanisms in cat nasal mucosa: studies on choline acetyltransferase and release of vasoactive intestinal polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(8):5255-9.
55. Suzuki N, Hardebo JE, Owman C. Origins and pathways of cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide-positive nerves in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8(5):697-712.
56. Seylaz J, Hara H, Pinard E, Mraovitch S, MacKenzie ET, Edvinsson L. Effect of stimulation of the sphenopalatine ganglion on cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8(6):875-8.
57. Carvalho VC. Nerve cells in the human cavernous sinus. *Anat Anz* 1985;159:29-32.
58. Ruskell GL, Simons T. Trigeminal nerve pathways to the cerebral arteries in monkeys. *J Anat* 1987;155:23-37.

59. Hardebo JE, Arbab M, Suzuki N, Svendgaard NA. Pathways of parasympathetic and sensory cerebrovascular nerves in monkeys. *Stroke* 1991;22(3):331-42.
60. Suzuki N, Hardebo JE. Anatomical basis for a parasympathetic and sensory innervation of the intracranial segment of the internal carotid in man. Possible implication for vascular headache. *J Neurol Sci* 1991;104:19-31.
61. Motavkin PA, Vlasov GS, Palashchenko LD. A comparative characteristic of effector innervation of cerebral arteries in mammals and humans. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1975;23(2):157-64.
62. Lee TJ, Su C, Bevan JA. Nonsympathetic dilator innervation of cat cerebral arteries. *Experientia* 1975;31(12):1424-6.
63. Borodulya AV, Pletchkova EK. Cholinergic innervation of vessels of the base of the brain. *Acta Anat (Basel)* 1976;96(1):135-47.
64. Edvinsson L, Falck B, Owman C. Possibilities for a cholinergic action on smooth musculature and on sympathetic axons in brain vessels mediated by muscarinic and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1977;200(1):117-26.
65. Aubineau P, Sercombe R. Evidence for a double cholinergic mechanism capable of reducing the tone of cerebral arteries. *Acta Neurol Scand Suppl* 1977;64:296-7.
66. Reynier-Rebuffel AM, Lacombe P, Aubineau P, Sercombe R, Seylaz J. Multiregional cerebral blood flow changes induced by a cholinomimetic drug. *Eur J Pharmacol* 1979;60:237-240.

67. Goadsby PJ. Effect of stimulation of facial nerve on regional cerebral blood flow and glucose utilization in cats. *Am J Physiol* 1989;257(3 Pt 2):R517-21.
68. Goadsby PJ. Characteristics of facial nerve-elicited cerebral vasodilatation determined using laser Doppler flowmetry. *Am J Physiol* 1991;260(1 Pt 2):R255-62.
69. Walters BB, Gillespie SA, Moskowitz MA. Cerebrovascular projections from the sphenopalatine and otic ganglia to the middle cerebral artery of the cat. *Stroke* 1986;17(3):488-94.
70. Lee TJ, Saito A, Berezin I. Vasoactive intestinal polypeptide-like substance: the potential transmitter for cerebral vasodilation. *Science* 1984;224(4651):898-901.
71. Hara H, Jansen I, Ekman R, Hamel E, MacKenzie ET, Uddman R, et al. Acetylcholine and vasoactive intestinal peptide in cerebral blood vessels: effect of extirpation of the sphenopalatine ganglion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9(2):204-11.
72. Suzuki N, Hardebo JE, Owman C. Origins and pathways of choline acetyltransferase-positive parasympathetic nerve fibers to cerebral vessels in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10(3):399-408.
73. Suzuki N, Hardebo JE, Kahrstrom J, Owman C. Neuropeptide Y co-exists with vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine in parasympathetic cerebrovascular nerves originating in the sphenopalatine, otic, and internal carotid ganglia of the rat. *Neuroscience* 1990;36(2):507-19.

74. Zigmond RE, Hyatt-Sachs H, Baldwin C, Qu XM, Sun Y, McKeon TW, et al. Phenotypic plasticity in adult sympathetic neurons: changes in neuropeptide expression in organ culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(4):1507-11.
75. Zigmond RE, Sun Y. Regulation of neuropeptide expression in sympathetic neurons. Paracrine and retrograde influences. *Ann N Y Acad Sci* 1997;814:181-97.
76. Americ SP, Iadecola C, Underwood MD, Reis DJ. Local cholinergic mechanisms participate in the increase in cortical cerebral blood flow elicited by electrical stimulation of the fastigial nucleus in rat. *Brain Res* 1987;411(2):212-225.
77. Iadecola C, Underwood MD, Reis DJ. Muscarinic cholinergic receptors mediate the cerebrovasodilation elicited by stimulation of the cerebellar fastigial nucleus in rat. *Brain Res* 1986;368(2):375-9.
78. Mathiau P, Escurat M, Aubineau P. Immunohistochemical evidence for the absence of central neuron projection to pial blood vessels and dura mater. *Neuroscience* 1993;52(3):667-76.
79. Edvinsson L, Uddman R. Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibres in dura mater involvement in headache? *Cephalalgia* 1981;1:175-179.
80. Uddman R, Hara H, Edvinsson L. Neuronal pathways to the rat middle meningeal artery revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. *J Auton Nerv Syst* 1989;26(1):69-75.
81. Uddman R, Edvinsson L, Hara H. Axonal tracing of autonomic nerve fibers to the superficial temporal artery in the rat. *Cell Tissue Res* 1989;256(3):559-65.

82. Delepine L, Aubineau P. Plasma protein extravasation induced in the rat dura mater by stimulation of the parasympathetic sphenopalatine ganglion. *Exp Neurol* 1997;147(2):389-400.
83. Edvinsson L, Gulbenkian S, Barroso CP, Cunha e Sa M, Polak JM, Mortensen A, et al. Innervation of the human middle meningeal artery: immunohistochemistry, ultrastructure, and role of endothelium for vasomotility. *Peptides* 1998;19(7):1213-25.
84. Fanciullacci M, Pietrini U, Gatto G, Boccuni M, Sicuteri F. Latent dysautonomic pupillary lateralization in cluster headache. A pupillometric study. *Cephalalgia* 1982;2(3):135-44.
85. Drummond PD. Dysfunction of the sympathetic nervous system in cluster headache. *Cephalalgia* 1988;8(3):181-6.
86. Drummond P. Autonomic disturbances in cluster headache. *Brain* 1988;111(5):1199-1209.
87. Sjaastad O, Salvesen R, Antonaci F. The sweating anomaly in cluster headache. Further observations on the underlying mechanism. *Cephalalgia* 1987;7(1):77-81.
88. Goadsby PJ. Pathophysiology of cluster headache: a trigeminal autonomic cephalgia. *Lancet Neurol* 2002;1(4):251-7.
89. Salvesen R, Bogucki A, Wysocka-Bakowska MM, Antonaci F, Fredriksen TA, Sjaastad O. Cluster headache pathogenesis: a pupillometric study. *Cephalalgia* 1987;7(4):273-84.

90. Salvesen R, Sand T, Sjaastad O. Cluster headache: combined assessment with pupillometry and evaporimetry. *Cephalalgia* 1988;8(3):211-8.
91. Janig W. Relationship between pain and autonomic phenomena in headache and other pain conditions. *Cephalalgia* 2003;23 Suppl 1:43-8.
92. Havanka-Kanniainen H, Tolonen U, Myllyla VV. Autonomic dysfunction in migraine: a survey of 188 patients. *Headache* 1988;28(7):465-70.
93. Boiardi A, Munari L, Milanese I, Paggetta C, Lamperti E, Bussone G. Impaired cardiovascular reflexes in cluster headache and migraine patients: evidence for an autonomic dysfunction. *Headache* 1988;28(6):417-22.
94. Micieli G, Magri M, Sandrini G, Tassorelli C, Nappi G. Pupil responsiveness in cluster headache: a dynamic TV pupillometric evaluation. *Cephalalgia* 1988;8(3):193-201.
95. Micieli G, Tassorelli C, Magri M, Sandrini G, Cavallini A, Nappi G. Vegetative imbalance in migraine. A dynamic TV pupillometric evaluation. *Funct Neurol* 1989;4(1):105-11.
96. Cortelli P, Pierangeli G, Parchi P, Contin M, Baruzzi A, Lugaresi E. Autonomic nervous system function in migraine without aura. *Headache* 1991;31(7):457-62.
97. Meossi C, Domenici R, Saponati G, Castelli S. Autonomic neural functioning in children with the periodic syndrome. *Pediatr Med Chir* 1993;15(4):361-5.
98. Pierangeli G, Parchi P, Barletta G, Chiogna M, Lugaresi E, Cortelli P. Power spectral analysis of heart rate and diastolic blood pressure variability in migraine with and without aura. *Cephalalgia* 1997;17(7):756-60.

99. Tabata M, Takeshima T, Burioka N, Nomura T, Ishizaki K, Mori N, et al. Cosinor analysis of heart rate variability in ambulatory migraineurs. *Headache* 2000;40(6):457-63.
100. Williamson DJ. *Physiology and Pharmacology of Experimental Vasodilation in the Dura Mater* [Tese]: University of Hertfordshire; 2000.
101. Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.
102. De Vries P, Villalon CM, Saxena PR. Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy [published erratum appears in *Eur J Pharmacol* 1999 Nov 19;384(2-3):243-4]. *Eur J Pharmacol* 1999;375(1-3):61-74.
103. Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG, Shephard SL. Intravital microscope studies on the effects of neurokinin agonists and calcitonin gene-related peptide on dural vessel diameter in the anaesthetized rat. *Cephalalgia* 1997;17(4):518-24.
104. Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG, Shephard SL. Sumatriptan inhibits neurogenic vasodilation of dural blood vessels in the anaesthetized rat - intravital microscope studies. *Cephalalgia* 1997;17(4):525-31.
105. Williamson DJ, Shephard SL, Hill RG, Hargreaves RJ. The novel anti-migraine agent rizatriptan inhibits neurogenic dural vasodilation and extravasation. *Eur J Pharmacol* 1997;328(1):61-4.
106. Shepherd SL, Williamson DJ, Beer MS, Hill RG, Hargreaves RJ. Differential effects of 5-HT_{1B/1D} receptor agonists on neurogenic dural plasma

- extravasation and vasodilation in anaesthetized rats. *Neuropharmacology* 1997;36(4-5):525-33.
107. Kurosawa M, Messlinger K, Pawlak M, Schmidt RF. Increase of meningeal blood flow after electrical stimulation of rat dura mater encephali: mediation by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol* 1995;114(7):1397-402.
108. Dux M, Schwenger N, Messlinger K. Possible role of histamine in the regulation of meningeal blood flow and vascular permeability. *Cephalalgia* 2000;20:418.
109. Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ. The role of histamine in dural vessel dilation. *Brain Research* 2002;956:96-102.
110. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci* 1987;7(12):4129-36.
111. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated plasma extravasation in dura mater: effect of ergot alkaloids. A possible mechanism of action in vascular headache. *Cephalalgia* 1988;8(2):83-91.
112. Moskowitz MA. Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology* 1993;43(6 Suppl 3):S16-20.

ARTIGO CIENTÍFICO (VERSÃO EM LÍNGUA INGLESA)

**Neurogenic Vasodilation of Dural Blood Vessels is Not Mediated
by Cholinergic Transmission in the Anaesthetised Rat***

Fernando Kowacs, David J. Williamson† and Peter J Goadsby‡

Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

† Merck Sharp & Dohme Research Laboratories
Neuroscience Research Centre
Terlings Park, UK

‡ Headache Group
Institute of Neurology
Queen Square
London UK

*Presented in abstract form at the 10th Congress of the International Headache Society, New York US, 29 June-2 July 2001 (1) and submitted for publication in the European Journal of Pharmacology.

Address for correspondence:

Fernando Kowacs
Av. João Obino, 285
Porto Alegre - Brasil
90470-150
Fone/Fax: + 55 51 3334-5110
Email: fkowacs@yahoo.com

Abstract

Introduction - Dural vessel dilation induced by activation of trigeminal sensory fibres may be responsible for some component of the migraine attack. The presence in some patients with migraine and cluster headache of clinical features, such as lacrimation, suggests cranial parasympathetic activation and poses the question as to whether neurogenic meningeal dilatation has a cholinergic component.

Methods - Rats were prepared in order to record on-line the diameter of a middle meningeal artery branch through a closed cranial window using an intravital microscope coupled to a video dimension analyser. Acetylcholine (ACh; 1 μ g, IV) was administered before and after muscarinic blockade ($n = 5$) with scopolamine (2 mg/kg, IV) or nicotinic blockade ($n = 6$) with mecamylamine (4 mg/kg, IV). Further vasodilation was induced by electrical stimulation of the cranial window surface before and after muscarinic blockade with IV scopolamine ($n = 9$).

Results - The mean dural vessel diameter percentage increase caused by acetylcholine stimulation was significantly different before and after muscarinic blockade ($P = 0.045$), and the post blockade values were not different than those obtained after vehicle infusion ($P = 0.431$). In contrast, nicotinic blockade did not change ACh effect ($P = 0.688$). In the second experiment, where the effect of muscarinic blockade on the neurogenic dilation model was assessed, no significant difference was demonstrated ($P = 0.538$).

Conclusions - Cholinergic dilation of the rat dural arteries is mediated by muscarinic receptors, but this mechanism does not play a significant role in the rat dural vessel dilation induced by closed cranial window electrical stimulation.

Key Words: intravital microscopy, migraine, cluster headache.

1. Introduction

Migraine is a common neurological condition with a prevalence of 12% on Western populations (2, 3) that causes substantial disability (4) for its most affected sufferers. Cluster headache is less common but no less disabling (5). Both conditions are considered to be primarily disorders of the brain with peripheral neurally driven, neurovascular, changes (5, 6). A proportion of migraine sufferers present with cranial parasympathetic autonomic activation that is most prominent on the so-called Trigeminal Autonomic Syndromes (7).

Trigeminovascular activation, or at least the perception of trigeminovascular activation, is likely to be a key component of the pathophysiology of both migraine and cluster headache. Furthermore, many patients report cranial autonomic activation clinically manifest symptoms, such as lacrimation, conjunctival injection, or nasal stuffiness. Cholinergic influences on the trigeminovascular system have not been widely studied. The key components of dural neurogenic inflammation are well understood in terms of antidromic trigeminal activation (8). Parasympathetic activation may play a role in the mechanisms of action of valproate in the neurogenic inflammation model (9), and in the link between dural inflammation, spreading depression and trigeminal activation (10). It is noteworthy that direct stimulation of the major cranial parasympathetic outflow ganglion, the sphenopalatine ganglion, can produce neurogenic dural plasma extravasation (11). Moreover, stimulation of the major cranial parasympathetic nerve outflow, the VIIth cranial nerve (facial nerve), is mediated by a nicotinic, hexamethonium-sensitive synapse (12) in the sphenopalatine ganglion (13, 14), and produces increases in cerebral blood flow without concomitant changes in cerebral metabolism (15).

In this study we sought to examine dural neurogenic vasodilator mechanisms *in vivo*. Williamson and colleagues (16) developed an intravital microscopy technique that allows continuous observation of dural blood vessels so any changes in meningeal vessel diameter during intravenous administration of drugs can be observed. This technique also allows direct observation of changes in meningeal vessel diameter during dural electrical depolarisation of trigeminal fibres known in humans to be pain-producing (17), providing a means of studying trigeminovascular dural pharmacology *in vivo*.

2. Materials and Methods

2.1 Surgical preparation

Male Sprague-Dawley rats (mean \pm standard deviation weight for the ACh-induced vasodilation group: 369 ± 21 g, and for the neurogenic vasodilation group: 331 ± 17 g) were anaesthetised throughout the experiments with sodium pentobarbitone (60 mg/kg i.p. and then 18 mg/kg/h - i.v. infusion) and ventilated through tracheal cannula. The left femoral artery and vein were cannulated for blood pressure recording and intravenous infusion of anaesthetic, respectively. Temperature was maintained using a homeothermic system, consisting in a rectal probe and a thermic blanket. The rats were placed in a stereotactic frame, the skull exposed and the right parietal bone thinned by drilling with a saline-cooled drill until the blood vessels of the dura mater were clearly visible through the thinned skull. All procedures were performed according to the "Animals (Scientific Procedures) Act 1986".

2.2 Intravital microscopy

The cranial window was covered with mineral oil (37°C) and a branch of the middle meningeal artery viewed using an intravital microscope (Microvision MV2100, UK) and the image displayed on a television monitor. Dural blood vessel diameter was continuously measured using a video dimension analyser (Living Systems Instrumentation, USA) and displayed with blood pressure on a chart recorder and a data analysis system (MI², Modular Instruments, UK).

2.3 Experimental protocols

2.3.1 Defining electrical stimulation parameters

In the preparations where electrical stimulation was used to provoke dilation of the dural blood vessels a bipolar stimulating electrode (NE 200X, Clark Electromedical) was placed on the surface of the cranial window approximately 200 µm from the vessel of interest. The surface of the cranial window was stimulated with pulses of 1 ms duration, at 5 Hz, for 10 s (Grass Stimulator S88, Grass Instrumentation) with increasing voltage until maximal dilation was observed. Subsequent electrically induced responses in the same animal were then evoked using that voltage (16). In control experiments the reproducibility of the neurogenic vasodilator response to four consecutive stimuli was tested in order to determine whether there was any systematic effect over time that might confound the experimental results.

2.3.2 Pharmacological interventions

In the first experiment, acetylcholine (ACh; 1 µg – 10 µg, IV) was administered three times at 5 min intervals in order to assess the consistency of the ACh-induced vasodilation. ACh administration was then repeated twice after muscarinic blockade

with scopolamine (1 mg/kg, IV) or nicotinic blockade with intravenous mecamylamine (4 mg/kg) were done. In the second experiment, vasodilation was induced by electric stimulation with a bipolar electrode placed on the surface of the cranial window near the vessel (5 Hz, 1 ms, 10 s) before and after muscarinic blockade with intravenous scopolamine. Nicotinic blockade was not used in this second experiment because it did not alter the response to ACh in the first series.

2.4 Statistical analysis

The effect of ACh infusion and cranial surface electrical stimulation on dural vessel diameter was calculated as the maximum percentage increase in relation to baseline. Student's t-test for paired samples was used to compare the means of the values obtained before and after the cholinergic blockade and differences were considered significant when $P < 0.05$. Summary data are presented as mean \pm SEM unless indicated.

3. Results

Animals included in the final analysis had normal arterial blood pressure levels. Saline vehicle had no significant effect on dural vessel diameter when tested in animals subsequently receiving ACh in either the mecamylamine ($3 \pm 1.5\%$, $n = 6$) or scopolamine groups ($2 \pm 1.4\%$, $n = 5$).

Acetylcholine-induced dural vasodilation - *nicotinic involvement*

The dural vessel control vasodilation induced by acetylcholine (ACh) was 60 ± 13.6 % ($n = 6$). The response to ACh after nicotinic blockade with mecamylamine was 55 ± 10.8 %. This was not statistically different from the control response ($t_5 = 0.43$, $P = 0.688$; Figure 1).

Acetylcholine-induced dural vasodilation - *muscarinic involvement*

Acetylcholine (ACh) induced a dural vessel control vasodilation of 98 ± 31.0 % ($n = 5$). The response to ACh after muscarinic blockade with scopolamine was 0 ± 4.0 %. There was a significant reduction in the ACh response after muscarinic blockade ($t_4 = 2.9$, $P = 0.045$; Figure 1).

Neurogenic dural vasodilatation - *muscarinic involvement*

Electrical stimulation of the dura mater resulted in an 81 ± 10.0 % ($n = 9$) increase in dural vessel diameter. The dural vasodilator response after scopolamine was 89 ± 21.0 %, which was not different from the control response ($t_8 = -0.5$, $P = 0.538$; Figure 2).

4. Discussion

This study shows that whereas acetylcholine induces a potent dilator response in rat dural circulation that is blocked by the muscarinic antagonist scopolamine, and not by the nicotinic antagonist mecamylamine, neurogenic dural vasodilation does not have a muscarinic cholinergic component.

Primary headache syndromes share the same pain expression systems, involving cranial vessels and their parasympathetic innervation (18). The relevance of cranial vasodilation to the pathophysiology of primary headaches has been well demonstrated by the effectiveness of the triptans (serotonin 5-HT_{1B/1D} agonists) in treating acute migraine (19) and cluster headaches (20). Vasodilation observed in primary headache is elicited by antidromic transmitter release of calcitonin gene-related peptide from trigeminal fibres and by augmented VIIth cranial nerve parasympathetic outflow (21). Vasoactive intestinal peptide (VIP), one of the transmitters present in cranial vasomotor parasympathetic fibres (22, 23), was found to be increased in acute cluster headache (24, 25) and paroxysmal hemicrania (26). This is not robustly observed in migraine (27), correlating with the lower incidence of autonomic signs in migraine. On the other hand, the presence of unilateral autonomic symptoms was associated to more severe and unilateral pain in a series of 177 migraineurs (28), and to exacerbations, but not to baseline headache, in hemicrania continua patients (29). The changes are consistent with a view of trigeminal-autonomic reflex activation being determined by the severity of pain integrated by the interaction between that reflex and the primary headache type, where the latter is the most important determinant of the pattern of reflex activation (30).

The capacity of lidocaine blockade of the pterygopalatine (sphenopalatine) ganglion to abort acute attacks of migraine (31) and cluster headache (32-34) argues for its involvement in both disorders. Markers for acetylcholine synthesis are found in the sphenopalatine ganglion of many animal species (23, 35), while stimulation of the sphenopalatine ganglion in rat (13, 36) and cat (14) increases cerebral blood flow. Stimulation of the VIIth cranial nerve leads to local release of VIP (12), and pterygopalatine ganglion stimulation to extracranial vasodilation that can be blocked

by VIP antagonism (37). In keeping with the new data there is no significant effect of cholinergic blockade on VIlth nerve-induced increases in cerebral blood flow (38).

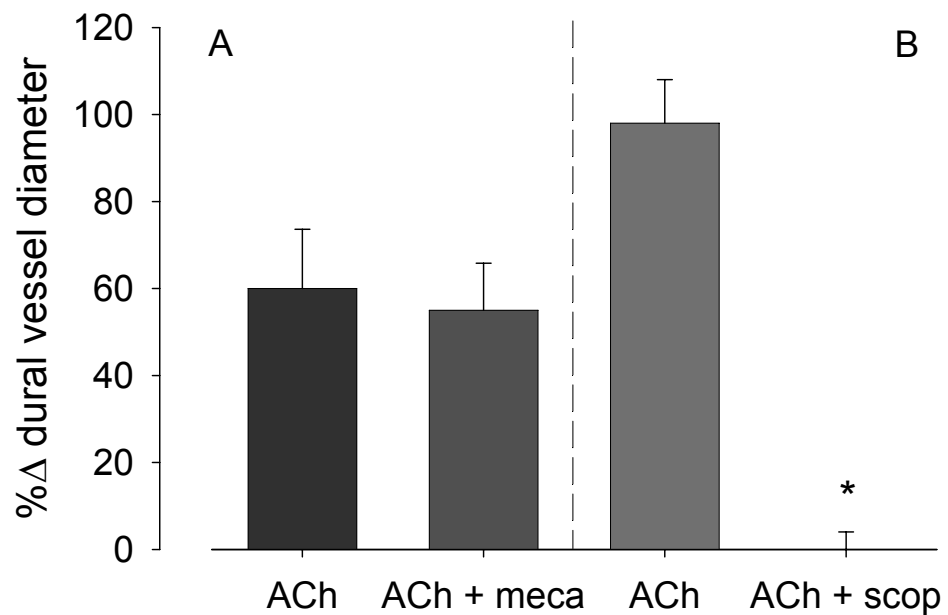
Direct measurement of dural blood vessel diameter using the intravital method in the anaesthetised rat through a closed cranial window has documented dural vasodilation induced by calcitonine gene-related peptide (CGRP), substance P and neurokinin A (16). The combination of short duration, low intensity electric transcranial stimulation of the trigeminal afferents and this direct imaging technique has resulted in considerable advances in characterising trigeminovascular neural vasodilation (39, 40). The strengths of the method are in reproducibility and no requirement to remove the bone affording protection of the local dural environment, with its limitation being that of systemic administration of drugs. A complementary approach has been that of Messlinger and colleagues in studying dural vessels with laser Doppler (41), with the disadvantage of requiring the bone to be disrupted. The results obtained with the two methods are generally similar (42, 43).

In summary, the study has shown that dural vessels in rats contain functional cholinergic muscarinic receptors that mediate vasodilation associated with administration of acetylcholine, but no population of nicotinic receptors. In contrast neurogenic dural vasodilation is unaffected by cholinergic muscarinic blockade, and this cholinergic mechanisms are unlikely to play a major role in the neurogenic modulation of dural-vascular afferents. Understanding the contribution of the trigeminal-cranial autonomic system in terms of its physiology and pharmacology is essential to building a complete picture of the anatomy and physiology of primary headaches.

Acknowledgements: FK was supported financially by a Merck, Sharp & Dohme Brazil grant when doing the experiment described here and by CAPES when presenting it at the 10th Congress of the International Headache Society in New York. PJG is a Wellcome Trust Senior Research Fellow.

Figure 1: Maximal percentage increase in rat dural vessel diameter in response to acetylcholine (ACh) infusion

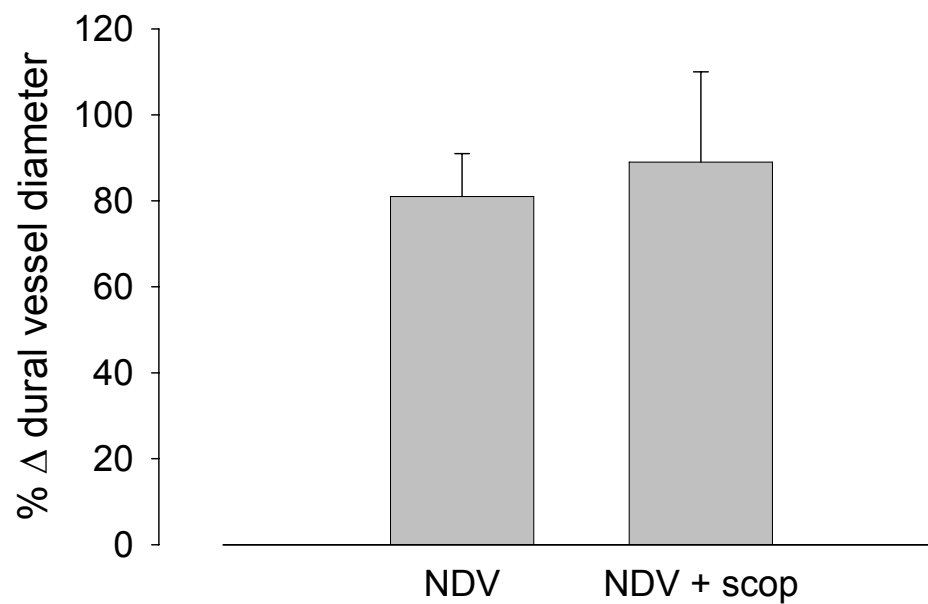
ACh reproducibly dilates dural vessels in separate populations of animals. There is no effect of the nicotinic blocker mecamylamine (A, n = 6), while there is a profound inhibition of dural vasodilation with the muscarinic blocker scopolamine (B, n = 5).



* Bars represent SEM. A significant ($P = 0.045$) difference is indicated by an asterisk.

Figure 2: *Maximal percentage increase in rat dural vessel diameter in response to closed cranial window electrical stimulation*

Stimulation of the dura mater results in a potent, reproducible dilation of the dural vessels, that is unaffected by muscarinic blockade by scopolamine (n = 9, $P = 0.538$).



References

1. Kowacs F. Neurogenic vasodilation of dural blood vessels in the anaesthetised rat is not mediated by cholinergic transmission. *Cephalalgia* 2001;21(4):351.
2. Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* 2001;41(7):646-57.
3. Rasmussen BK, Olesen J. Symptomatic and nonsymptomatic headaches in a general population. *Neurology* 1992;42(6):1225-31.
4. Menken M, Munsat TL, Toole JF. The global burden of disease study: implications for neurology. *Arch Neurol* 2000;57(3):418-20.
5. Goadsby PJ. Pathophysiology of cluster headache: a trigeminal autonomic cephalgia. *Lancet Neurol* 2002;1(4):251-7.
6. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine - current understanding and treatment. *N Engl J Med* 2002;346(4):257-70.
7. Goadsby PJ, Lipton RB. A review of paroxysmal hemicranias, SUNCT syndrome and other short-lasting headaches with autonomic feature, including new cases. *Brain* 1997;120:193-209.
8. Moskowitz MA, Cutrer FM. Sumatriptan: a receptor-targeted treatment for migraine. *Annu Rev Med* 1993;44:145-54.
9. Cutrer FM, Limmroth V, Moskowitz MA. Possible mechanisms of valproate in migraine prophylaxis. *Cephalalgia* 1997;17(2):93-100.

10. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 2002;8(2):136-42.
11. Delepine L, Aubineau P. Plasma protein extravasation induced in the rat dura mater by stimulation of the parasympathetic sphenopalatine ganglion. *Exp Neurol* 1997;147(2):389-400.
12. Goadsby PJ, Shelley S. High-frequency stimulation of the facial nerve results in local cortical release of vasoactive intestinal polypeptide in the anesthetised cat. *Neurosci Lett* 1990;112(2-3):282-9.
13. Seylaz J, Hara H, Pinard E, Mraovitch S, MacKenzie ET, Edvinsson L. Effect of stimulation of the sphenopalatine ganglion on cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8(6):875-8.
14. Goadsby PJ. Sphenopalatine ganglion stimulation increases regional cerebral blood flow independent of glucose utilization in the cat. *Brain Res* 1990;506(1):145-8.
15. Goadsby PJ. Effect of stimulation of facial nerve on regional cerebral blood flow and glucose utilization in cats. *Am J Physiol* 1989;257(3 Pt 2):R517-21.
16. Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG, Shephard SL. Intravital microscope studies on the effects of neurokinin agonists and calcitonin gene-related peptide on dural vessel diameter in the anaesthetized rat. *Cephalalgia* 1997;17(4):518-24.
17. Wolff HG. *Headache and Other Head Pain*. 1st ed. New York: Oxford University Press; 1948.

18. May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19(2):115-27.
19. Ferrari MD, Goadsby PJ, Roon KI, Lipton RB. Triptans (serotonin, 5-HT_{1B/1D} agonists) in migraine: detailed results and methods of a meta-analysis of 53 trials. *Cephalalgia* 2002;22(8):633-58.
20. Matharu MS, Boes CJ, Goadsby PJ. Management of trigeminal autonomic cephalgias and hemicrania continua. *Drugs* 2003;63(16):1637-77.
21. Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in the cerebral circulation: relevance to headache. *Cephalalgia* 1995;15:272-8.
22. Edvinsson L, Ekman R. Distribution and dilatory effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebral vessels. *Peptides* 1984;5:329-31.
23. Hara H, Jansen I, Ekman R, Hamel E, Mackenzie ET, Uddman R, et al. Acetylcholine and vasoactive intestinal peptide in cerebral blood vessels: effect of extirpation of the sphenopalatine ganglion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:204-11.
24. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human *in vivo* evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain* 1994;117(Pt 3):427-34.
25. Fanciullacci M, Alessandri M, Figini M, Geppetti P, Michelacci S. Increase in plasma calcitonin gene-related peptide from extracerebral circulation during nitroglycerin-induced cluster headache attack. *Pain* 1995;60:119-23.

26. Goadsby PJ, Edvinsson L. Neuropeptide changes in a case of chronic paroxysmal hemicrania - evidence for trigemino-parasympathetic activation. *Cephalalgia* 1996;16(6):448-50.
27. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 1990;28(2):183-7.
28. Barbanti P, Fabbrini G, Pesare M, Vanacore N, Cerbo R. Unilateral cranial autonomic symptoms in migraine. *Cephalalgia* 2002;22(4):256-9.
29. Peres MF, Silberstein SD, Nahmias S, Shechter AL, Youssef I, Rozen TD, et al. Hemicrania continua is not that rare. *Neurology* 2001;57(6):948-51.
30. Goadsby PJ, Matharu MS, Boes CJ. SUNCT syndrome or trigeminal neuralgia with lacrimation. *Cephalalgia* 2001;21:82-83.
31. Maizels M, Geiger AM. Intranasal lidocaine for migraine: a randomized trial and open-label follow-up. In: *Headache*; 1999. p. 543-551.
32. Costa A, Pucci E, Antonaci F, Sances G, Granella F, Broich G, et al. The effect of intranasal cocaine and lidocaine on nitroglycerin-induced attacks in cluster headache. *Cephalalgia* 2000;20(2):85-91.
33. Kittrelle JP, Grouse DS, Seybold ME. Cluster headache. Local anesthetic abortive agents. *Arch Neurol* 1985;42(5):496-8.
34. Kudrow L, Kudrow DB. Intranasal lidocaine. *Headache* 1995;35(9):565-6.

35. Uddman R, Tajti J, Moller S, Sundler F, Edvinsson L. Neuronal messengers and peptide receptors in the human sphenopalatine and otic ganglia. *Brain Res* 1999;826(2):193-9.
36. Suzuki N, Hardebo JE, Kahrstrom J, Owman C. Selective electrical stimulation of postganglionic cerebrovascular parasympathetic nerve fibers originating from the sphenopalatine ganglion enhances cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10(3):383-91.
37. Goadsby PJ, MacDonald GJ. Extracranial vasodilation mediated by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Brain Res* 1985;329(1-2):285-8.
38. Goadsby PJ. Characteristics of facial nerve-elicited cerebral vasodilatation determined using laser Doppler flowmetry. *Am J Physiol* 1991;260(1 Pt 2):R255-62.
39. De Vries P, Villalon CM, Saxena PR. Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy [published erratum appears in *Eur J Pharmacol* 1999 Nov 19;384(2-3):243-4]. *Eur J Pharmacol* 1999;375(1-3):61-74.
40. Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ. The effect of anti-migraine compounds on nitric oxide-induced dilation of dural meningeal vessels. *Eur J Pharmacol* 2002;452(2):223-8.
41. Strecker T, Dux M, Messlinger K. Increase in meningeal blood flow by nitric oxide- interaction with calcitonin gene-related peptide receptor and prostaglandin synthesis inhibition. *Cephalalgia* 2002;22:233-41.

42. Dux M, Schwenger N, Messlinger K. Possible role of histamine in the regulation of meningeal blood flow and vascular permeability. *Cephalalgia* 2000;20:418.
43. Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ. The role of histamine in dural vessel dilation. *Brain Research* 2002;956:96-102.

**A Vasodilatação Neurogênica dos Vasos da Dura-Máter no Rato
Anestesiado não é Mediada por Transmissão Colinérgica***

Fernando Kowacs, David J. Williamson† e Peter J. Goadsby‡

Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

† Merck Sharp & Dohme Research Laboratories
Neuroscience Research Centre
Terlings Park, Reino Unido

‡Headache Group
Institute of Neurology
Queen Square
Londres, Reino Unido

* Apresentado como pôster no 10º Congresso da Sociedade Internacional de Cefaléia - Nova Iorque, EUA, 29/06 a 02/07 de 2001 (1) e submetido à apreciação para publicação no *European Journal of Pharmacology*.

Endereço para correspondência:

Fernando Kowacs
Serviço de Neurologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre - Brasil
Fone: +51 3316-8000
Email: fkowacs@yahoo.com

Resumo

Introdução – A dilatação dos vasos da dura-máter induzida pela ativação de fibras sensitivas trigeminais pode ser responsável por alguns componentes da crise migranosa. A presença de sinais clínicos como lacrimejamento, em alguns pacientes com migrânea ou com cefaléia em salvas, sugere a ativação parassimpática craniana e, portanto, a possibilidade de que exista um componente colinérgico na vasodilatação dural neurogênica.

Métodos – Ratos foram preparados para o registro on-line do diâmetro de um ramo da artéria meníngea média através de uma janela craniana fechada, com um microscópio intravital acoplado a um vídeo-analisador dimensional. Acetilcolina (1 µg, IV) foi administrada antes e depois do bloqueio muscarínico ($n = 5$) com escopolamina (2 mg/kg, IV) ou nicotínico ($n = 6$) com mecamilamina (4 mg/kg, IV). Em um segundo experimento, a vasodilatação não foi induzida por fármaco, mas pela estimulação elétrica da superfície da janela craniana ($n = 9$).

Resultados – Houve diferença significativa entre o aumento percentual médio do diâmetro dos vasos durais provocado pela estimulação com acetilcolina antes e depois do bloqueio muscarínico ($P = 0,045$), e os valores pós-bloqueio não foram diferentes daqueles obtidos após a infusão de veículo ($P = 0,431$). Por outro lado, o efeito da acetilcolina não foi modificado pelo bloqueio nicotínico ($P = 0,688$). No segundo experimento, onde foi avaliado o efeito do bloqueio muscarínico com escopolamina IV sobre a vasodilatação induzida pela estimulação elétrica da janela craniana fechada, não foi detectada diferença ($P = 0,538$).

Conclusões – A dilatação colinérgica das artérias da dura-máter do rato é mediada por receptores muscarínicos, mas este mecanismo não tem um papel significativo neste modelo de vasodilatação neurogênica.

Palavras-chave: microscopia *in vivo*, enxaqueca, cefaléia em salvas.

1.Introdução

A migrânea é uma condição neurológica que tem uma prevalência de 12 por cento em populações ocidentais (2, 3) e que incapacita consideravelmente (4) os indivíduos acometidos de forma mais intensa. A cefaléia em salvas é menos comum, mas não menos incapacitante (5). Ambas as condições são consideradas como doenças primariamente cerebrais, com alterações periféricas neurovasculares secundárias (5, 6). Uma parte dos pacientes com migrânea apresenta ativação parassimpática craniana, que, no entanto, é mais proeminente nas chamadas síndromes trigêmino-autonômicas (7).

A ativação trigeminovascular, ou ao menos a percepção desta, é provavelmente um componente-chave da fisiopatologia da migrânea e da cefaléia em salvas. Além disso, muitos pacientes apresentam sintomas clínicos de ativação autonômica craniana como lacrimejamento, injeção conjuntival ou congestão nasal. As influências colinérgicas sobre o sistema trigeminovascular não têm sido estudadas de forma abrangente. Os componentes fundamentais da inflamação neurogênica dos vasos durais são bem compreendidos no que concerne à ativação trigeminal antidrômica (8). A ativação parassimpática pode desempenhar um papel no mecanismo de ação do valproato no modelo da inflamação neurogênica (9) e na ligação entre a inflamação estéril da dura-máter, a depressão alastrante e a ativação trigeminal (10). É digno de nota que a estimulação direta do principal gânglio eferente parassimpático, o gânglio pterigopalatino, pode causar extravasamento plasmático neurogênico na dura-máter (11). Além disso, a estimulação do sétimo nervo craniano (nervo facial), a mais importante via parassimpática eferente craniana, é mediada por uma sinapse nicotínica

hexametônio-sensível (12) no gânglio pterigopalatino (13, 14) produz aumentos no fluxo sanguíneo cerebral independente de alterações concomitantes no metabolismo cerebral (15).

Neste estudo, nós procuramos examinar o mecanismo da vasodilatação dural *in vivo*. Williamson e colaboradores (16) desenvolveram uma técnica de microscopia *in vivo* que, através da observação contínua dos vasos sanguíneos, permite observar e registrar qualquer alteração no diâmetro das artérias meníngeas durante a administração intravenosa de drogas. Esta técnica também permite a observação direta das alterações do diâmetro dos vasos meníngeos durante a despolarização elétrica dural de fibras trigeminais sabidamente capazes de provocar dor em humanos (17), proporcionando meios de estudar a farmacologia do sistema trigeminovascular da dura-máter *in vivo*.

2. Material e Métodos

2.1 Preparação cirúrgica

Ratos machos Sprague-Dawley (média do peso \pm desvio padrão para o grupo da vasodilatação induzida pela ACh: 369 ± 21 g, e para o grupo da vasodilatação neurogênica: 331 ± 17 g) foram anestesiados durante os experimentos com pentobarbital sódico (60 mg/kg intraperitoneal seguido por 18 mg/kg/h em infusão intravenosa contínua) e ventilados artificialmente através de uma cânula traqueal. A artéria femoral e a veia femoral esquerdas foram cateterizadas para permitir o registro da pressão arterial e a infusão de anestésico, respectivamente. A temperatura foi mantida constante através do uso de um sistema de homeotermia formado por um termômetro retal e uma bancada com forro aquecido. Os ratos foram colocados em uma armação estereotáxica, tiveram o crânio exposto e o osso

parietal direito desgastado com uma broca odontológica, resfriada por solução salina, até que os vasos da dura-máter ficassem claramente visíveis através do crânio, cuja superfície não sofreu solução de continuidade (“janela craniana”). Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com o *Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, legislação do Reino Unido referente ao emprego de animais na pesquisa científica.

2.2 Microscopia *in vivo*

A “janela craniana” foi coberta com óleo mineral (37°C), um ramo da artéria meníngea média foi localizado através de um microscópio intravital (Microvision MV2100, RU) e a imagem exibida em um monitor de televisão. O diâmetro foi medido continuamente através de um vídeo-analisador dimensional (Living Systems Instrumentation, EUA) e registrado, juntamente com a pressão arterial sistêmica, em um registro gráfico contínuo e em um sistema de análise de dados (MI2, Modular Instruments, RU).

2.3 Protocolos experimentais

2.3.1 Definição dos parâmetros de estimulação elétrica

Nas preparações onde a estimulação elétrica foi utilizada para provocar a dilatação dos vasos sangüíneos durais, um eletrodo estimulador bipolar (NE 200X, Clark Electromedical) foi apostado à superfície da “janela craniana”, a aproximadamente 200 µm do vaso de interesse. A superfície da “janela craniana” foi estimulada durante 10 s, com pulsos de 1ms de duração e freqüência de 5 Hz, (Grass Stimulator S88, Grass Instrumentation) com voltagem crescente até que a dilatação arterial máxima fosse observada. Todas as respostas subseqüentes induzidas por estímulo elétrico em um determinado animal foram então desencadeadas usando a

mesma voltagem (16). A resposta vasodilatadora neurogênica a quatro estímulos consecutivos foi testada em experimentos-controle para determinar se havia algum efeito sistemático ao longo do tempo que pudesse confundir os resultados (verificação da reprodutibilidade).

2.3.2 Intervenções farmacológicas

No primeiro experimento, acetilcolina (ACh; 1 μ g-10 μ g, IV) foi administrada sucessivamente por três vezes, com intervalos de 5 minutos, para avaliar a consistência da vasodilatação por ela induzida. A administração de ACh foi repetida então por duas vezes após o bloqueio muscarínico com escopolamina (1 mg/kg, IV) ou, no outro grupo de ratos, após o bloqueio nicotínico com mecamilamina (4 mg/kg, IV). No segundo experimento, a vasodilatação foi induzida pela estimulação elétrica da superfície da “janela craniana”, conforme a técnica já descrita, antes e depois do bloqueio muscarínico com escopolamina IV. O bloqueio nicotínico não foi utilizado neste segundo experimento por não ter alterado a resposta à acetilcolina no primeiro deles.

2.4 Análise estatística

O efeito da infusão de acetilcolina e da estimulação elétrica da superfície craniana sobre o diâmetro dos vasos durais foi calculado como aumento percentual máximo em relação à linha de base. O teste-t de Student para amostras pareadas foi utilizado para comparar as médias dos valores obtidos antes e depois do bloqueio colinérgico e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05. Os dados estão apresentados como média mais ou menos o erro padrão da média (\pm EPM), a menos que indicado.

3. Resultados

Os animais incluídos na análise final tinham níveis pressóricos arteriais normais. O veículo (solução salina) não teve efeito significativo sobre o diâmetro dos vasos durais quando infundido nos animais que receberam acetilcolina subseqüentemente, tanto no grupo tratado com mecamilamina ($3 \pm 1,5\%$, $n = 6$) quanto naquele tratado com escopolamina ($2 \pm 1,4\%$, $n = 5$).

Vasodilatação dural induzida pela acetilcolina – *envolvimento nicotínico*

Uma vasodilatação controle dos vasos durais de $60 \pm 13,6\%$ foi induzida pela acetilcolina (ACh) ($n = 6$). A resposta à acetilcolina após o bloqueio nicotínico com mecamilamina foi de $55 \pm 10,8\%$, não diferente, portanto, da resposta controle ($t_5 = 0,43$; $P = 0,688$; Figura 1).

Vasodilatação dural induzida pela acetilcolina – *envolvimento muscarínico*

A acetilcolina (ACh) induziu uma vasodilatação controle dos vasos durais de $98 \pm 31,0\%$ ($n = 5$). A resposta à acetilcolina após o bloqueio muscarínico com escopolamina foi de $0 \pm 4,0\%$. Houve, portanto, uma redução significativa na resposta à acetilcolina após o bloqueio muscarínico ($t_4 = 2,9$; $P = 0,045$; Figura 1).

Vasodilatação neurogênica dural – *envolvimento muscarínico*

A estimulação elétrica da dura-máter resultou em um aumento de $81 \pm 10,0\%$ ($n = 9$) no diâmetro dos vasos durais. A resposta vasodilatadora dural após a escopolamina foi de $89 \pm 21,0\%$, a qual não foi diferente da resposta controle ($t_8 = 0,5$; $P = 0,538$; Figura 2).

4. Discussão

Este estudo mostra que a acetilcolina induz uma vasodilatação potente na circulação dural do rato, que é bloqueada pelo antagonista muscarínico escopolamina, mas não pelo antagonista nicotínico mecamilamina. No entanto, a vasodilatação dural neurogênica é desprovida de um componente colinérgico muscarínico.

As cefaléias primárias compartilham os mesmos sistemas de expressão da dor, envolvendo os vasos cranianos e sua inervação parassimpática (18). A relevância da vasodilatação craniana para a fisiopatologia das cefaléias primárias tem sido bem demonstrada através da eficácia dos triptanos, agonistas serotoninérgicos 5-HT_{1B/1D}, no tratamento agudo da migrânea (19) e da cefaléia em salvas (20). Esta vasodilatação parece ser provocada não apenas pela liberação antidrômica de neurotransmissores pelas fibras trigeminais, mas também por um efluxo parassimpático aumentado, transmitido pelo nervo facial (21). Foi demonstrado que o nível de peptídeo intestinal vasoativo (VIP), um dos neurotransmissores presentes nas fibras parassimpáticas cranianas (22, 23), está aumentado no sangue da veia jugular de pacientes com crises cefaléia em salvas (24, 25) e de hemicrania paroxística crônica (26). Isto não foi observado de forma consistente na migrânea (27), sendo este achado coerente com a incidência mais baixa de sinais autonômicos nas crises de migrânea em comparação com as outras cefaléias citadas. Por outro lado, a presença de sinais autonômicos unilaterais esteve associada à dor mais severa e à dor unilateral em uma série de 177 indivíduos com migrânea (28), e às exacerbações, mas não à dor constante, em pacientes com hemicrania contínua (29). Estas observações estão em concordância com a noção

de que o padrão de ativação do reflexo trigêmino-autonômico é determinado pela severidade da dor e pela interação entre este reflexo e o tipo específico de cefaléia primária, sendo esse último o fator crucial (30).

A capacidade do bloqueio do gânglio pterigopalatino com lidocaína de abortar crises de migrânea (31) e de cefaléia em salvas (32-34) fala a favor do envolvimento deste gânglio nestas duas doenças. Marcadores da síntese de acetilcolina são encontrados no gânglio pterigopalatino em várias espécies animais (22, 35), enquanto que a estimulação do gânglio pterigopalatino no rato (14, 36) e no gato (13) aumenta o fluxo sanguíneo cerebral. A estimulação do nervo facial leva à liberação local de VIP (12) e a estimulação do gânglio pterigopalatino à vasodilatação extracraniana, que pode ser bloqueada por antagonistas do VIP (37). Em paralelo com os novos dados, o aumento no fluxo sanguíneo cerebral induzido pela estimulação do nervo facial também não é afetado pelo bloqueio colinérgico (38).

A medição direta do diâmetro dos vasos da dura-máter através de uma janela craniana fechada no rato anestesiado permitiu o registro da vasodilatação dural induzida pelo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), pela substância P e pela neuroquinina A (16). A combinação desta técnica de visualização direta com a estimulação elétrica transcraniana de baixa intensidade e curta duração dos aferentes trigeminais resultou em avanços consideráveis na caracterização da vasodilatação neural trigeminovascular (39, 40). As virtudes deste método estão na reprodutibilidade e na proteção proporcionada ao ambiente dural pela manutenção do osso craniano sem solução de continuidade. Suas limitações são aquelas da administração sistêmica dos fármacos. Uma abordagem complementar é a que tem sido utilizada por Messlinger e colaboradores, ao estudarem os vasos durais com

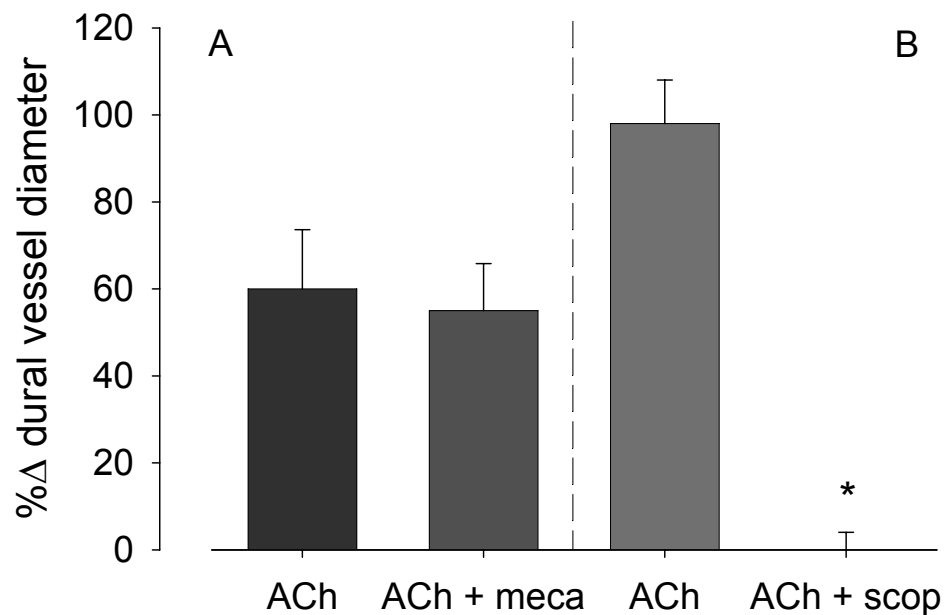
laser Doppler (41), com a desvantagem de que a craniotomia se faz necessária. Os resultados obtidos com os dois métodos são, de modo geral, semelhantes (42, 43).

O presente estudo mostra que os vasos da dura-máter do rato contêm receptores colinérgicos muscarínicos que mediam a vasodilatação associada à administração de acetilcolina e que não possuem receptores nicotínicos. A vasodilatação dural neurogênica, por sua vez, não é afetada pelo bloqueio colinérgico muscarínico, e é improvável que este mecanismo colinérgico tenha um papel importante na modulação neurogênica dos aferentes vasculares durais. Compreender a contribuição do sistema trigêmeino-autonômico em termos da sua fisiologia e da sua farmacologia é essencial para formar uma imagem completa da anatomia e da fisiologia das cefaléias primárias.

Agradecimentos: FK teve apoio financeiro da Merck, Sharp & Dohme no Brasil através de bolsa para estágio no exterior e da CAPES quando da apresentação deste estudo no 10º Congresso da Sociedade Internacional de Cefaléia. PJG é pesquisador sênior do Wellcome Trust.

Figura 1: Aumento percentual máximo do diâmetro dos vasos durais do rato em resposta à infusão de acetilcolina (ACh)

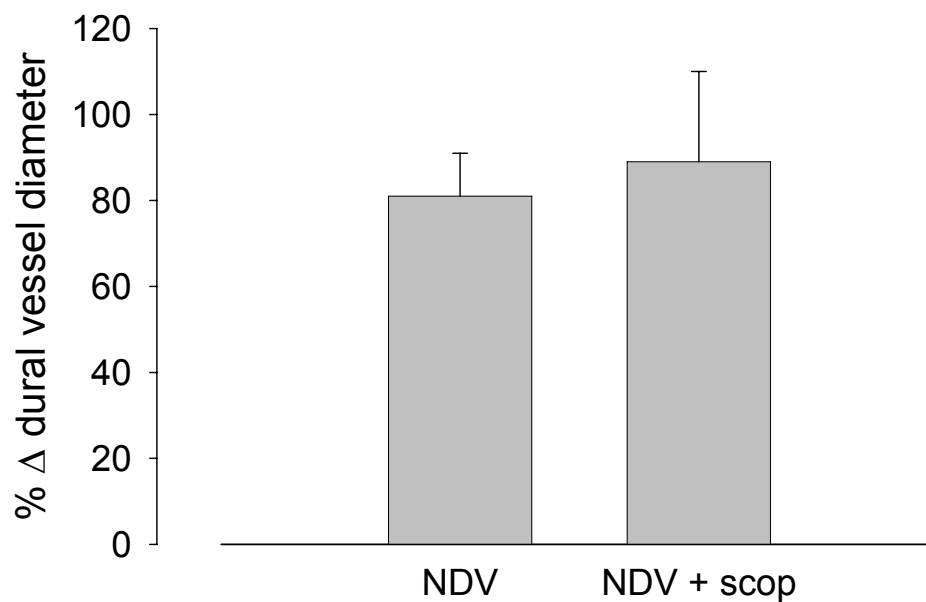
A ACh dilata os vasos durais de forma reprodutível em diferentes populações de animais. Não há efeito do bloqueador nicotínico mecamilamina (A, $n = 6$), enquanto há uma inibição profunda da vasodilatação dural pelo bloqueador muscarínico escopolamina (B, $n = 5$).



* As barras representam o EPM. Uma diferença significativa ($P = 0,045$) está indicada por um asterisco.

Figura 2: *Aumento percentual máximo do diâmetro dos vasos durais do rato em resposta à estimulação elétrica da janela craniana fechada*

A estimulação da dura-máter provoca uma dilatação potente e reprodutível dos vasos durais, que não é afetada pelo bloqueio muscarínico com escopolamina ($n = 9$, $P = 0,538$).



Referências

1. Kowacs F. Neurogenic vasodilation of dural blood vessels in the anaesthetised rat is not mediated by cholinergic transmission. *Cephalalgia* 2001;21(4):351.
2. Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* 2001;41(7):646-57.
3. Rasmussen BK, Olesen J. Symptomatic and nonsymptomatic headaches in a general population. *Neurology* 1992;42(6):1225-31.
4. Menken M, Munsat TL, Toole JF. The global burden of disease study: implications for neurology. *Arch Neurol* 2000;57(3):418-20.
5. Goadsby PJ. Pathophysiology of cluster headache: a trigeminal autonomic cephalgia. *Lancet Neurol* 2002;1(4):251-7.
6. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine - current understanding and treatment. *N Engl J Med* 2002;346(4):257-70.
7. Goadsby PJ, Lipton RB. A review of paroxysmal hemicranias, SUNCT syndrome and other short-lasting headaches with autonomic feature, including new cases. *Brain* 1997;120:193-209.
8. Moskowitz MA, Cutrer FM. Sumatriptan: a receptor-targeted treatment for migraine. *Annu Rev Med* 1993;44:145-54.
9. Cutrer FM, Limmroth V, Moskowitz MA. Possible mechanisms of valproate in migraine prophylaxis. *Cephalalgia* 1997;17(2):93-100.

10. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 2002;8(2):136-42.
11. Delepine L, Aubineau P. Plasma protein extravasation induced in the rat dura mater by stimulation of the parasympathetic sphenopalatine ganglion. *Exp Neurol* 1997;147(2):389-400.
12. Goadsby PJ, Shelley S. High-frequency stimulation of the facial nerve results in local cortical release of vasoactive intestinal polypeptide in the anesthetised cat. *Neurosci Lett* 1990;112(2-3):282-9.
13. Goadsby PJ. Sphenopalatine ganglion stimulation increases regional cerebral blood flow independent of glucose utilization in the cat. *Brain Res* 1990;506(1):145-8.
14. Seylaz J, Hara H, Pinard E, Mraovitch S, MacKenzie ET, Edvinsson L. Effect of stimulation of the sphenopalatine ganglion on cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8(6):875-8.
15. Goadsby PJ. Effect of stimulation of facial nerve on regional cerebral blood flow and glucose utilization in cats. *Am J Physiol* 1989;257(3 Pt 2):R517-21.
16. Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG, Shephard SL. Intravital microscope studies on the effects of neurokinin agonists and calcitonin gene-related peptide on dural vessel diameter in the anaesthetized rat. *Cephalalgia* 1997;17(4):518-24.
17. Wolff HG. *Headache and Other Head Pain*. 1st ed. New York: Oxford University Press; 1948.

18. May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19(2):115-27.
19. Ferrari MD, Goadsby PJ, Roon KI, Lipton RB. Triptans (serotonin, 5-HT_{1B/1D} agonists) in migraine: detailed results and methods of a meta-analysis of 53 trials. *Cephalalgia* 2002;22(8):633-58.
20. Matharu MS, Boes CJ, Goadsby PJ. Management of trigeminal autonomic cephalgias and hemicrania continua. *Drugs* 2003;63(16):1637-77.
21. Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in the cerebral circulation: relevance to headache. *Cephalalgia* 1995;15:272-8.
22. Hara H, Jansen I, Ekman R, Hamel E, Mackenzie ET, Uddman R, et al. Acetylcholine and vasoactive intestinal peptide in cerebral blood vessels: effect of extirpation of the sphenopalatine ganglion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:204-11.
23. Edvinsson L, Ekman R. Distribution and dilatory effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebral vessels. *Peptides* 1984;5:329-31.
24. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human *in vivo* evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain* 1994;117(Pt 3):427-34.
25. Fanciullacci M, Alessandri M, Figini M, Geppetti P, Michelacci S. Increase in plasma calcitonin gene-related peptide from extracerebral circulation during nitroglycerin-induced cluster headache attack. *Pain* 1995;60:119-23.

26. Goadsby PJ, Edvinsson L. Neuropeptide changes in a case of chronic paroxysmal hemicrania - evidence for trigemino-parasympathetic activation. *Cephalalgia* 1996;16(6):448-50.
27. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 1990;28(2):183-7.
28. Barbanti P, Fabbrini G, Pesare M, Vanacore N, Cerbo R. Unilateral cranial autonomic symptoms in migraine. *Cephalalgia* 2002;22(4):256-9.
29. Peres MF, Silberstein SD, Nahmias S, Shechter AL, Youssef I, Rozen TD, et al. Hemicrania continua is not that rare. *Neurology* 2001;57(6):948-51.
30. Goadsby PJ, Matharu MS, Boes CJ. SUNCT syndrome or trigeminal neuralgia with lacrimation. *Cephalalgia* 2001;21:82-83.
31. Maizels M, Geiger AM. Intranasal lidocaine for migraine: a randomized trial and open-label follow-up. In: *Headache*; 1999. p. 543-551.
32. Costa A, Pucci E, Antonaci F, Sances G, Granella F, Broich G, et al. The effect of intranasal cocaine and lidocaine on nitroglycerin-induced attacks in cluster headache. *Cephalalgia* 2000;20(2):85-91.
33. Kittrelle JP, Grouse DS, Seybold ME. Cluster headache. Local anesthetic abortive agents. *Arch Neurol* 1985;42(5):496-8.
34. Kudrow L, Kudrow DB. Intranasal lidocaine. *Headache* 1995;35(9):565-6.

35. Uddman R, Tajti J, Moller S, Sundler F, Edvinsson L. Neuronal messengers and peptide receptors in the human sphenopalatine and otic ganglia. *Brain Res* 1999;826(2):193-9.
36. Suzuki N, Hardebo JE, Kahrstrom J, Owman C. Selective electrical stimulation of postganglionic cerebrovascular parasympathetic nerve fibers originating from the sphenopalatine ganglion enhances cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10(3):383-91.
37. Goadsby PJ, MacDonald GJ. Extracranial vasodilation mediated by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Brain Res* 1985;329(1-2):285-8.
38. Goadsby PJ. Characteristics of facial nerve-elicited cerebral vasodilatation determined using laser Doppler flowmetry. *Am J Physiol* 1991;260(1 Pt 2):R255-62.
39. Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ. The effect of anti-migraine compounds on nitric oxide-induced dilation of dural meningeal vessels. *Eur J Pharmacol* 2002;452(2):223-8.
40. De Vries P, Villalon CM, Saxena PR. Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy [published erratum appears in *Eur J Pharmacol* 1999 Nov 19;384(2-3):243-4]. *Eur J Pharmacol* 1999;375(1-3):61-74.
41. Strecker T, Dux M, Messlinger K. Increase in meningeal blood flow by nitric oxide- interaction with calcitonin gene-related peptide receptor and prostaglandin synthesis inhibition. *Cephalalgia* 2002;22:233-41.

42. Dux M, Schwenger N, Messlinger K. Possible role of histamine in the regulation of meningeal blood flow and vascular permeability. *Cephalalgia* 2000;20:418.
43. Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ. The role of histamine in dural vessel dilation. *Brain Research* 2002;956:96-102.

ANEXO I

1 DETALHAMENTO DA TÉCNICA UTILIZADA NO EXPERIMENTO

1.1 Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos pesando entre 300 e 400 gramas, mantidos com alimentação e água à vontade e ciclo de iluminação de 12 horas. Quarenta e seis ratos foram empregados durante o treinamento da técnica e o experimento. Os experimentos completos foram realizados em vinte e dois animais e os resultados de dois deles foram descartados pela grande discrepância em relação aos demais (*outliers*).

1.2 Anestesia

A anestesia foi realizada com pentobarbital sódico (Sagatal, Rhone Merieux, RU) administrado inicialmente por via intraperitoneal para a indução anestésica (60 mg/kg) e, durante o restante do experimento, por via intravenosa contínua em bomba de infusão (18 mg/kg/h), com ajustes para manter um nível constante de anestesia, com a ausência do reflexo de retirada à preensão da pata e a manutenção de uma ventilação harmônica. Durante a anestesia, os animais foram mantidos com ventilação mecânica (Small Rodent Ventilator, Ugo Basile, Itália), a 50 ciclos por minuto e 5-6 mL de volume de ar corrente. A pressão arterial foi monitorizada continuamente e registrada em gráfico, através do uso de um transdutor de membrana (Model P23XL, Viggo-Spectramed, Linton Instrumentation, RU) acoplado a uma cânula intra-arterial (ver a seguir). A temperatura central foi mantida em cerca de 37°C por um sistema de homeotermia composto por um termômetro retal e uma bancada com forro aquecido. Todos os animais receberam

uma dose letal de 200 mg de pentobarbital sódico (Euthatal, Merial, RU) ao final do experimento e tiveram sua coluna cervical deslocada conforme o procedimento padrão .

1.3 Preparação cirúrgica

1.3.1 Canulação da traquéia e dos vasos femorais

Os ratos foram submetidos à traqueostomia e à entubação traqueal com cânulas flexíveis de polietileno (Portex, RU) e tiveram a artéria e a veia femorais direitas dissecadas e também cateterizadas (Portex, RU). Os procedimentos foram realizados com o auxílio de um microscópio cirúrgico (SMZ-2B, Nikon, RU). A artéria femoral foi utilizada para o registro da pressão arterial e a veia para a administração do anestésico e dos demais fármacos.

1.3.2 Preparação da “janela craniana” fechada

A cabeça dos ratos foi fixada em uma armação estereotáxica (David Kopf Instruments, EUA) e uma incisão mediana na pele foi feita para permitir a retração da pele, do couro cabeludo e do músculo masseter. Uma área retangular do osso parietal direito (aproximadamente 5 x 6 mm) foi desgastada com o uso de uma broca odontológica (1,5 mm, NM3000, Quayle Dental, RU), até que o adelgaçamento do osso permitisse a visão nítida dos ramos da artéria meníngea média, formando a chamada “janela craniana”. A broca foi resfriada com gotejo de solução salina isotônica e os sangramentos foram interrompidos com cera para osso. Quando houve a perfuração inadvertida do osso, a preparação cirúrgica foi interrompida e o animal sacrificado. Para evitar o ressecamento, a “janela craniana” foi coberta com óleo mineral (37°C) durante o experimento.

1.3.3 *Posicionamento do eletrodo estimulador*

No experimento que envolveu o mecanismo da vasodilatação neurogênica, um eletrodo bipolar estimulador (NE-200x, Clark Eletromedical, RU) foi apostado à superfície do osso parietal, sobre a “janela craniana”, a uma distância de aproximadamente 200 µm do ramo arterial selecionado. O posicionamento do eletrodo foi realizado com o auxílio de um micromanipulador (Prior, RU), havendo o cuidado de não pressionar o osso parietal.

1.4 **Medição do diâmetro dos vasos da dura-máter**

Após a preparação cirúrgica, uma artéria dural teve sua imagem exposta em um monitor de televisão comum, graças ao uso de uma lente *zoom* (magnificação de 80 a 450 vezes), um filtro fotográfico ciano utilizado para melhorar o contraste e o brilho da imagem (100c, Lee Filters, RU), uma fonte de luz fria (sistema de fibra óptica, Schott KL1500, BDH, RU) e um microscópio intravital (MV2100, Finlay Microvision, RU) acoplado a um vídeo-analisador dimensional (Living System Instrumentation, EUA). O vídeo-analisador dimensional mede e registra, de modo contínuo e em unidades arbitrárias, o diâmetro de um ponto selecionado da artéria exposta na tela, em um registro gráfico convencional (agulha, tinta e bobina de papel) e em um sistema informatizado de registro e análise de dados (MI², Modular Instruments, RU) (ver Figuras 5 e 6, pág. 99).

Figura 5 - Exemplo de registro gráfico do diâmetro de um ramo arterial dural do rato anestesiado, obtido através do uso de um vídeo-analisador dimensional acoplado ao microscópio intravital, durante a administração seqüencial de três doses de acetilcolina.

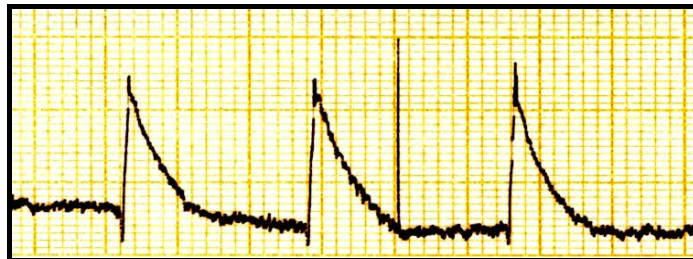


Figura 6 - Exemplo de registro gráfico do diâmetro de um ramo arterial dural do rato anestesiado, obtido através do uso de um vídeo-analisador dimensional acoplado ao microscópio intravital, durante a estimulação elétrica repetida da janela craniana fechada com duas séries estímulos de 1 ms de duração, a 5 Hz, por 10 s.

