

Instituto Politécnico do Porto  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Raquel Sofia Meireles de Sousa

# A disfunção redox espinal na dor neuropática.

Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde

Dezembro de 2012



ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO  
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

---

Raquel Sofia Meireles de Sousa

---

## A DISFUNÇÃO REDOX ESPINHAL NA DOR NEUROPÁTICA

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica da Doutora Dora Pinho, coorientação do Professor Doutor António Albino Teixeira e coorientação institucional da Professora Doutora Cristina Prudêncio

Dezembro, 2012



## Agradecimentos

À minha orientadora Dora Pinho expresso os meus profundos agradecimentos pela dedicação com que orientou esta tese, pela disponibilidade e apoio constantes, pelas palavras de incentivo e pela forma amável como me acolheu no seu grupo e no Departamento de Farmacologia e Terapêutica. Por toda a ajuda e confiança que depositou no meu trabalho, por me dar forças para prosseguir quando os contratempos pareciam não ter fim. Um “muito obrigada” por ter enriquecido os meus conhecimentos científicos e me ter ajudado a crescer enquanto pessoa.

Ao Professor António Albino-Teixeira, meu coorientador, que tão bem me acolheu no seu grupo. Agradeço-lhe pela disponibilidade e amabilidade que sempre demonstrou e pelas críticas construtivas, sem as quais seria difícil finalizar a presente tese.

À Professora Cristina Prudêncio, minha coorientadora institucional, pelo interesse e amabilidade com que acompanhou o meu trabalho.

À minha colega de trabalho Liliana Carvalho por toda a paciência e tempo dispensados a transmitir-me conhecimentos úteis na prática laboratorial e pelo acompanhamento e ajuda constantes.

Aos meus colegas de trabalho e amigos João, Jótó e Vera, que partilharam muito mais que um gabinete comigo. As nossas gargalhadas, desabafos, ataques de pânico e desespero, troca de ideias e constante boa disposição ajudaram-me a manter a sanidade mental em momentos de aflição. Agradeço-vos com um simples “Dança, dança!”, na esperança de que nós, os pequenos, o possamos ser por muito tempo.

A todos os restantes membros do Departamento de Farmacologia e Terapêutica pela forma carinhosa com que me acolheram e pela fantástica capacidade de fazerem com que todos se dirijam para o trabalho com um sorriso nos lábios.

Ao Departamento de Biologia Experimental por me terem permitido realizar grande parte do trabalho laboratorial nas suas instalações e por todo o apoio que sempre me prestaram.

Ao corpo docente da Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto e a todos que fizeram dela o meu “lar” durante os últimos seis anos, quer na licenciatura quer no mestrado, agradeço pelos conhecimentos transmitidos, que se revelaram essenciais no desenvolvimento desta tese e pelos vários e inesquecíveis momentos académicos vividos nesta instituição, que já recordo de forma saudosa.

Aos amigos que me apoiaram, deram força e se disponibilizaram para ajudar, mesmo não percebendo nada do assunto, agradeço-lhes pela compreensão, persistência e capacidade de me

fazer gargalhar em momentos menos inspirados. Prometo que irei recompensar os vários convites recusados nesta etapa final.

Ao meu irmão por me fazer “aparvalhar” como mais ninguém consegue e por todas as brincadeiras que me fizeram desanuviar quando a inspiração teimava em não chegar. Por ser uma das pessoas que melhor me compreende, sendo ao mesmo tempo tão parecido e tão diferente de mim.

Aos meus pais que sempre me formaram enquanto pessoa e sempre me apoiaram na minha escolha profissional. Mais do que ninguém aturaram as minhas mudanças de humor e parvoíces diárias, os meus momentos de êxtase e desilusão, apoiando-me em tudo e sempre com uma palavra de ânimo. Devo-vos a pessoa que sou e aquilo que atingi: um “muito obrigada” nunca será suficiente para agradecer tudo o que fizeram por mim.

## **Apoio Financeiro**

O presente trabalho foi financiado pela FCT e FEDER/COMPETE com o projeto PTDC/SAU-NEU/101090/2008.

## Resumo

As espécies reativas de oxigénio (ROS) estão envolvidas no desenvolvimento de dor neuropática. No entanto, a aplicação clínica de moléculas antioxidantes no tratamento desta patologia tem demonstrado pouca eficácia. A inibição da NADPH oxidase (NOX), uma das principais fontes de ROS, poderá ser uma boa estratégia terapêutica. O nosso grupo verificou que a apocinina (inibidor da NOX) melhora parcialmente os sintomas de dor neuropática e a disfunção redox espinhal no modelo SNI (*spared nerve injury*). De forma a melhorar este efeito terapêutico, o presente estudo insere-se num projeto maior, que visa identificar as isoformas da NOX envolvidas na fisiopatologia da doença e avaliar o efeito da administração de inibidores específicos para essas isoformas. Assim, propusemo-nos a avaliar a disfunção redox espinhal em fases precoces da dor neuropática periférica induzida pelo modelo SNI no Rato, relacionando-a com os comportamentos de dor demonstrados pelos animais.

Foram constituídos três grupos experimentais: SNI, *sham* e *naïve*, com subgrupos testados e sacrificados aos dias 1, 3, 7 e 14 após a cirurgia. Avaliou-se a sensibilidade mecânica (vonFrey e *pinprick*) e ao frio (acetona) dos animais, sacrificaram-se e recolheram-se as medulas espinhais para análise imunohistoquímica, com marcadores de dano oxidativo no DNA e de dano nitrosativo.

Ao contrário dos animais *sham*, que demonstraram um comportamento muito próximo dos *naïve*, os animais SNI desenvolveram alodínia mecânica e ao frio e hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral. No entanto, o dano oxidativo no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal apresentou-se idêntico nos grupos SNI e *sham* ao longo dos 14 dias de estudo, não havendo também diferenças entre os cornos ipsi e contralateral à lesão nervosa. É possível que o desenvolvimento de dor neuropática nos animais SNI não se faça acompanhar de disfunção redox espinhal, pelo menos até aos 14 dias pós indução. O facto de a lesão nervosa no modelo SNI se localizar numa porção distal do ciático, ao contrário de outros modelos em que o stresse oxidativo espinhal foi já descrito, poderia explicar essas diferenças.

Em todo o caso, considerando que os resultados comportamentais obtidos indicam que as cirurgias SNI e *sham* causam diferentes níveis de sensibilização nos animais, parece-nos fulcral prolongar os tempos de neuropatia, e executar uma avaliação do estado redox com outros marcadores, de forma a elucidar se, de facto, existem ROS envolvidas nesta sensibilização e, em caso positivo, poder identificar essas espécies, bem como as suas fontes.

**Palavras-Chave:** Dor neuropática, Disfunção redox, ROS, Alodínia, Hiperalgesia



## Abstract

Reactive oxygen species are involved in neuropathic pain pathophysiology. However, the use of antioxidants to treat this pathology is seldom effective in clinical trials. Inhibiting the NADPH oxidase (NOX), which is one of the main sources of ROS could be a good therapeutic strategy. We have observed that the NOX-inhibitor apocynin (*per os*) partially ameliorates neuropathic pain symptoms and oxidative dysfunction in spinal cord in the spared nerve injury (SNI) model. In order to improve this therapeutic effect, we aimed at determining the specific NOX isoforms involved and evaluate the effect of intrathecal administration of specific inhibitors. Here we present the first task of the project, which aimed at evaluating redox dysfunction in spinal cord at early stages of peripheral neuropathic pain induced by SNI in Rat, and correlating that dysfunction to the animals' pain behaviors.

Three experimental groups were constituted: SNI, sham-operated and naïve rats. Paw responses to mechanical (von Frey and pinprick tests) and cold stimuli (acetone test) were evaluated at 1, 3, 7 and 14 days after surgery. At these timepoints, rats were sacrificed and their spinal cords were collected and immunoreacted for DNA oxidative damage and peroxynitrite markers.

Unlike sham animals, whose behavior was identical to naïve, SNI animals showed mechanical and cold allodynia and mechanical hyperalgesia in the ipsilateral hindpaw during the study. However, both SNI and sham animals exhibited similar levels of oxidative and nitrosative damage, which differed from oxidative levels presented by naïve animals. It is likely that the development of neuropathic pain in SNI animals is not accompanied by spinal redox dysfunction, at least up to 14 days after induction. These differences might be explained by the distal location of the nerve injury in the SNI model, which is different from the injury location in other animal models where spinal oxidative stress has been described. Considering that the behavioral results obtained show that SNI and sham surgeries cause different levels of sensitization in these animals, we believe that neuropathy duration should be extended in future studies. Redox status evaluation with different markers should also be performed, to elucidate whether ROS are indeed involved in this sensitization and to identify which reactive species (if any) are involved, as well as their source.

**Keywords:** Neuropathic pain, Redox dysfunction, ROS, Allodynia, Hyperalgesia



# Índice

CAPÍTULO I.....	1
1. Introdução.....	3
1.1. Dor neuropática.....	3
1.2. Espécies reativas de oxigénio.....	7
1.3. Fontes de ROS .....	9
1.3.1. Mitocôndria .....	9
1.3.2. Oxidase do NADPH (NOX).....	10
1.4. Papel das ROS na dor crónica.....	15
Objetivos .....	19
CAPÍTULO II.....	21
2. Material e Métodos.....	23
2.1 Planeamento experimental e análise estatística.....	23
2.2 Animais .....	24
2.3 Indução da dor neuropática .....	24
2.4 Avaliação comportamental.....	25
2.5. Avaliação do dano oxidativo na medula espinhal .....	27
2.5.1. Otimização e controlos da técnica de imunohistoquímica .....	28
CAPÍTULO III .....	29
3. Resultados.....	31
3.1. Avaliação comportamental.....	31
3.1.1. Teste de von Frey.....	31
3.1.2. Teste de acetona.....	32
3.1.3. Teste de <i>pinprick</i> .....	33
3.2. Dano oxidativo do DNA.....	34
3.2.1. Segmentos L4 e L5 .....	34
3.2.2. Segmentos Cervicais .....	37
3.3. Dano nitrosativo .....	38
CAPÍTULO IV .....	41
4. Discussão .....	43
CAPÍTULO V .....	49
5. Conclusão .....	51
Referências Bibliográficas .....	53



## Índice de abreviaturas

8OHdG – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

ABC – complexo avidina-biotina

CCI – modelo de dor neuropática induzida por constrição crónica do nervo ciático (*chronic constriction injury*)

DRG – gânglio raquidiano dorsal

DUOX – oxidase dual

GABA – ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GPx – peroxidase da glutathiona

GR – redutase da glutathiona

GSH – glutathiona reduzida

GSSG – glutathiona oxidada

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor

ICDH – desidrogenase do isocitrato

NADPH – dinucleótido fosfatado de nicotinamida e adenina

NF- $\kappa$ B – fator nuclear kappa B

NOS – sintetase do óxido nítrico

NOX – oxidase do NADPH

NSS – soro normal de porco

PBS – tampão fosfato salino

PBST – tampão fosfato salino com Triton

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PKC – cinase C de proteínas

Prx – peroxirredoxinas

PSL – modelo de dor neuropática induzido pela ligação parcial do nervo ciático (*partial sciatic nerve ligation*)

ROS – espécies reativas de oxigénio

SNC – sistema nervoso central

SNI – modelo de dor neuropática induzido pela lesão do nervo ciático com preservação do ramo sural (*spared nerve injury*)

SNL – modelo de dor neuropática induzido por ligação do nervo espinhal (*spinal nerve ligation*)

SOD – dismutase do superóxido

TH – transidrogenase

Trx – tiorredoxina-2

TrxR – redutase da tiorredoxina-2

WD – degeneração Walleriana

# **CAPÍTULO I**

## **Revisão Bibliográfica**



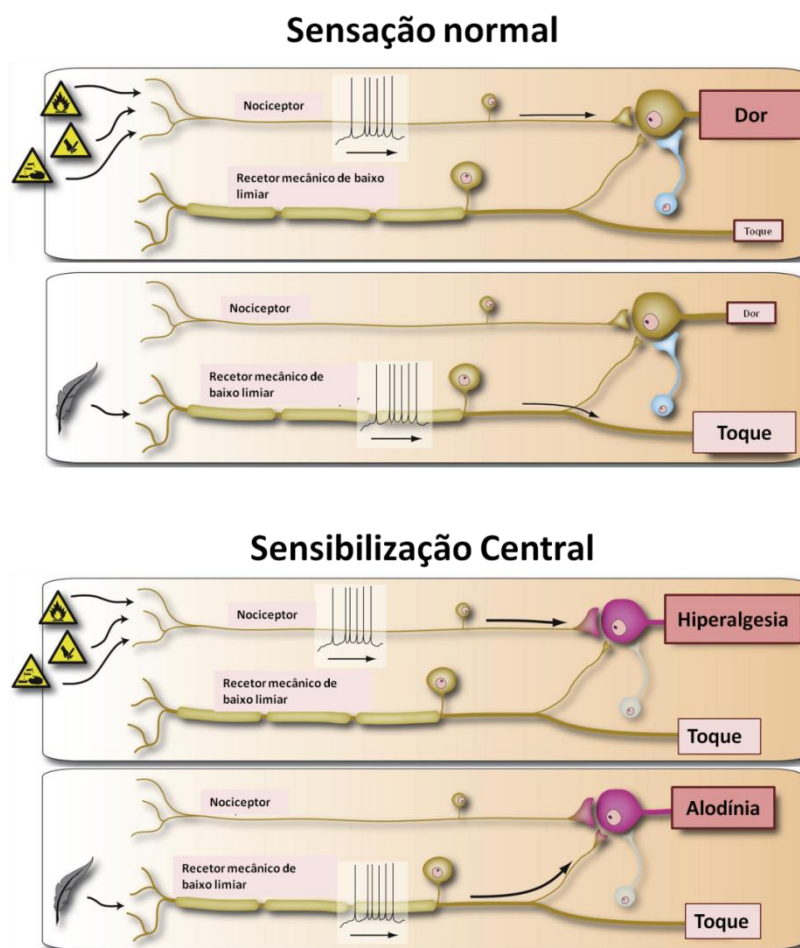
# 1. Introdução

## 1.1. Dor neuropática

A Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) define *dor* como uma sensação e experiência emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita nesses termos. Em condições fisiológicas, a dor constitui um mecanismo protetor do organismo, que o alerta para lesões reais ou potenciais, levando-o a defender-se com reflexos que têm como objetivo minimizar os danos provocados. Caso a lesão seja inevitável, ocorrem alterações, quer excitatórias quer inibitórias, no sistema nervoso central e periférico, que conduzem a uma hipersensibilidade reversível a estímulos dolorosos na área afetada, de modo a protegê-la, permitindo uma cicatrização mais eficaz dos tecidos. Ao contrário da dor fisiológica, as síndromes de dor persistente ou crónica causam sofrimento sem qualquer benefício biológico (Woolf & Mannion, 1999). Destas, a dor neuropática, um estado de dor crónica resultante de lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (Jensen *et al.*, 2011), é a mais comum. Esta síndrome caracteriza-se por alterações no sistema sensorial (Fig.1), compreendendo sintomas negativos, como a perda total ou parcial de sensibilidade, e sintomas positivos, que incluem disestesia (sensação desagradável ou dolorosa), hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo nódico) e alodínia (dor em resposta a um estímulo inócua) (Woolf & Mannion, 1999). A dor neuropática periférica afeta milhões de pessoas em todo o mundo (Dworkin *et al.*, 2007) e está associada a uma diminuição da qualidade de vida dos doentes (mais acentuada do que a observada em outros tipos de dor crónica), acarretando também elevados custos para a sociedade (Freynhagen & Bennett, 2009).

Os tratamentos disponíveis para controlar a dor neuropática são fundamentalmente sintomáticos, visando ajudar o doente a controlar ou minimizar a dor, sendo incapazes de a erradicar. Embora existam alguns fármacos com uma ação mais dirigida, estes são geralmente pouco eficazes, ou estão associados a efeitos secundários graves (Kuhlein *et al.*, 2011). Para que se desenvolvam terapêuticas mais eficazes é necessário compreender a relação entre a etiologia, mecanismos e sintomatologia da dor neuropática. Apesar do progresso científico na compreensão desta síndrome, os mecanismos pelos quais se desenvolve permanecem largamente por esclarecer (Kaur *et al.*, 2010), pelo que a dor

neuropática representa, atualmente, um desafio na investigação científica e no tratamento médico (Kaur *et al.*, 2010). De facto, apenas quando forem identificados os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de dor neuropática e existir a capacidade de os reverter é que se poderá evoluir no tratamento desta síndrome (Woolf & Mannion, 1999).



**Figura 1** – Diferenças entre o funcionamento do sistema somatossensorial antes e após lesão de um nervo periférico. Em condições fisiológicas, estímulos de alta e baixa intensidade são transmitidos por diferentes vias, que nunca se cruzam: os de alta intensidade (estímulos nócicos) conseguem ativar os nociceptores, originando dor, enquanto os de baixa intensidade (inócuos) são transmitidos às vias centrais através de neurónios primários especializados em codificar este tipo de estímulo, levando a sensações inócuas (toque). Após lesão do nervo, ocorre um aumento na frequência sináptica e diminuição dos circuitos inibitórios, causando uma amplificação central das respostas de dor a estímulos nócicos, em amplitude, duração e extensão espacial (hiperalgesia). Por outro lado, sinapses normalmente ineficazes recrutam estímulos subliminares, de forma que estímulos de baixa intensidade passam a ser capazes de ativar o circuito de dor (alodínia). A este processo dá-se o nome de sensibilização central. Imagem adaptada de Woolf, 2011.

Grande parte do progresso no conhecimento dos mecanismos de indução de dor neuropática advém do uso de modelos experimentais em roedores (Boyce-Rustay & Jarvis,

2009). Estes modelos recorrem a vários tipos de lesões nervosas, como lesão metabólica (por exemplo, tratamento com estreptozocina para indução de diabetes), química (por exemplo, tratamento com taxol, vincristina, paclitaxel) e mecânica. Os modelos mais usados são os mecânicos ou traumáticos, que consistem em lesões de nervo e podem ser agrupados de acordo com a localização (raiz ventral ou dorsal, nervo espinhal, gânglio raquidiano dorsal – DRG, ou nervos periféricos) e tipo de lesão (seccionamento, crioneurólise, ligação apertada ou solta, compressão, estimulação de inflamação perineuronal, invasão por células tumorais ou radiação por laser) (Klusakova & Dubovy, 2009). A maioria das experiências é feita na pata traseira do rato, por permitir fácil acesso cirúrgico e observação de respostas comportamentais provocadas, normalmente, por estímulos cutâneos mecânicos e térmicos e analisadas através de limiares de sensibilidade (Fazen & Ringkamp, 2007). Na Tabela I apresentam-se alguns dos modelos traumáticos de dor neuropática periférica em roedores mais comuns na literatura. Na escolha do modelo experimental deve-se ter sempre em conta que modelos baseados em diferentes tipos de lesão induzem comportamentos que traduzem diferentes mecanismos fisiopatológicos (Klusakova & Dubovy, 2009).

Os mecanismos subjacentes à dor neuropática estão relacionados com a sensibilização central e periférica (Guedes *et al.*, 2008) e provêm da libertação de mediadores inflamatórios no tecido afetado e de descargas ectópicas do nervo lesado, o que provoca um estado de hiperexcitabilidade nos cornos dorsais dos neurónios espinhais (Millan, 1999). Têm sido descritos vários mediadores e neurotransmissores que participam na dor neuropática (Woolf & Salter, 2000). Um dos mecanismos que mais contribui para o estado de hiperexcitabilidade e, conseqüentemente, desenvolvimento de dor neuropática consiste na perda dos circuitos inibitórios do corno dorsal da medula espinhal causada pela lesão (Braz *et al.*, 2012). A maior parte destes circuitos inibitórios envolvem interneurónios que expressam ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), cuja libertação espinhal se encontra reduzida em modelos de dor neuropática periférica (Moore *et al.*, 2002). As espécies reativas de oxigénio (ROS) têm sido também implicadas na fisiopatologia desta dor. O aumento da produção de ROS em áreas espinhais de processamento da dor tem sido amplamente descrito em modelos experimentais de dor crónica, bem como os efeitos anti-hiperalgésicos dos sequestradores de ROS, quer por via de administração sistémica, quer intratecal, sugerindo o envolvimento das ROS no processo de sensibilização central (Gao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006; Yowtak *et al.*, 2011).

**Tabela I. Modelos traumáticos de dor neuropática periférica em roedores**

Modelo/Definição	Mecanismos envolvidos/zonas afetadas <sup>a</sup>	Efeitos	Doenças correlacionadas	Vantagens/desvantagens
<b>Secção total do nervo ciático</b> (Wall <i>et al.</i> , 1979) Ligação e secção unilateral total do nervo ciático	Interrupção irreversível da transmissão aferente e eferente; geração de neuroma; coto distal afetado por WD <sup>b</sup> ~60% células do DRG afetadas; porção intermédia do nervo	Autotomia do membro desnervado; sensibilização mecânica e hiperexcitabilidade neuronal	Neuropatia do nervo fantasma, traumatismo de nervo ou lesão iatrogénica (Costigan <i>et al.</i> , 2009)	<i>Vant:</i> O comportamento de autotomia traduz disestesia ou dor espontânea, podendo ser utilizado como índice de DN (Koplovitch <i>et al.</i> , 2012) <i>Desv:</i> Impossível avaliar alodínia e hiperalgesia no membro desnervado; a utilização de modelos que causem autotomia tem sido questionada por razões éticas
<b>Lesão por constricção crónica (CCI)</b> (Bennett & Xie, 1988) Constricção unilateral do nervo ciático através de 4 anéis de sutura sem estrangulamento, a meio da coxa	Reação inflamatória local e edema; mistura de neurónios aferentes intactos e lesados no DRG associado; fibras intactas expostas a moléculas produzidas por WD das lesadas Afeta principalmente os axónios mielinizados de maior calibre; <30% células do DRG afetadas; porção intermédia do nervo	Alodínia mecânica e ao frio; hiperalgesia mecânica, térmica e química bilateral, durante vários meses	Síndrome do túnel cárpico (Costigan <i>et al.</i> , 2009), hérnia discal lombar, intoxicação por metais pesados, anóxia e doenças metabólicas (Niederberger <i>et al.</i> , 2008)	<i>Vant:</i> Adequado para estudo da contribuição da WD na indução da DN periférica <i>Desv:</i> Não permite distinguir entre componente inflamatória e lesão axonal na DN periférica; variabilidade na quantidade de axónios lesados
<b>Ligação parcial do nervo ciático (PSL)</b> (Seltzer <i>et al.</i> , 1990) Ligação unilateral de 33-50% do nervo ciático, na parte superior da coxa	Conservação das fibras grandes mielinizadas na parte intacta do nervo; mistura aleatória de neurónios aferentes lesionados em L4 e L5, bem como mistura de nervos lesionados e intactos; fibras intactas expostas a moléculas produzidas por WD das lesadas ~30% células do DRG afetadas; porção intermédia do nervo	Alodínia mecânica e ao frio; hiperalgesia mecânica e térmica, que surge pouco tempo depois da cirurgia e persiste por vários meses.	Contusão do nervo ciático (Klusakova & Dubovy, 2009); síndrome de dor regional complexa (Niederberger <i>et al.</i> , 2008)	<i>Vant:</i> Menor componente inflamatória que o modelo CCI <i>Desv:</i> Variabilidade na quantidade de axónios lesados; difícil especificar o DRG e segmento da medula espinhal relacionados com a lesão
<b>Lesão do ciático com preservação do sural (SNI)</b> (Decosterd & Woolf, 2000) Ligação e secção unilateral dos ramos tibial e peroneal comum, deixando o ramo sural intacto	Evita o contacto entre fibras lesionadas e intactas do nervo periférico, embora todos os neurónios sejam afectados no DRG, por aí haver mistura ~40% células do DRG afetadas; porção distal do nervo	Alodínia mecânica e ao frio e hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral, que surge pouco tempo depois da cirurgia e persiste por vários meses	Várias neuropatias periféricas (Costigan <i>et al.</i> , 2009).	<i>Vant:</i> modelo tecnicamente mais simples de desnervação parcial (Shields <i>et al.</i> , 2003), com variabilidade mínima do grau de lesão; permite a investigação do contributo dos aferentes primários lesados e dos intactos na fisiopatologia da dor (Fazen & Ringkamp, 2007); permite a realização de estudos de longa duração, devido à manutenção e estabilidade dos sintomas neuropáticos.
<b>Ligação do nervo espinhal (SNL)</b> (Kim & Chung, 1992) Ligação unilateral dos nervos espinhais dos segmentos L5 e L6	Num dado DRG, virtualmente todos os neurónios sensitivos primários estão ou intactos (L4) ou axotomizados (L5 e L6); os axónios intactos dos neurónios de L4 estão envolvidos num meio de WD ~100% células dos DRGs L5 e L6 afetadas; porção proximal do nervo	Alodínia mecânica e ao frio; hiperalgesia mecânica e térmica na pata ipsilateral, que surge pouco tempo depois da cirurgia e persiste por vários meses	Lesão do plexo nervoso ou da raiz dorsal (Niederberger <i>et al.</i> , 2008)	<i>Vant:</i> Permite distinguir o papel dos neurónios do DRG intactos vs axotomizados; modelo preciso e reprodutível; permite avaliar alterações na sensibilidade em dermatomas plantares (Fazen & Ringkamp, 2007) <i>Desv:</i> Cirurgia longa, de difícil execução e altamente invasiva (lesão de tecidos que podem afectar o DRG intacto próximo)

(a) Costigan *et al.*, 2009, Klusakova & Dubovy, 2009; (b) WD – degeneração Walleriana: conjunto de alterações moleculares e celulares que estimulam a regeneração dos axónios, atingindo neurónios lesados e neurónios intactos vizinhos

## 1.2. Espécies reativas de oxigênio

As ROS compreendem radicais livres e peróxidos, produzidos como intermediários nas reações de oxidação-redução (redox). São entidades químicas reativas e podem ser divididas em dois grandes grupos: os radicais livres (superóxido [ $O_2^{\bullet-}$ ], radical hidroxilo [ $HO^{\bullet}$ ], óxido nítrico [ $^{\bullet}NO$ ]) e os peróxidos que derivam do  $O_2$  (peróxido de hidrogênio [ $H_2O_2$ ], peroxinitrito [ $ONOO^-$ ]). Os radicais livres contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que os torna altamente reativos e, conseqüentemente, instáveis e de curta duração. Pelo contrário, os peróxidos são menos reativos, o que os torna mais estáveis e lhes confere uma maior duração (Paravicini & Touyz, 2008).

Em condições fisiológicas, as ROS existem em baixas concentrações, desempenhando um papel vital na modulação do estado redox de várias moléculas de sinalização intracelular e regulam processos celulares, como a diferenciação e proliferação celular, apoptose, migração, expressão gênica e organização do citoesqueleto (Takac *et al.*, 2012). O seu papel protetor contra patogêneos invasores representa outra função benéfica para o organismo (Brieger *et al.*, 2012). Em condições patológicas, contudo, os níveis de ROS aumentam devido à produção aumentada de oxidantes e/ou produção reduzida de antioxidantes (desequilíbrio redox ou stresse oxidativo). Esta situação afeta todos os processos celulares regulados pelas ROS, como por exemplo processos de sinalização celular (Stocker & Keane, 2004), podendo também provocar alterações na estrutura de macromoléculas sensíveis ao estado redox – proteínas, lípidos, nucleótidos – causando toxicidade celular (Wagner *et al.*, 1998). Com o intuito de contrariar e/ou reduzir o efeito tóxico das ROS, os sistemas biológicos possuem mecanismos de proteção, nomeadamente mecanismos de defesa antioxidantes, que podem ser enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são a dismutase do superóxido (SOD), a catalase e a peroxidase da glutatona (GPx). A SOD converte  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ , que é posteriormente reduzido a  $H_2O$  pela catalase e pela GPx. Paralelamente existem numerosas moléculas não enzimáticas que participam na remoção de ROS, tais como o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e a glutatona reduzida (GSH) (Paravicini & Touyz, 2008). Devido ao curto tempo de vida das ROS, a sua avaliação em modelos animais é de difícil execução, pelo que a avaliação do stresse oxidativo consiste, geralmente, na determinação indireta da sua biodisponibilidade, através da avaliação das atividades antioxidantes e da presença dos produtos das reações de oxidação das ROS. Assim, sabendo que as ROS são capazes de oxidar proteínas de sinalização celular, como fosfatases e cinases, e ativar a transcrição de

fatores pro-inflamatórios, como o NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) (Anrather *et al.*, 2006), a determinação de stresse oxidativo pode ser feita por avaliação da presença de produtos de oxidação proteica (marcador de oxidação proteica) e de peroxidação lipídica, mas também por avaliação de antioxidantes endógenos, como a atividade enzimática da SOD e da catalase (Varija *et al.*, 2009). Além dos métodos indiretos, a quantificação direta de ROS (como o  $O_2^{\cdot-}$  e o  $H_2O_2$ ) nos tecidos é também utilizada para a determinação de stresse oxidativo (Guedes *et al.*, 2008). O  $HO^{\cdot}$  é um dos principais causadores de dano em biomoléculas essenciais, tais como proteínas, lípidos de membrana e DNA (Valavanidis *et al.*, 2009). A sua interação com as bases da cadeia dupla de DNA, como a guanina, leva à formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG). Apesar do  $HO^{\cdot}$  reagir com outras bases do DNA de forma semelhante, a formação de 8OHdG é a mais estudada, uma vez que é formado *in vivo* e pode ser quantificado em células após a hidrólise do DNA (Valavanidis *et al.*, 2009). Desta forma, o 8OHdG constitui um dos marcadores de dano oxidativo mais utilizados para avaliar o stresse oxidativo em células e tecidos (Kim *et al.*, 2010).

Uma via de sinalização celular sensível ao desequilíbrio redox muito estudada é a via do  $^{\cdot}NO$  (Forstermann, 2010). Esta relaciona-se intimamente com o  $O_2^{\cdot-}$ , que pode reagir quimicamente e inativar o  $^{\cdot}NO$ , promovendo a produção de  $ONOO^-$  (Gryglewski *et al.*, 1986).

O uso de antioxidantes é uma estratégia frequentemente usada para reverter ou combater o stresse oxidativo. No entanto, os estudos clínicos da sua aplicação no tratamento de várias doenças cuja etiologia envolve o desequilíbrio redox (doenças cardiovasculares, por exemplo) têm revelado baixa eficácia terapêutica destas moléculas, embora estas consigam, quando utilizadas em concentrações elevadas, remover quimicamente as ROS, tanto *in vitro* como em modelos animais (Drummond *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que a inibição específica das enzimas responsáveis pela produção de ROS poderá ser uma melhor estratégia terapêutica contra o desequilíbrio redox, substituindo a atual estratégia de remoção das ROS depois de formadas (Drummond *et al.*, 2011). Esta abordagem implica o conhecimento das enzimas-chave responsáveis pela formação de ROS, bem como a sua localização celular.

### 1.3. Fontes de ROS

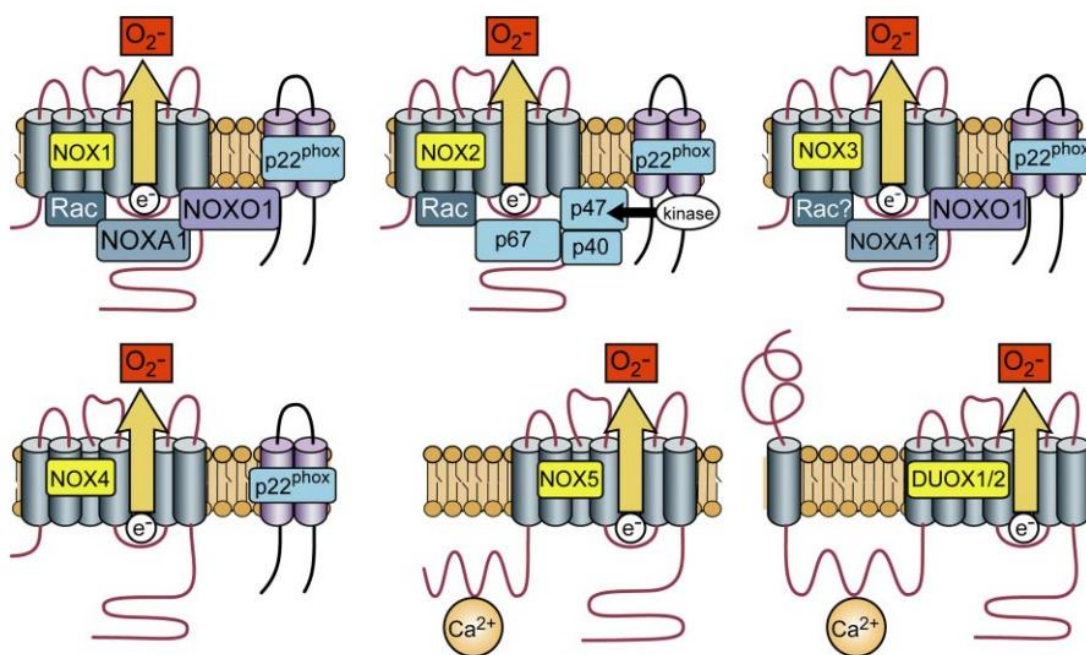
As ROS são formadas por variados tipos celulares, através da respiração celular e processos metabólicos, podendo também ser geradas pela radiação. Durante o processo de respiração celular, o  $O_2$  é reduzido através da sucessiva transferência de elétrons, sendo produzidos intermediários com número ímpar de elétrons que saem da cadeia respiratória (Brieger *et al.*, 2012). As ROS também podem ser produzidas a partir de processos metabólicos, como na reação de catabolismo de biomoléculas pelo peroxissoma, na qual ocorre a remoção de átomos de hidrogénio, gerando-se  $H_2O_2$ . De facto, um elevado número de enzimas (oxidase da xantina, sintetase de óxido nítrico [NOS], por exemplo) e organelos (mitocôndria, peroxissoma) produzem ROS como subprodutos da sua atividade (Brieger *et al.*, 2012; Paravicini & Touyz, 2008).

#### 1.3.1. Mitocôndria

A produção de ROS na mitocôndria é uma consequência da fosforilação oxidativa, sendo a taxa de formação do  $O_2^{\cdot-}$  proporcional à utilização de  $O_2$ . No entanto, este organelo possui múltiplos sistemas antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos (Fig.2). Um dos principais sistemas de defesa tem como objetivo evitar a peroxidação lipídica das membranas, através do  $\alpha$ -tocoferol (que reduz radicais lipídicos) e da GPx (que reduz  $H_2O_2$  a  $H_2O$ ). A segunda linha de defesa antioxidante atua diretamente nas ROS, facilitando a conversão do  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , pela SOD. A remoção do  $O_2^{\cdot-}$  também é realizada pelo citocromo c, localizado no espaço intermembranar mitocondrial, com produção de  $H_2O_2$ , convertido pela enzima catalase em  $O_2$  e  $H_2O$ . Estes sistemas possibilitam a existência de um equilíbrio entre a formação e a remoção de ROS, em situações fisiológicas (Park *et al.*, 2006; Szeto, 2006; Andreyev *et al.*, 2005).



duas subunidades ativadoras (p67<sup>phox</sup> e NOXA1) e dois fatores de maturação específicos para DUOX (DUOXA1 e DUOXA2) (Bedard & Krause, 2007). Todos os membros da família NOX são proteínas transmembranares, que transportam elétrons do NADPH citosólico até ao meio extracelular ou ao lúmen de organelos. Quando as enzimas são ativadas, os elétrons são transportados do NADPH citosólico e transferidos ao longo de uma cadeia transportadora de elétrons contida na subunidade catalítica. O oxigénio atua como aceitador final dos elétrons, produzindo-se O<sub>2</sub><sup>-</sup> (no caso das oxidases NOX1, NOX2 e NOX5) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (no caso da NOX4, DUOX1 e DUOX2) (Drummond *et al.*, 2011).

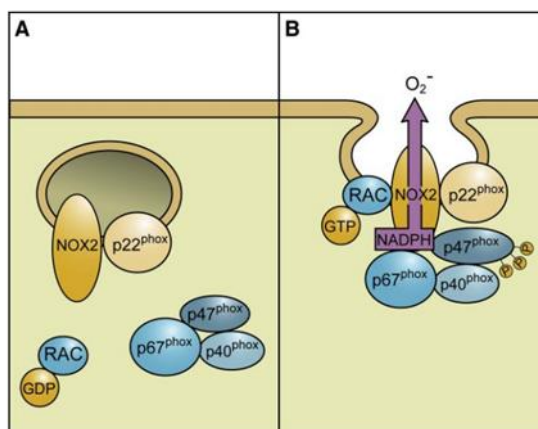


**Figura 3** – Mecanismos de ativação das isoformas da oxidase do NADPH. Apesar de possuírem estrutura e funções idênticas, a ativação requer diferentes subunidades ou outros componentes, dependendo da isoforma. NOX1, NOX2, NOX3 e NOX4 são isoformas dependentes da p22<sup>phox</sup>. A ativação de NOX2 depende da fosforilação da subunidade p47<sup>phox</sup>. A NOX5 e as DUOX1 e DUOX2 são dependentes apenas do íon cálcio. Imagem adaptada de Bedard & Krause, 2007.

Apesar de apresentarem estrutura e funções idênticas, as enzimas da família NOX apresentam diferentes mecanismos de ativação (Bedard & Krause, 2007) (Fig.3). As proteínas envolvidas na ativação das NOX incluem a subunidade membranal p22<sup>phox</sup>, que ajuda a estabilizar o domínio catalítico e funciona como âncora para as proteínas citosólicas p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, RacGTPase (proteína pequena de ligação ao GTP), e a subunidade moduladora p40<sup>phox</sup>. São estas subunidades que, em conjunto, levam à ativação das enzimas NOX. A estimulação celular leva à translocação da p47<sup>phox</sup> para a membrana. Devido à sua ligação com a p67<sup>phox</sup>, esta subunidade também é transportada, considerando-

se que a p47<sup>phox</sup> desempenha um papel *organizador*. Na membrana, a p67<sup>phox</sup> interage diretamente com a subunidade catalítica, desempenhando um papel *ativador* (Bedard & Krause, 2007). Diferentes isoformas possuem mecanismos de ativação distintos e requerem diferentes subunidades.

A oxidase NOX2 foi a primeira isoforma identificada, sendo por isso a mais estudada até agora. Embora descrita pela primeira vez em neutrófilos e macrófagos, a sua expressão tem sido observada também em células não fagocíticas, como neurónios, fibras musculares cardíacas e esqueléticas, hepatócitos, células endoteliais e hematopoiéticas (Bedard & Krause, 2007). A perda de função da NOX2 está associada a uma patologia humana – doença granulomatosa crónica, estando descrito também o seu papel no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (Sorce & Krause, 2009). Como ilustra a Figura 4, a NOX2 está associada à p22<sup>phox</sup>, formando um complexo membranar estável. A ativação desta NOX inicia-se com a transformação de GDP em GTP na proteína Rac, que se liga ao complexo NOX2/p22<sup>phox</sup>. Segue-se a fosforilação da subunidade citosólica p47<sup>phox</sup>, o que origina alterações conformacionais, permitindo a interação com a p22<sup>phox</sup>. Uma vez que as subunidades citosólicas p67<sup>phox</sup> e p40<sup>phox</sup> se encontram acopladas à p47<sup>phox</sup>, a ligação desta à p22<sup>phox</sup> dá origem ao complexo enzimático ativo da NOX2. Após ativação, ocorre uma fusão entre as vesículas que contêm NOX2 e a membrana plasmática, permitindo o transporte de eletrões do NADPH citosólico para o oxigénio extracelular (Bedard & Krause, 2007).

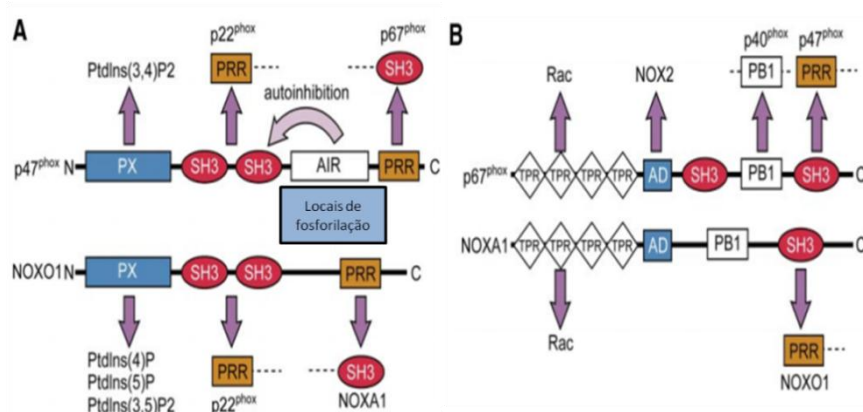


**Figura 4** – Mecanismo de ativação da NOX2. (A) Conformação das estruturas citosólicas em situação de repouso. (B) Complexo ativo da NOX2, com formação de superóxido, devido ao transporte de eletrões do NADPH citosólico para o oxigénio extracelular. Imagem adaptada de Bedard & Krause, 2007.

A oxidase NOX1 foi o primeiro homólogo da NOX2 a ser descrito, contendo uma sequência proteica com um grau de similaridade elevado em relação à NOX2 (Banfi *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 1999). Esta isoforma é maioritariamente expressa no epitélio do cólon, sendo também expressa em células endoteliais (Drummond *et al.*, 2011), útero, placenta, próstata, osteoclastos e células do músculo liso (Bedard & Krause, 2007). Além da sua expressão constitutiva nestes tecidos, a expressão de NOX1 é induzida pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), pela prostaglandina F<sub>2α</sub> e pela angiotensina II (Bedard & Krause, 2007), estando descrito o seu envolvimento na promoção da sensibilidade à dor inflamatória (Sorce & Krause, 2009).

A ativação da NOX1 depende de subunidades citosólicas – uma organizadora (NOXO1) e outra ativadora (NOXA1) – e de uma subunidade membranar, p22<sup>phox</sup>. A NOXO1 tem um papel organizador idêntico à subunidade p47<sup>phox</sup> da NOX2, possuindo um elevado grau de similaridade nos seus domínios funcionais (Fig.5). Ambas possuem um domínio phox, que interage com a membrana fosfolipídica; dois domínios SH3, que reagem com as regiões ricas em prolina da p22<sup>phox</sup>; e um terminal rico em prolina, que interage com os domínios SH3 das subunidades ativadoras NOXA1 e p67<sup>phox</sup>. A p47<sup>phox</sup> possui uma região autoinibitória (AIR), inexistente na NOXO1, responsável por assegurar que a ativação da NOX2 apenas ocorre quando existe fosforilação e alteração conformacional da p47<sup>phox</sup>. A NOXA1 possui um papel idêntico à subunidade ativadora da NOX2 – p67<sup>phox</sup>. Ambas partilham alguns domínios: repetição do terminal NH<sub>2</sub> (TPR), que interage com a Rac; domínio de ativação altamente conservado (AD); domínio pouco conservado phox e Bem1 (PB1); e domínio SH3 (um domínio na NOXA1 e dois na p67<sup>phox</sup>), que interage com as repetições ricas em prolina das subunidades organizadoras p47<sup>phox</sup> ou NOXO1.

Apesar da estrutura e interações proteicas das subunidades ativadoras das NOX1 e NOX2 serem similares, existem algumas diferenças entre elas. Na NOXA1, o domínio PB1 é incapaz de se ligar à p40<sup>phox</sup>, ação vital para a ativação da NOX2 (Bedard & Krause, 2007). A subunidade membranar p22<sup>phox</sup>, presente na NOX2 e NOX1, tem como funções estabilizar as proteínas e interagir com as suas subunidades organizadoras p47<sup>phox</sup> e NOXO1, respetivamente (Bedard & Krause, 2007).

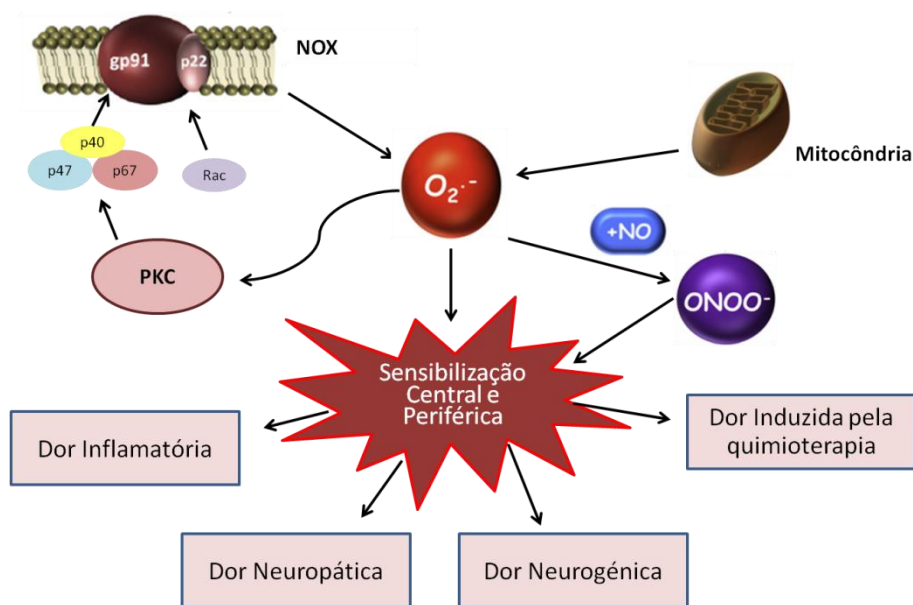


**Figura 5** – Interações moleculares das subunidades citosólicas da NOX1 e NOX2. (A) Estrutura das subunidades organizadoras p47<sup>phox</sup> e NOXO1. (B) Estrutura das subunidades de ativação p67<sup>phox</sup> e NOXA1. Imagem adaptada de Bedard & Krause, 2007.

A oxidase NOX4 foi denominada como oxidase renal, devido à sua elevada expressão neste órgão. Ao contrário da NOX1 (que é bastante semelhante à NOX2), a NOX4 apresenta apenas 39% de identidade com a NOX2. O RNA mensageiro da NOX4 foi encontrado em osteoclastos, células endoteliais, hematopoiéticas e de músculo liso, fibroblastos e queratinócitos (Ibi *et al.*, 2008). Relativamente ao sistema nervoso central, está descrita a presença desta isoforma em neurónios, astrócitos e microglia, tendo sido sugerido o seu papel na produção de ROS na microglia ativada (Sorce & Krause, 2009). Conforme já referido, ao contrário das NOXs 1 e 2, cujo produto final é o  $O_2^{\cdot-}$ , a NOX4 está associada à produção de  $H_2O_2$  (Ago *et al.*, 2011; Bedard & Krause, 2007), embora não exista evidência da sua produção direta (Bedard & Krause, 2007; Touyz, 2008). Bedard & Krause sugerem que a deteção de maior quantidade de  $H_2O_2$  após ativação da NOX4 pode dever-se à localização intracelular desta isoforma, que resulta na libertação de  $O_2^{\cdot-}$  e sua rápida transformação em  $H_2O_2$  (Bedard & Krause, 2007). A ativação da NOX4 requer a presença de p22<sup>phox</sup>, sendo independente das subunidades citosólicas. Apesar de alguns estudos sugerirem que esta isoforma é constitutivamente ativa (Martyn *et al.*, 2006), existem dados controversos que consideram a sua ativação dependente de Rac1, nomeadamente sob estimulação da angiotensina II e de níveis elevados de glucose (Bedard & Krause, 2007).

## 1.4. Papel das ROS na dor crónica

As ROS têm sido implicadas no desenvolvimento de dor crónica, sabendo-se que estão envolvidas no aumento da sensibilização central em modelos de dor neuropática e inflamatória (Gao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2009; Doyle *et al.*, 2010) (Fig.6). A contribuição das ROS para o desenvolvimento de sensibilização central e periférica associada à dor, e o facto de a sua inibição farmacológica prevenir e reverter patologias associadas à dor inflamatória e dor neuropática, constituem evidência da sua importância como alvos para o tratamento da dor. Pensa-se que espécies como o  $O_2^{\cdot-}$  e o  $ONOO^-$  afetem diferentes vias associadas ao desenvolvimento de sensibilização central, quer na medula espinhal, quer em áreas supraespinhais (Salvemini *et al.*, 2011).



**Figura 6** – A mitocôndria e as NOXs são os principais produtores do anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que, quer diretamente, quer através da reação com o óxido nítrico (NO) e subsequente produção de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), conduz ao desenvolvimento da sensibilização central e periférica associada à dor de diferentes etiologias. A libertação de ROS induz a fosforilação das subunidades citosólicas p47 da NOX pela proteína cinase C (PKC), contribuindo para a amplificação do fenómeno. Imagem adaptada de Salvemini *et al.*, 2011.

O papel das NOXs no desenvolvimento de dor crónica tem vindo a ser estudado em modelos animais de dor neuropática e inflamatória, sugerindo a sua importante participação no desenvolvimento destes tipos de dor (Stocker & Keaney, 2004; Yowtak *et*

*al.*, 2011; Takac *et al.*, 2012; Cheret *et al.*, 2008). Estudos recentes sugerem que a NOX2 é expressa na microglia, promovendo a produção de compostos pró-inflamatórios (Cheret *et al.*, 2008) e que, em estados precoces da dor neuropática, a NOX2 é expressa nas células microgliais da medula espinhal (Kim *et al.*, 2010), o que comprova a importância das ROS produzidas por esta isoforma na indução e desenvolvimento de dor. Por outro lado, Ibi *et al.*, que demonstraram pela primeira vez o envolvimento da NOX1 no desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica num modelo de dor inflamatória, descrevem a NOX1 como uma das principais fontes produtoras de ROS implicadas neste tipo de dor (Ibi *et al.*, 2008), enquanto Chéret *et al.* demonstraram que a microglia ativada expressa não só NOX2 mas também NOX1, que catalisa a produção de superóxido (Cheret *et al.*, 2008). Além das isoformas 1 e 2, a NOX4 tem vindo a ser recentemente alvo de estudos em condições de dor crónica. Um estudo de Kallenborn-Gerhardt *et al.* com um *knock-out* para a NOX4 revelou que esta isoforma está envolvida na manutenção da dor neuropática, embora não possua um papel preponderante na sua indução (Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2012). Embora os mecanismos não estejam totalmente esclarecidos, este estudo salientou o papel do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela NOX4 na desmielinização das fibras nervosas, o que, por sua vez, contribui para a dor neuropática induzida pela lesão de nervos periféricos (Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2012). Em resposta à lesão periférica, as células de Schwann são ativadas e modificadas, resultando na alteração das propriedades de condução das fibras nociceptivas. Segundo Kobayashi *et al.*, a degradação da mielina nos aferentes A $\beta$  promove a suscetibilidade a estímulos nociceptivos, levando à alodínia mecânica (Kobayashi *et al.*, 2008).

Perante a evidência de que as isoformas NOX1, NOX2 e NOX4 funcionam como importantes fontes de ROS em condições de dor crónica, afigura-se-nos imperativo tentar compreender melhor o seu papel no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Um estudo anterior do nosso grupo avaliou o efeito da apocinina, uma substância que previne a ativação da NOX por inibição da translocação das subunidades citosólicas p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup> para o complexo membranar NOX/p22<sup>phox</sup> (Touyz, 2008), em animais com dor neuropática. A administração oral de apocinina em animais submetidos à cirurgia SNI melhorou, embora só parcialmente, os sintomas de neuropatia e a disfunção redox na medula espinhal (Pinho *et al.*, 2012). O facto de a apocinina poder estimular a produção de ROS em células não-fagocíticas, apesar de inibir a NOX nas células fagocíticas (Vejrazka *et al.*, 2005; Riganti *et al.*, 2006), e apresentar uma baixa potência na inibição da isoforma

NOX4 (que não requer a translocação das subunidades citosólicas para a sua ativação), podem justificar a sua baixa eficácia terapêutica. Assim, é de fulcral importância desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes, como a utilização de inibidores específicos para as isoformas da NOX envolvidas e o uso de vias de administração mais adequadas, como a administração intratecal.

Vários estudos realizados em modelos animais de dor neuropática descrevem aumento das ROS mitocondriais em neurónios do corno dorsal da medula espinhal (Park *et al.*, 2006). Além disso, sabe-se também que a microglia se encontra bastante ativa no corno dorsal da medula espinhal de ratos com neuropatia, sugerindo o seu papel no desenvolvimento desta síndrome (Mika *et al.*, 2009, Gwak *et al.*, 2011). Uma vez que existe também evidência de que tanto os neurónios como as células gliais possuem NOXs funcionais (Doyle *et al.*, 2010), ambas as populações celulares poderão estar envolvidas na fisiopatologia da doença, independentemente da fonte principal de ROS envolvida. Torna-se assim importante “mapear” no espaço e no tempo a disfunção redox na medula espinhal durante o processo de indução e manutenção da dor neuropática periférica, caracterizando as ROS, as suas fontes principais e os tipos celulares envolvidos em várias fases do desenvolvimento desta síndrome.

Tendo em conta os parâmetros que se pretendem avaliar e as características dos diferentes modelos animais de dor neuropática periférica apresentados na tabela I, foi utilizado o modelo SNI neste estudo. Além de ser de fácil execução (Shields *et al.*, 2003) e de possibilitar a avaliação do contributo, quer dos aferentes lesados, quer dos intactos na indução e desenvolvimento da dor (Fazen & Ringkamp, 2007), este modelo permite manter o estado de neuropatia por longos períodos de tempo, possibilitando o estudo de fases avançadas da dor neuropática (Decosterd & Woolf, 2000). Uma importante vantagem da utilização deste modelo consiste na sua capacidade de mimetizar muitos sintomas observados na clínica em doentes com dor neuropática, tais como alodínia e hiperalgesia mecânica e alodínia ao frio (Decosterd & Woolf, 2000), e apresentar uma boa robustez e reprodutibilidade das alterações comportamentais.



## Objetivos

A presente tese integra-se num projeto maior que tem como objetivo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes no tratamento da dor neuropática, através da modulação das principais fontes de ROS no sistema somatossensorial. Trata-se da caracterização da disfunção redox e o seu papel em várias fases do desenvolvimento de dor neuropática.

Nesta fase do trabalho propusemo-nos a identificar a origem e localização celular das ROS na medula espinhal de ratos com dor neuropática, para que seja possível desenvolver, numa fase posterior, métodos de inibição específicos para as moléculas responsáveis pela produção de ROS e avaliar a sua eficácia enquanto estratégia terapêutica.

Usando o modelo SNI de dor neuropática periférica propusemo-nos a:

1. Avaliar o dano oxidativo do DNA e o stresse nitrosativo na medula espinhal em várias fases do desenvolvimento da dor neuropática (1, 3, 7 e 14 dias após SNI).
2. Avaliar a perceção dolorosa dos animais nas mesmas fases do desenvolvimento da dor neuropática e correlacioná-la com os parâmetros oxidativos determinados na medula espinhal.



## **CAPÍTULO II**

### **Material e Métodos**



## 2. Material e Métodos

### 2.1 Planeamento experimental e análise estatística

Neste trabalho procedemos à caracterização da evolução temporal da dor neuropática desde fases precoces após a sua indução até fases mais tardias, de manutenção. Esta caracterização incluiu avaliação comportamental e estudo da disfunção redox na medula espinhal. Desta forma, analisámos o comportamento animal até 14 dias após lesão neuropática e avaliámos o stresse oxidativo na medula espinhal, determinando o dano nitrosativo e oxidativo no corno dorsal da medula. Apesar de os marcadores escolhidos estarem já descritos na literatura, a implementação destas técnicas acarretou dificuldades várias, que nos obrigaram a passar uma fase extensa de otimização de condições experimentais.

O primeiro conjunto de animais (n=32) foi distribuído aleatoriamente por 3 grupos distintos: grupo SNI (animais submetidos a cirurgia para lesão dos ramos tibial e peroneal comum do nervo ciático, n=14), grupo *sham* (animais submetidos a cirurgia semelhante, mas sem lesão de qualquer nervo, n=12) e grupo *naïve* (animais sem qualquer tipo de manipulação cirúrgica, n=6). Por sua vez, os animais dos grupos SNI e *sham* foram distribuídos por três grupos diferindo entre si no tempo decorrido entre a indução da neuropatia e o momento do seu sacrifício (1, 3 ou 7 dias). Entretanto, após analisar os resultados obtidos com estes animais, decidimos estender a análise da disfunção redox e do comportamento até aos 14 dias, pelo que se formou um segundo conjunto de animais (n=32), que foram distribuídos de forma idêntica à descrita para o primeiro conjunto, com animais *naïve* (n=4), SNI (n=14) e *sham* (n=14), sendo estes dois últimos grupos divididos em animais sacrificados aos 3, 7 e 14 dias.

Considerando a existência de dois fatores em estudo, o tratamento e o tempo de neuropatia, a análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância bifatorial, sempre que as condições necessárias para aplicação deste método se verificaram, e pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos fatores separadamente, nos restantes casos. Esta informação aparecerá na legenda dos gráficos dos vários parâmetros medidos, na secção *Resultados*. As comparações múltiplas foram feitas com os testes *post-hoc* Student Newman-Keuls (SNK), após a análise de variância bifatorial, e

Dunn, após a análise não-paramétrica. Para as comparações entre os resultados dos membros *ipsi* e *contralateral* utilizámos o teste *t*. As correlações entre os diferentes protocolos e entre os segmentos lombares e cervicais da medula espinhal foram realizadas com o teste de *Pearson*, uma vez que os valores apresentaram uma distribuição normal. Foi usado um nível de significância de 95%.

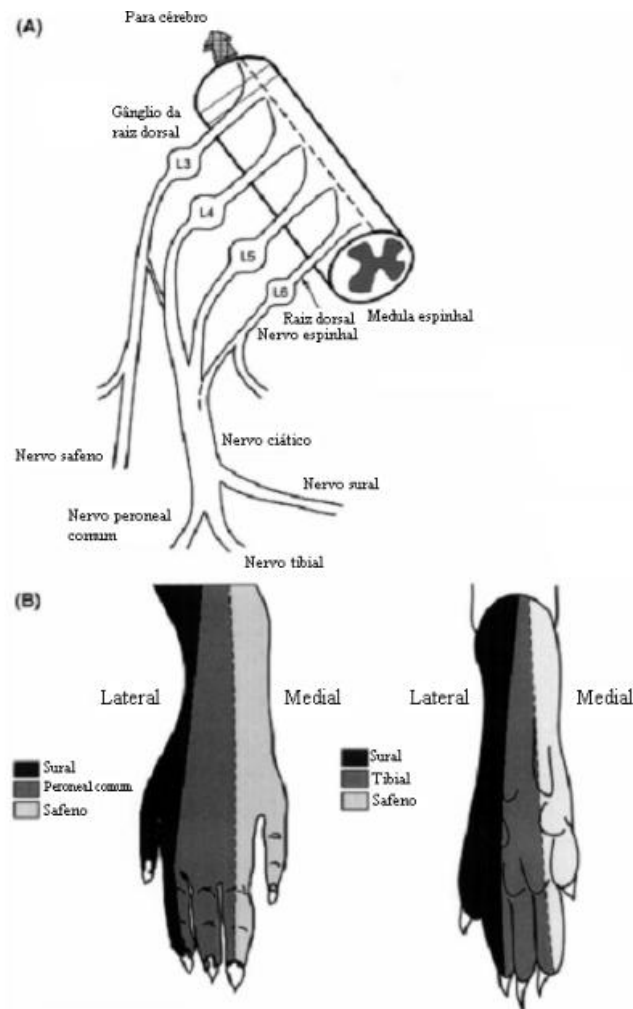
## 2.2 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos machos adultos Wistar Han (Charles River, Leon, França) com peso entre 250 e 300 g. Os animais foram colocados em gaiolas com livre acesso a água e comida, numa sala com temperatura (22–24°C) e fotoperíodo (ciclos alternados de 12h de luz e 12h escuro) controlados. Por razões de bem-estar animal e para reduzir o seu stresse, os animais foram alojados aos pares e, antes do início da experiência, todos os animais foram habituados ao ambiente experimental e ao experimentador. Foram tomadas medidas adequadas para minimizar a dor e desconforto dos animais, sendo todos os procedimentos realizados de acordo com as normas das autoridades locais para o manuseamento de animais de laboratório, com a diretiva europeia 2010/63/EU e com as normas éticas da IASP para o estudo experimental da dor em animais despertos (Zimmermann, 1983).

## 2.3 Indução da dor neuropática

Sob ação de uma mistura anestésica de cetamina e medetomidina (60 e 0.25 mg/kg, respetivamente; i.p.), os animais foram sujeitos às cirurgias SNI ou *sham*, de acordo com os diferentes grupos experimentais. A cirurgia SNI compreendeu a ligação e axotomia dos nervos tibial e peroneal comum, deixando o nervo sural intacto (Decosterd & Woolf, 2000) (Fig.7). Sucintamente, fez-se uma incisão na pele da superfície lateral da coxa esquerda e uma secção através do músculo bicípíte femoral, sem atingir o gastrocnémio; procedeu-se então ao isolamento dos nervos tibial e peroneal comum, que foram ligados com seda 5.0 e seccionados distalmente à ligação, removendo-se 2–4 mm de coto distal do nervo, evitando contacto e/ou estiramento do nervo sural intacto. Finalmente, o músculo e a pele foram suturados em duas camadas. Desta forma, os animais desenvolvem dor na parte lateral da pata, local correspondente ao ramo sural intacto. Os animais *sham* foram submetidos a um

procedimento em tudo idêntico, omitindo-se apenas as partes de ligação e secção dos ramos peroneal comum e tibial.



**Figura 7** – (A) Diagrama da neuroanatomia da pata posterior do rato. (B) Esquema das diferentes zonas das superfícies dorsal e plantar da pata do rato, inervadas pelos ramos terminais do nervo ciático (sural e peroneal comum) e nervo safeno. Adaptado de Decosterd & Woolf, 2000.

## 2.4 Avaliação comportamental

As respostas comportamentais a estímulo mecânicónóxico (teste *pinprick*) e não nóxico (filamentos de von Frey), e a estímulo térmico frio (teste de acetona) foram avaliadas 1, 3, 7 e 14 dias após cirurgia, de uma forma independente. Para a realização dos testes, os animais foram colocados sobre uma grelha elevada, protegidos por uma cúpula

transparente, visando a sua contenção. Os testes foram realizados em ambas as patas posteriores (na superfície plantar lateral, que corresponde à zona de inervamento sural), de forma a comparar as respostas do lado ipsi e contralateral.

O teste de von Frey, que avalia a alodínia mecânica, foi realizado como anteriormente descrito (Decosterd & Woolf, 2000). Resumidamente, o teste consistiu na estimulação da pata com 14 monofilamentos de vários calibres, que exercem forças entre 0.008 e 10.0 g (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical, Morgan Hill, CA, EUA). Os filamentos foram aplicados por ordem crescente, com um intervalo de aproximadamente 2 min entre filamentos, registando-se o limiar de von Frey (VFT), que corresponde à menor força capaz de evocar uma resposta de retirada da pata (Decosterd & Woolf, 2000). O teste foi realizado duas vezes com um intervalo de pelo menos 10 minutos. A análise dos resultados foi feita após transformação logarítmica dos limiares, sendo que os resultados finais para cada rato consistem na média dos valores dos logaritmos para cada pata.

O teste de acetona, que avalia a alodínia ao frio (Decosterd & Woolf, 2000), consiste na aplicação de uma gota de acetona na área experimental. Para tal, usámos uma seringa de plástico evitando qualquer contacto desta com a pele. Os resultados finais foram dados pela percentagem de respostas de retirada de cada pata durante e/ou imediatamente após a evaporação da acetona, num total de 10 estímulos (intervalo de 2 minutos entre estímulos).

Para avaliar a hiperalgesia mecânica foi utilizado o teste de *pinprick* (Tal & Bennett, 1994), que consiste na estimulação da pata com uma agulha de ponta romba, registando-se o tempo de duração da reação do animal, ou seja, o tempo que o animal permanece com a pata levantada após o estímulo. Para evitar contabilização de tempos extremamente longos não relacionados com dor mas com mudanças posturais dos animais, todos os tempos de reação superiores a 20 s foram registados como “20 s”. O teste foi realizado duas vezes com um intervalo de pelo menos 10 minutos. Os resultados finais para cada animal consistem na média dos tempos de reação que o animal apresentou para cada pata em cada um dos ensaios.

Para evitar comportamentos relacionados com stresse que possam confundir os resultados, além do período de habituação prévia dos animais ao experimentador e aos procedimentos experimentais, deixámos o animal adaptar-se ao ambiente experimental antes de cada teste, até cessar toda a actividade exploratória (durante cerca de 10 minutos).

## 2.5. Avaliação do dano oxidativo na medula espinhal

Após a avaliação comportamental, os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg i.p.) e perfundidos através da aorta ascendente com 150 mL de solução de Tyrode e 750 mL de fixador (paraformaldeído a 4%). As medulas espinhais foram recolhidas, pós-fixadas no mesmo fixador e mantidas em solução de sacarose 30%, a 4 °C. Os segmentos lombares L4 e L5, bem como alguns segmentos cervicais de cada animal foram criossecionados, obtendo-se cortes coronais de 40 µm, para o primeiro grupo de animais, e de 20 µm, para o segundo. Os cortes do primeiro grupo foram usados para quantificar o 8OHdG (marcador de dano oxidativo no DNA). No segundo grupo avaliou-se não só o 8OHdG, mas também a nitrotirosina (marcador de peroxinitrito). Estas avaliações foram realizadas imunohistoquimicamente, usando o método de avidina-biotina (ABC).

Resumidamente, a técnica de imunohistoquímica iniciou-se com a lavagem dos cortes em tampão fosfato salino a 0,1M (PBS), tendo-se seguido a inibição das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 1%, diluído em PBS. Após nova lavagem com PBS e PBS com 0,3% de Triton (PBST), procedeu-se ao bloqueio das reacções inespecíficas, através da incubação com uma solução de soro normal de porco (NSS) a 10%, diluído em PBST. Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário monoclonal de rato anti-8OHdG clone 2E2 (TV4354-MC, Trevigen, Gaithersburg, MD, EUA) ou nitrotirosina clone 2A8.2 (diluição de 1:3000, MAB 5404, Merck Millipore, Billerica, MA, EUA), sendo a diluição executada em PBST, com 2% de NSS. A incubação do anticorpo primário foi realizada durante aproximadamente 36 horas, a 4°C. De seguida, procedeu-se a nova lavagem com PBST com 2% de NSS e à incubação do anticorpo secundário biotilado anti-rato, produzido em coelho (diluição de 1:200, Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 1 hora. Após novas lavagens, foi realizada a incubação do complexo ABC (diluição de 1:200, Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 1 hora. Por fim e após novas lavagens em PBST e PBS, foi realizada a revelação com diaminobenzidina, que confere uma coloração castanha aos locais onde ocorreu a reacção. Os cortes foram montados em lâminas de gelatina com Eukitt (Kindler, Friburgo, Alemanha) e fotografados através do microscópio Nikon Eclipse E200 com a câmara digital a cores DFK 41F02 (Imaging Source, Bremen, Alemanha). A análise das imagens foi efetuada por densitometria, através do *software* Image J (programa de processamento de imagem de domínio público, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde, EUA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Apenas foram analisados os cornos dorsais da medula espinhal, uma vez que constituem a área sensitiva primária, local onde se localizam as terminações nervosas dos neurónios aferentes primários, que transmitem as informações sensitivas provenientes da periferia. Além disso, é também nesta área que terminam muitas fibras descendentes que modulam a transmissão de informação sensitiva, sendo reconhecida a importância desta área no processamento e transmissão da informação nocicetiva e o seu papel fundamental na fisiopatologia da dor (Melzack & Wall, 1965). A análise foi feita considerando duas zonas no corno dorsal: as lâminas superficiais (I e II) e as lâminas profundas (III-VI).

### **2.5.1. Otimização e controlos da técnica de imunohistoquímica**

Na reação para deteção da nitrotirosina utilizou-se um controlo positivo, constituído por cortes de medula espinhal previamente incubados numa solução de peroxinitrito (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). Os controlos negativos para ambas as reações foram constituídos por cortes de medula espinhal submetidos a todas as etapas da reação, exceto a incubação com o anticorpo primário.

No processo de otimização do protocolo experimental para a deteção imunohistoquímica do marcador 8OHdG, foram testadas duas variáveis: a espessura dos cortes e a diluição do anticorpo primário, tendo-se constituído três protocolos distintos, que se apresentam de seguida.

- Protocolo 1 – Cortes de 40  $\mu$ M  
– Diluição do anticorpo primário anti-8OHdG, 1:1600
- Protocolo 2 – Cortes de 20  $\mu$ M  
– Diluição do anticorpo primário anti-8OHdG, 1:1600
- Protocolo 3 – Cortes de 20  $\mu$ M  
– Diluição do anticorpo primário anti-8OHdG, 1:2500

## **CAPÍTULO III**

### **Resultados**



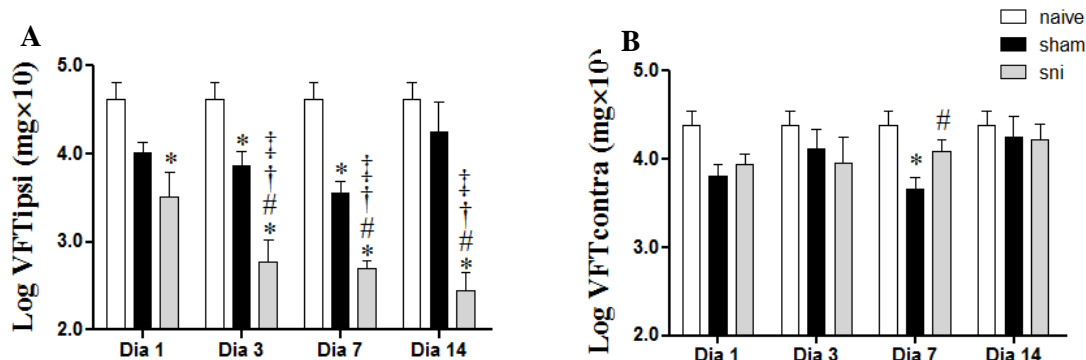
## 3. Resultados

### 3.1. Avaliação comportamental

Os testes comportamentais efetuados permitiram avaliar a perceção pelos animais de dois tipos de estímulos: mecânico e frio. Os testes foram efetuados aos dias 1, 3, 7 e 14 após a cirurgia SNI, o que permitiu perceber a evolução dos sintomas ao longo do desenvolvimento da dor neuropática. Um dia após a cirurgia todos os animais submetidos a intervenção cirúrgica (SNI e *sham*) apresentavam sinais de desconforto na pata esquerda (ipsilateral), nomeadamente a claudicação. Nos restantes tempos avaliados os animais SNI continuaram a apresentar sinais de dor, tais como a eversão da pata afetada e o facto de evitarem o contacto da parte lateral da mesma com qualquer superfície. Este facto não foi observado nos animais *sham*, cuja marcha se apresentou sempre normal. A evolução ponderal dos animais, bem como a sua interação social, foram semelhantes entre os vários grupos experimentais.

#### 3.1.1. Teste de vonFrey

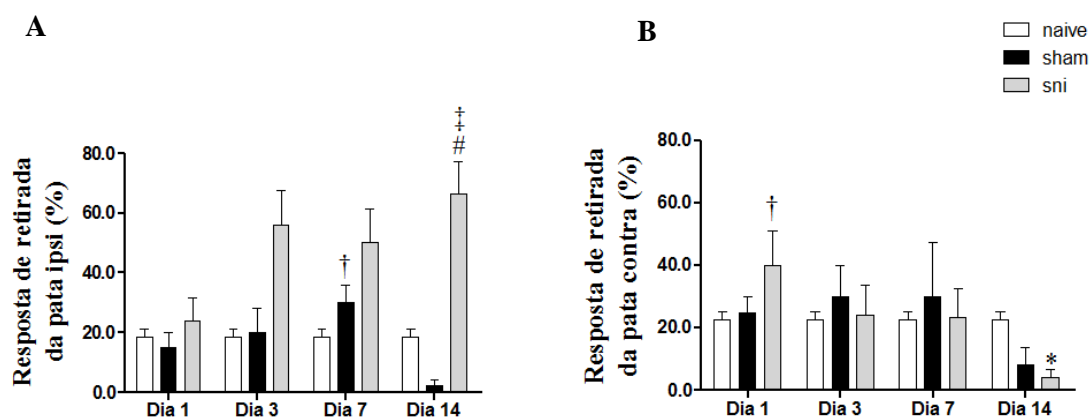
Os resultados do teste de vonFrey, que avalia a sensibilidade a estímulos mecânicos não nódicos, revelaram diferenças significativas entre grupos experimentais (Fig.8). Na pata ipsilateral, o grupo SNI apresentou limiares inferiores aos restantes grupos – *sham* e *naïve* – ao longo de todo o estudo, tendo o grupo *sham* apresentado um limiar mais próximo dos animais *naïve*. Os animais SNI apresentaram um limiar de vonFrey menor do que os animais *naïve* em todos os tempos estudados. No entanto, apenas se observaram diferenças entre o grupo SNI e *sham* a partir do dia 3, sendo o limiar dos animais SNI menor. É ainda de salientar que os animais *sham* também apresentaram um menor limiar de vonFrey do que os *naïve*, nos dias 3 e 7 após a cirurgia. No que respeita à evolução ao longo do tempo, verificámos que os limiares de vonFrey nos animais SNI foram menores nos dias 3, 7 e 14 do que no dia 1. A comparação entre as patas ipsi e contra de cada animal revelou um menor limiar das patas ipsilaterais nos animais SNI aos dias 3, 7 e 14 após a cirurgia, não se tendo verificado quaisquer diferenças entre os restantes grupos.



**Figura 8** – Valores do limiar de vonFrey para as patas ipsi (A) e contralateral (B). Os resultados são apresentados sob a forma de logaritmo dos limiares de vonFrey. Um menor limiar de vonFrey corresponde a uma maior sensibilidade mecânica. Os resultados foram comparados por análise de variância bifatorial (grupo×tempo), seguida do teste SNK. A comparação entre os lados ipsi- e contralateral foi feita por teste t emparelhado. \* $P < 0,05$  vs. *naïve*; # $P < 0,05$  vs. *sham*; † $P < 0,05$  vs. dia 1; ‡ $P < 0,05$  vs. pata contralateral.

### 3.1.2. Teste de acetona

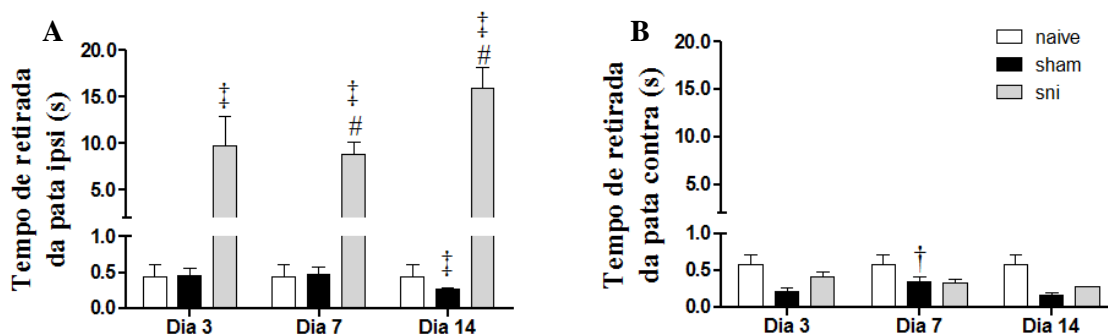
O teste de acetona foi usado para avaliar a sensibilidade ao estímulo frio não nódico e os seus resultados estão apresentados na Fig.9. Na pata ipsilateral, o grupo SNI respondeu mais do que o grupo *sham* no dia 14, tendo os animais SNI respondido mais do que os restantes grupos ao longo de todo o estudo, ainda que sem atingir o limiar de significância. O grupo *sham* apresentou uma percentagem de respostas idêntica aos animais *naïve*. Não foram encontradas diferenças na pata ipsilateral dos animais SNI ao longo do tempo. A comparação entre as patas ipsi e contra de cada animal revelou diferenças somente no grupo SNI ao dia 14, no qual a pata ipsi respondeu um maior número de vezes ao estímulo frio.



**Figura 9** – Resposta de retirada da pata ipsi (A) e contralateral (B) em resposta a estímulo frio (teste de acetona), expressa em porcentagem de respostas ao estímulo frio. Uma maior a porcentagem de respostas corresponde a uma maior sensibilidade ao frio. Os resultados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis para os fatores *grupo* e *tempo*, separadamente, seguido do teste de Dunn. A comparação entre os lados ipsi- e contralateral foi feita por teste t emparelhado. \* $P < 0,05$  vs *.naive*; # $P < 0,05$  vs *.sham*; † $P < 0,05$  vs. dia 14; ‡ $P < 0,05$  vs. pata contralateral.

### 3.1.3. Teste de *pinprick*

Os resultados do teste de *pinprick*, utilizado para avaliar a hiperalgesia mecânica, estão apresentados na Fig.10. Este teste foi realizado apenas nos dias 3, 7 e 14 após a cirurgia, e não ao dia 1, por motivos éticos (para evitar um sofrimento desproporcionado aos animais, numa fase pós-operatória tão precoce), uma vez que avalia a reação a um estímulo que é nódico mesmo em situações não patológicas, ao contrário dos testes de vonFrey e acetona, que utilizam estímulos que são inócuos em situações não patológicas. Nos animais SNI, a pata ipsilateral exibiu um tempo de retirada superior aos animais *sham* nos dias 7 e 14. O grupo *sham* apresentou uma resposta semelhante ao grupo *naive* ao longo de todo o estudo. Não se verificaram diferenças entre os 3 tempos estudados em nenhum dos grupos experimentais. Na comparação da pata ipsi e contralateral, verificou-se que, em todos os tempos, a pata ipsilateral dos animais SNI apresentou um maior tempo de retirada do que a respetiva pata contralateral.



**Figura 10** – Tempo de retirada das patas ipsi (A) e contralateral (B) após aplicação de estímulo nódico mecânico (teste de *pinprick*). Um maior tempo de retirada da pata corresponde a uma resposta maior ao estímulo nódico, ou seja, hiperalgesia. Os resultados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis para os fatores *grupo* e *tempo*, separadamente, seguido do teste de Dunn. A comparação entre os lados ipsi- e contralateral foi feita por teste t emparelhado. \* $P < 0,05$  vs. *naïve*; # $P < 0,05$  vs. *sham*; † $P < 0,05$  vs. dia 14; ‡ $P < 0,05$  vs. pata contralateral.

### 3.2. Dano oxidativo no DNA

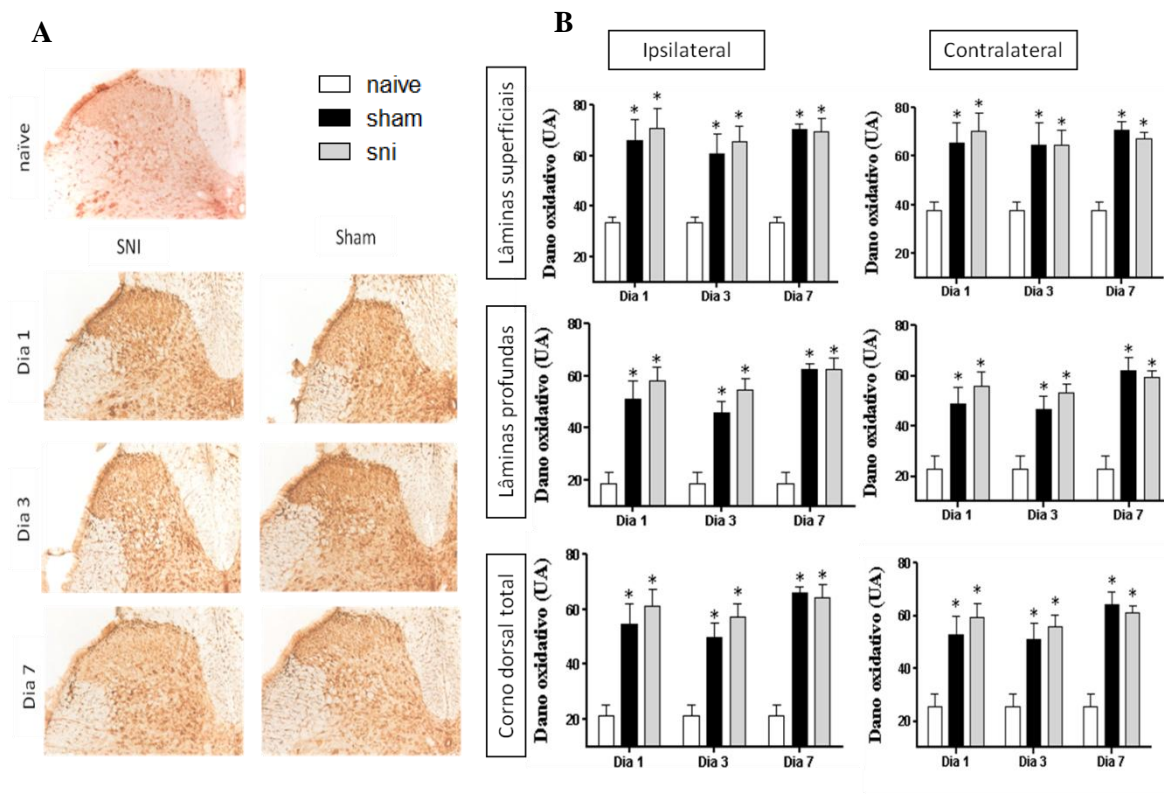
A análise imunohistoquímica realizada com o anticorpo anti-8OHdG permitiu avaliar o dano oxidativo presente nos segmentos lombares L4 e L5 e em segmentos cervicais da medula espinhal e estabelecer uma comparação entre os diferentes grupos experimentais, bem como entre o lado ipsi e contralateral. Adicionalmente, também possibilitou efetuar uma comparação entre o dano presente nas lâminas superficiais (I e II) e as lâminas profundas (III-VI) do corno dorsal da medula espinhal.

#### 3.2.1. Segmentos L4 e L5

##### Protocolo 1

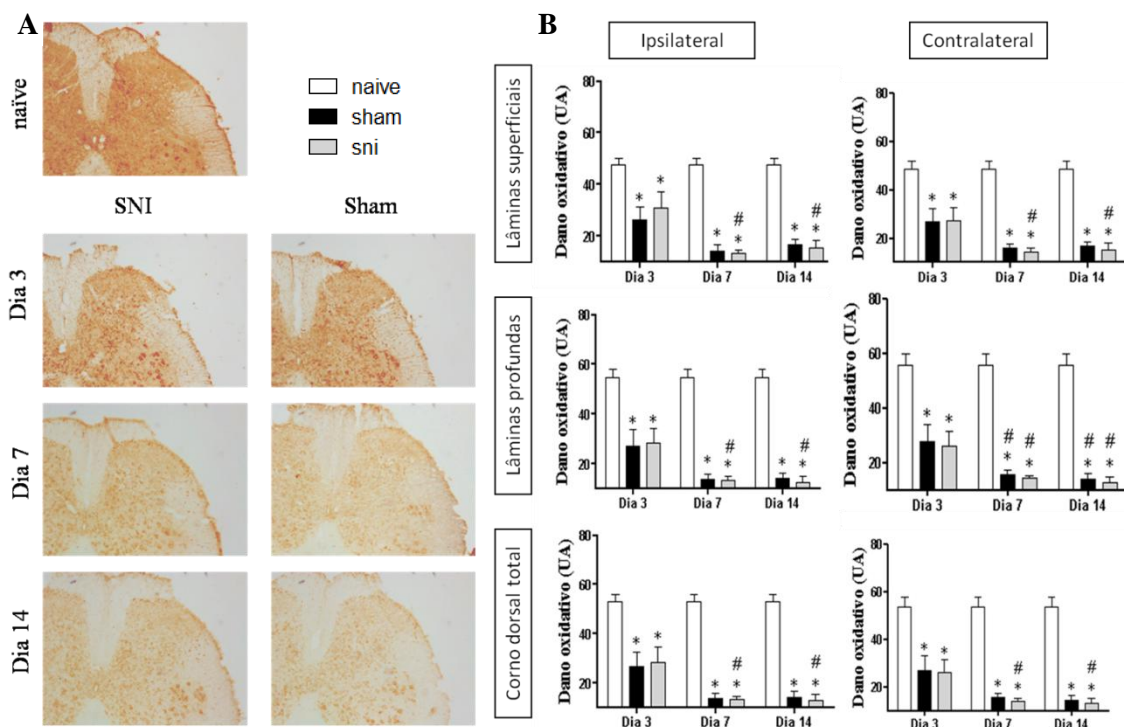
No primeiro protocolo implementado, no qual se utilizaram cortes de 40  $\mu\text{M}$  e o anticorpo primário diluído a 1:1600 não se observaram diferenças no dano oxidativo do DNA entre os grupos SNI e *sham* em nenhum dos tempos avaliados (1, 3 e 7 dias). Este dano oxidativo avaliado no corno dorsal total e, especificamente, nas lâminas superficiais (I e II) e profundas (III a VI) foi idêntico nos animais SNI e *sham*, bem como no lado ipsi e contralateral ao longo de todo o estudo. No entanto, observou-se maior dano oxidativo no corno dorsal dos animais SNI e *sham* relativamente aos animais *naïve*, quer do lado ipsi quer do contralateral (Fig.11A e 11B). Não se observou qualquer diferença entre os vários

tempos estudados, em nenhum dos grupos experimentais. O controlo negativo utilizado não demonstrou qualquer marcação.



## Protocolo 2

O protocolo 2 foi desenvolvido para estudar a influência da espessura das secções de medula espinal na qualidade da reação imunohistoquímica. Utilizámos então crio-secções de espessura inferior (20 vs. 40  $\mu\text{m}$ ), tendo sido utilizada a mesma diluição (1:1600) para o anticorpo primário anti-8OHdG. Tal como no protocolo anterior, não se observou qualquer diferença no dano oxidativo do DNA entre os grupos SNI e *sham* nos tempos avaliados (3, 7 e 14 dias). No entanto, contrariamente ao observado no protocolo 1, os grupos SNI e *sham* apresentaram, ao longo de todo o estudo, níveis de dano oxidativo inferiores ao grupo *naïve*, quer nas lâminas superficiais, quer nas lâminas profundas do corno dorsal da medula espinal (Fig.12A e 2B). Observou-se uma correlação negativa entre os resultados dos protocolos 1 e 2.

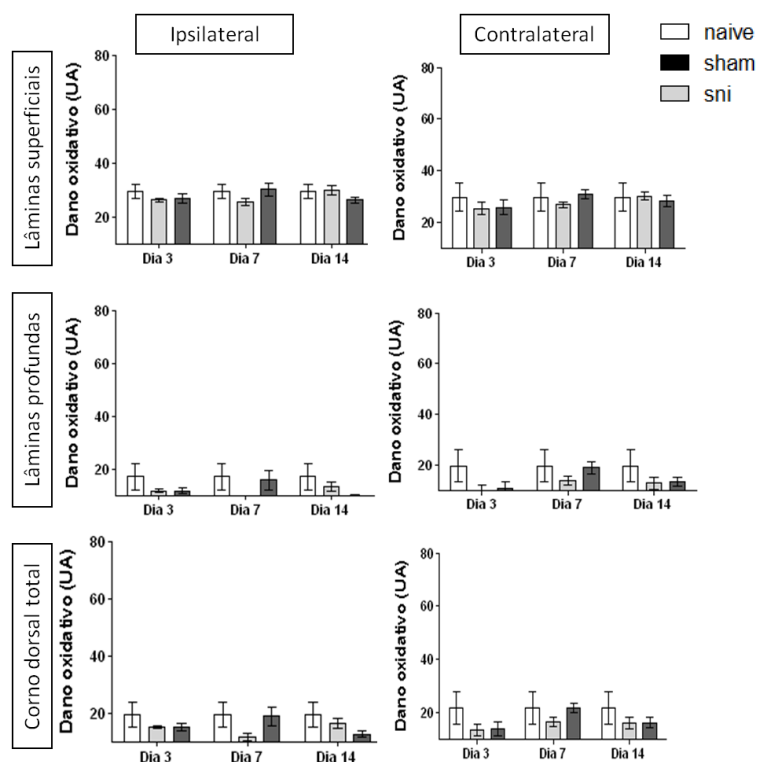


**Figura 12** – Marcação de 8OHdG (dano oxidativo no DNA) no corno dorsal dos segmentos lombares L4 e L5 da medula espinhal nos vários grupos experimentais. Reação realizada de acordo com o Protocolo 2 (espessura de corte, 20 µm, diluição do anticorpo primário, 1:1600). Fotografias representativas (A) e quantificação respetiva (B). Os resultados foram comparados por análise de variância bifatorial, seguida do teste SNK. \* $P < 0,05$  vs. *naïve*; # $P < 0,05$  vs. dia 3.

Também não se detetaram diferenças entre os lados ipsi e contralateral. No que respeita à evolução do dano oxidativo ao longo dos dias estudados, observou-se que os animais SNI apresentaram maior dano oxidativo ao dia 3, quando comparados com o dia 7 e 14 após cirurgia. Este facto foi detetado em ambos os lados, ipsi e contralateral, que apresentaram sempre níveis de dano oxidativo semelhantes (Fig.12B).

### Protocolo 3

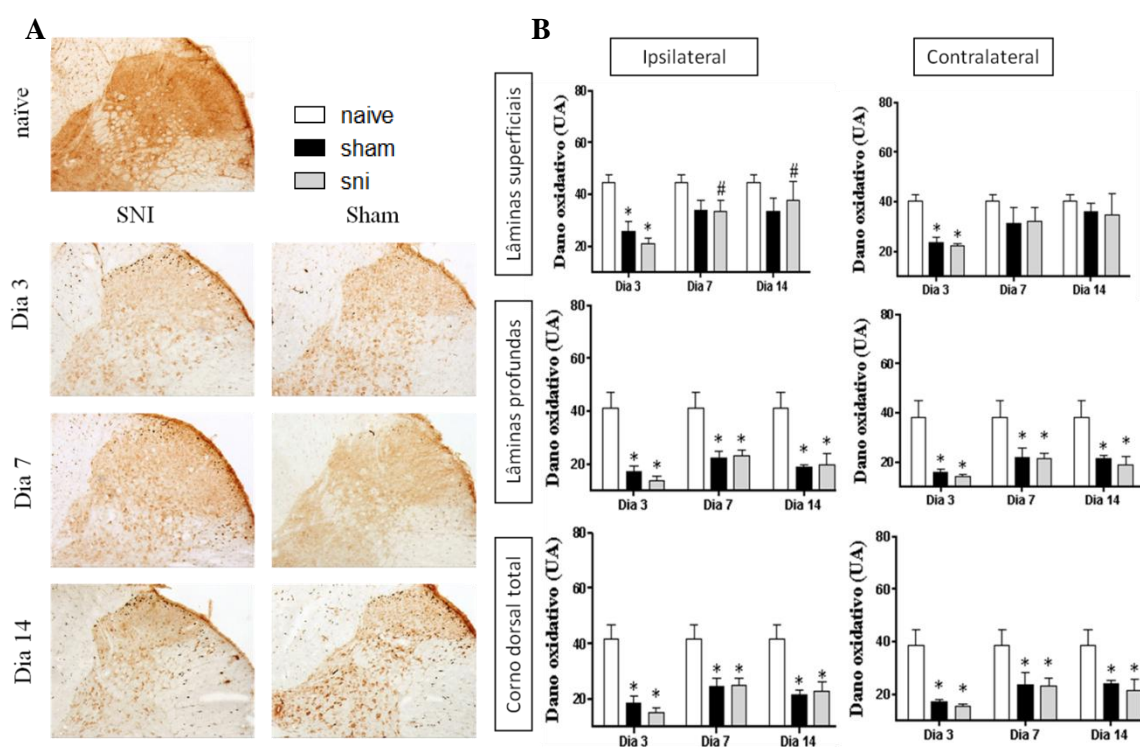
Perante a discrepância de resultados obtidos nos dois protocolos anteriores, tentámos variar a concentração do anticorpo primário, utilizando uma diluição superior (1:2500 vs. 1:1600), em cortes de 20 µm. Neste protocolo não foi possível observar diferenças entre os três grupos experimentais (SNI, *sham* e *naïve*) em nenhum dos tempos avaliados, nem qualquer evolução temporal ao longo do estudo (Fig.13A e 13B). Não se observou qualquer correlação entre os resultados dos protocolos 2 e 3.



**Figura 13** – Valores da marcação de 8OHdG (dano oxidativo no DNA) no corno dorsal dos segmentos lombares L4 e L5 da medula espinal nos vários grupos experimentais. Reação realizada de acordo com o Protocolo 3 (espessura de corte, 20  $\mu$ m, diluição do anticorpo primário, 1:2500). Os resultados foram comparados por análise de variância bifatorial, seguida do teste SNK. \* $P < 0,05$  vs. *naïve*; # $P < 0,05$  vs. dia 3.

### 3.2.2. Segmentos cervicais

A avaliação do dano oxidativo do DNA em áreas da medula espinal distantes dos segmentos L4 e L5 permitiu estabelecer uma relação entre os efeitos locais e sistêmicos da cirurgia SNI. Tal como nos segmentos lombares, não se detetaram quaisquer diferenças entre os grupos SNI e *sham* em nenhum dos tempos estudados, e ambos apresentaram níveis de dano oxidativo inferiores aos animais *naïve* ao longo de todo o estudo (Fig.14A e 14B). Apesar de esta diferença ser notória nas lâminas profundas e no corno dorsal total em todos os tempos estudados (3, 7 e 14 dias), não se observou nas lâminas superficiais aos dias 7 e 14. No que respeita à evolução temporal, observou-se somente a presença de maiores níveis de dano oxidativo nas lâminas superficiais dos animais *sham* aos dias 7 e 14 quando comparados com o dia 3. Não foi possível detetar qualquer diferença em relação ao tempo nas restantes lâminas, nem se observaram diferenças entre os lados ipsi e contralateral.



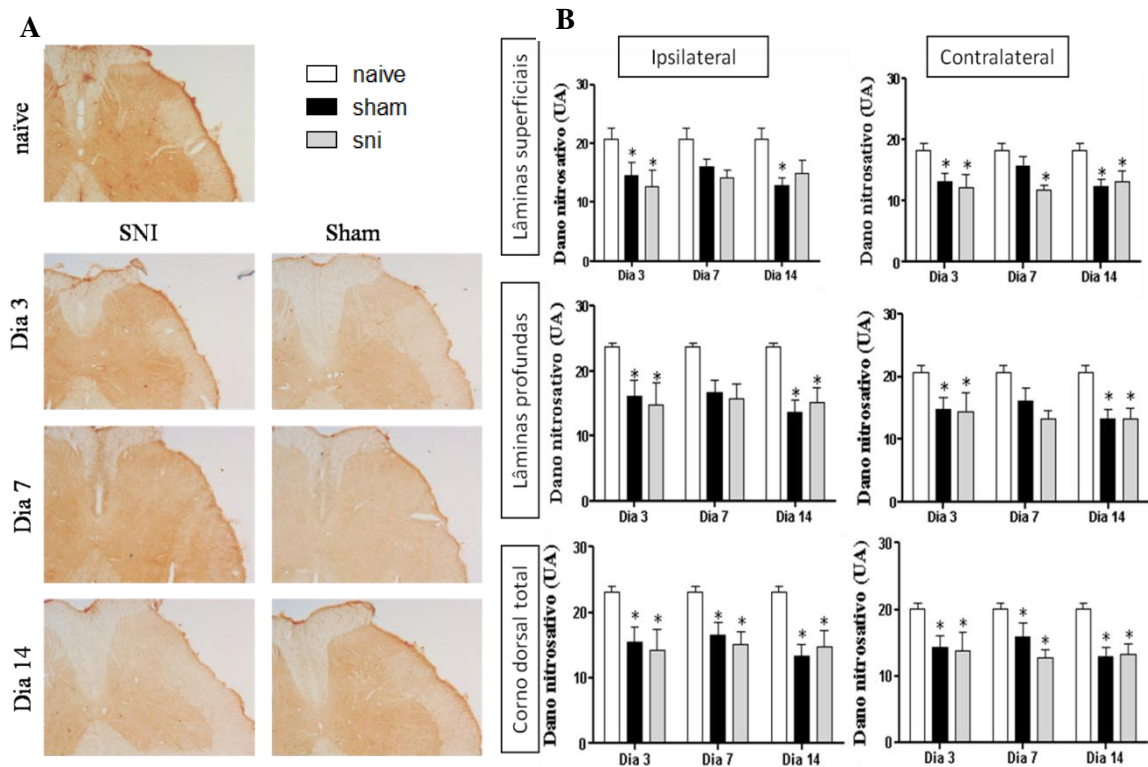
**Figura 14 -** Marcação de 8OHdG (dano oxidativo no DNA) no corno dorsal de segmentos cervicais da medula espinhal nos vários grupos experimentais. Reação realizada de acordo com o Protocolo 2 (espessura de corte, 20 μm, diluição do anticorpo primário, 1:1600). Fotografias representativas (A) e quantificação respectiva (B). Os resultados foram comparados por análise de variância bifatorial, seguida do teste SNK. \* $P < 0,05$  vs. naïve; #  $P < 0,05$  vs. dia 3.

Ao comparar os resultados obtidos nos segmentos cervicais com os resultantes dos segmentos lombares L4 e L5 verificou-se que o padrão se assemelha, tendo-se verificado níveis idênticos de dano oxidativo no corno dorsal dos diferentes grupos. Verificou-se a existência de uma correlação positiva entre o dano oxidativo apresentado no lado ipsilateral dos segmentos lombares e cervicais aos dias 3 ( $r=0,6671$ ;  $P < 0,05$ ) e 7 ( $r=0,6389$ ;  $P < 0,05$ ). No lado contralateral, foi encontrada correlação positiva ao dia 3 ( $r=0,8695$ ;  $P < 0,05$ ). Nos restantes tempos estudados não foram detetadas quaisquer correlações no dano oxidativo do DNA entre a cervical e os segmentos L4 e L5.

### 3.3. Dano nitrosativo

A análise imunohistoquímica realizada com o anticorpo anti-nitrotirosina permitiu avaliar o dano nitrosativo presente nos segmentos lombares L4 e L5 através da determinação da presença de peroxinitrito. Os resultados desta análise demonstraram um padrão semelhante aos resultados do dano oxidativo no DNA (protocolo 2), não tendo sido

observadas diferenças entre os grupos SNI e *sham* em nenhum dos tempos avaliados (Fig.15A e 15B).



Quando se analisou o corno dorsal total verificaram-se níveis mais elevados de peroxinitrito nos animais *naïve* do que nos restantes grupos, nos três tempos estudados. No entanto, nas lâminas superficiais e profundas esta diferença apenas foi detetada aos dias 3 e 14. Não se observou uma variação do dano nitrosativo no corno dorsal da medula ao longo do tempo, nem diferenças entre os lados ipsi e contralateral.



## **CAPÍTULO IV**

### **Discussão**



## 4. Discussão

Neste estudo verificámos que o modelo SNI produziu nos animais sintomas de neuropatia, nomeadamente hiperalgesia e alodínia mecânica, bem como alodínia ao frio, tal como descrito na literatura (Decosterd & Woolf, 2000). Embora Decosterd & Woolf refiram hipersensibilidade térmica e mecânica desde as primeiras horas após a cirurgia SNI, havendo diferenças entre os animais SNI e os *sham* e *naïve* desde as 24 horas pós-indução (Decosterd & Woolf, 2000), os nossos animais SNI apresentaram alodínia mecânica na pata ipsilateral apenas a partir do dia 3 pós-cirurgia (por comparação quer com o grupo *sham* quer com a respetiva pata contralateral), apesar de apresentarem limiares inferiores aos *naïve* em todos os momentos de avaliação. A alodínia mecânica dos animais SNI manteve-se ao longo de todo o período experimental, tendo-se acentuado até ao dia 14. Esta evolução comportamental encontra-se de acordo com estudos que descrevem, neste modelo experimental e em ratinho (Bourquin *et al.*, 2006), a manutenção da alodínia mecânica até às 4 semanas (Polgar *et al.*, 2005; Baliki *et al.*, 2005) e mesmo aos 6 meses (Decosterd & Woolf, 2000), atingindo valores máximos 2 semanas após a indução. Surpreendentemente, os animais *sham* apresentaram limiares de vonFrey inferiores aos *naïve* nos dias 3 e 7 (pata ipsilateral). A ativação de aferentes cutâneos devido às lesões da pele e músculos decorrentes da exposição dos ramos do nervo ciático poderá estar na origem desta alodínia mecânica apresentada pelos animais *sham* (Guedes *et al.*, 2008). Em todo o caso, o nosso estudo providencia novos dados sobre o comportamento dos animais *sham* em relação a animais *naïve*, evidenciando a importância da utilização de grupos *naïve* em estudos de dor.

Apesar de Decosterd & Woolf descreverem o desenvolvimento de alodínia térmica ao frio no primeiro dia após a cirurgia SNI (Decosterd & Woolf, 2000), Baliki *et al.*, usando o mesmo modelo e teste (acetona), detetaram sinais de alodínia ao frio somente a partir do dia 7 (Baliki *et al.*, 2005). No nosso estudo, os animais SNI demonstraram alodínia ao frio na pata ipsilateral apenas 14 dias após a cirurgia, tendo respondido um maior número de vezes do que os animais *sham* e do que a respetiva pata contralateral. A ausência de diferenças nos dias 3 e 7 parece dever-se à grande variabilidade nos valores, uma vez que há uma tendência clara de aumento de resposta exclusivamente no grupo SNI, desde os 3 dias pós-indução. Futuramente, o teste deverá ser otimizado de forma a diminuir

esta variabilidade de respostas dentro de um mesmo grupo. Para além deste fator, é de notar que a avaliação realizada nos estudos referidos tem como referência os valores basais dos animais antes da cirurgia SNI, estabelecendo comparações entre os mesmos animais ao longo do tempo (Baliki *et al.*, 2005; Decosterd & Woolf, 2000). No nosso estudo, os testes comportamentais foram realizados uma única vez em cada um dos animais, de forma a evitar a habituação destes aos testes, o que poderia confundir os resultados. Deste modo, a avaliação da perceção de dor na pata ipsilateral dos animais SNI tem como termo de comparação a respetiva pata contralateral e os animais *sham* e *naïve*, mas não a própria pata antes da cirurgia. Ao contrário do que se verificou no teste de vonFrey, os grupos *sham* e *naïve* reagiram sempre de forma idêntica ao estímulo frio.

Os animais SNI apresentaram hiperalgesia mecânica a partir do dia 7 (tempo de resposta superior a 1 segundo) em relação aos animais *sham*, cujo tempo de resposta ao estímulo mecânico foi sempre inferior a 1 segundo. Tal como no teste de acetona, os animais *sham* e *naïve* reagiram de forma idêntica ao estímulo nódico mecânico. Quando comparada com a respetiva contralateral, os animais SNI apresentaram uma marcada hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral, em todos os dias estudados. Os animais SNI apresentaram hiperalgesia mecânica constante ao longo de todo o estudo, não se observando uma evolução clara ao longo dos dias estudados.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com estudos anteriormente realizados no mesmo modelo de dor neuropática, nos quais se observou que os sintomas de dor neuropática aparecem pouco tempo após a indução de dor, nomeadamente aos dias 1 (Decosterd & Woolf, 2000), 4 (Polgar *et al.*, 2005) e 7 (Baliki *et al.*, 2005), atingindo o seu máximo às duas semanas após a cirurgia (Baliki *et al.*, 2005; Decosterd & Woolf, 2000; Kaur *et al.*, 2010). De uma forma geral, os sintomas de dor neuropática estudados (hiperalgesia mecânica e alodínia mecânica e ao frio) desenvolveram-se apenas na pata ipsilateral dos animais SNI. Tendo em conta que os testes foram todos realizados no território inervado pelo ramo sural do nervo ciático (único ramo preservado após a cirurgia SNI), o aumento da resposta a estímulos inócuos e nódicos nesta área corresponde a um estado de hiperalgesia secundária; isto é, dor e aumento da sensibilidade à periferia da lesão. Tem sido demonstrado que esta hiperalgesia depende essencialmente de mecanismos de sensibilização no corno dorsal da medula espinhal, que provocam a redução do limiar de ativação dos nociceptores, facilitando a ocorrência de potenciais de ação em resposta a estímulos de menor intensidade. Este aumento da sensibilidade em áreas secundárias faz

parte do quadro clínico de doentes com dor neuropática (Jensen *et al.*, 2001). O aumento da sensibilidade pode ser igualmente explicado pela reorganização estrutural do corno dorsal. Em condições fisiológicas, a lâmina II apenas recebe informações das fibras nociceptivas C e A $\delta$ , enquanto as fibras inócuas A $\beta$  se localizam nas lâminas profundas III e IV do corno dorsal. Quando ocorre secção de nervos periféricos, as fibras A $\beta$  proliferam e invadem a lâmina II, estabelecendo sinapses com os neurónios nociceptivos, o que leva a que os estímulos inócuos sejam percecionados como nóxicos (alodínia) (Mannion *et al.*, 1996).

A análise da disfunção redox não revelou diferenças significativas no dano oxidativo no DNA, nem no dano nitrosativo, entre o grupo SNI e *sham*, nem entre os lados ipsi e contralateral.

O protocolo inicial para a reacção de deteção do 8OHdG baseou-se numa otimização da técnica realizada anteriormente no nosso laboratório e utilizada em estudos prévios (Morgado *et al.*, 2011). Nestas condições (protocolo 1), verificou-se que a marcação do dano oxidativo no DNA era semelhante nos grupos SNI e *sham*, não existindo também diferenças entre os lados ipsi e contralateral em nenhum dos tempos estudados. Os valores destes grupos foram, no entanto, superiores ao dos animais *naïve*, o que poderia ser explicado pelos efeitos da abordagem cirúrgica, comum aos animais SNI e *sham*.

Sabendo que num estudo prévio no modelo SNL tinham sido descritas alterações no dano oxidativo espinhal de animais neuropáticos, usando o mesmo método que utilizamos neste estudo (Kim *et al.*, 2010), a discrepância que obtivemos entre os resultados dos testes comportamentais e da avaliação de dano oxidativo espinhal (diferenças na sensibilidade dolorosa, mas não no dano oxidativo) foi muito surpreendente. Por esta razão, tentamos otimizar o protocolo de imunohistoquímica, utilizando cortes de menor espessura, com o objectivo de diminuir a marcação de fundo (*background staining*).

O protocolo 2 (secções com 20  $\mu$ m de espessura) foi então aplicado no segundo grupo de animais, tendo-se também incluído animais com 14 dias de neuropatia (para evitar confundimentos pela eventual inflamação e/ou sensibilização associada exclusivamente à manipulação cirúrgica), mas não incluindo animais com apenas 1 dia de SNI (uma vez que nesse dia os animais ainda se encontravam sensibilizados pela manipulação cirúrgica, não apresentando sinais de dor neuropática). Apesar de os resultados obtidos com o protocolo 2 também não distinguirem os grupos SNI e *sham*,

estes grupos apresentaram valores de dano oxidativo inferiores aos animais *naïve*, ao contrário do obtido no protocolo 1. Além disso, no protocolo 2, os animais SNI apresentaram maior dano oxidativo espinhal 3 dias após a cirurgia do que nos restantes tempos estudados (7 e 14 dias), tendo os animais *sham* mostrado uma tendência semelhante. Este aumento da disfunção redox nos primeiros períodos que se seguem à cirurgia poderá ser explicado pelos processos inflamatórios decorrentes do procedimento cirúrgico, que é menos marcado aos 7 e 14 dias pós-indução.

Face ao resultado estranho dos animais *naïve*, decidiu-se avaliar o8OHdG em segmentos cervicais da medula espinhal, para verificar se a disfunção redox se encontrava confinada a L4 e L5 ou presente também noutros segmentos da medula. Nas mesmas condições experimentais, a análise dos segmentos originou resultados idênticos aos observados em L4 e L5 (ausência de diferenças entre os grupos SNI e *sham* e menor níveis de dano oxidativo nestes grupos do que no *naïve*), embora os níveis de dano oxidativo tivessem sido, de modo geral, inferiores aos encontrados nos segmentos lombares. Tendo em conta estes resultados, pensamos poder concluir que os mecanismos que se encontram na origem das primeiras fases da dor neuropática produzem dano oxidativo em toda a medula espinhal, estando, possivelmente, envolvidos processos celulares a nível sistémico. Perante a estranheza destes resultados, decidimos ainda alterar um novo fator, na tentativa de obter resultados mais claros na reação imunohistoquímica: a diluição do anticorpo primário.

No protocolo 3, cuja alteração em relação ao protocolo anterior consistiu apenas na utilização do anticorpo primário mais diluído (1:2500), não foi possível detetar quaisquer diferenças entre os três grupos experimentais, tendo todos apresentado níveis de dano oxidativo inferiores aos observados nos protocolos anteriores. O facto de nestas condições a marcação obtida ter sido pouco intensa, dificultou a sua quantificação, o que se traduziu numa grande variabilidade de resultados, limitando a potência das comparações. Desta forma, decidimos descontinuar este protocolo.

Decidimos então testar um outro marcador de stresse oxidativo: o peroxinitrito, que também tem sido associado ao desenvolvimento de dor em modelos animais de neuropatia periférica (Park *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007). No entanto, confirmou-se a inexistência de diferenças entre os níveis de peroxinitrito dos grupos SNI e *sham*, o que nos faz colocar a

hipótese de que, de facto, não exista disfunção redox espinhal associada ao desenvolvimento da neuropatia SNI, pelo menos até aos 14 dias pós-cirurgia.

A relação entre o desenvolvimento de dor neuropática e o aumento de ROS tem sido demonstrada por vários autores, tendo sido sugerido o seu papel na sensibilização central e consequentemente, na alodínia e hiperalgesia desenvolvidas no decorrer desta síndrome (Gao *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2004, Yowtak *et al.*, 2011). De facto, alguns estudos descrevem aumento de dano oxidativo na medula espinhal em fases precoces do desenvolvimento de dor neuropática (1 a 3 dias pós indução) (Kim *et al.*, 2010), o que nos levou a tentar caracterizar a disfunção redox espinhal nos dias imediatamente a seguir à cirurgia SNI (1, 3 e 7 dias). Contudo, não se conseguiram obter resultados que permitam indicar o período a partir do qual o dano oxidativo espinhal começa a ser relevante para o desenvolvimento e/ou manutenção dos sintomas de neuropatia, uma vez que os animais *sham* apresentaram, ao longo de todo o estudo, níveis de dano oxidativo idênticos aos animais SNI.

Os primeiros resultados (protocolo 1) pareciam indicar que o dano oxidativo observado no corno dorsal da medula espinhal dos animais SNI e *sham* representa uma consequência do procedimento cirúrgico e não da lesão do nervo periférico *per se*, visto que ambos os grupos apresentaram níveis mais elevados de dano oxidativo do que os animais *naïve*, que não sofreram qualquer manipulação cirúrgica. Recentemente, um estudo com o modelo CCI de dor neuropática relatou a presença de stresse oxidativo em medulas de animais *sham*, 3 e 10 dias após a indução de dor, sem que estes tenham apresentado sinais comportamentais de dor (Goecks *et al.*, 2012). Embora o estudo se tenha baseado na avaliação de outros marcadores de stresse oxidativo, nomeadamente a atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase, e a quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os autores verificaram que os animais *sham* e SNI apresentaram níveis idênticos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxido lipídico, sendo ambos maiores do que os apresentados pelos animais *naïve*, o que está de acordo com os resultados de dano oxidativo obtidos no primeiro protocolo. A lesão tecidual que ocorre no decorrer da cirurgia *sham*, ao isolar os ramos do nervo ciático, poderia ser responsável pela ativação de nociceptores periféricos que, embora incapazes de alterar a sensibilidade, levariam ao aumento de ROS na medula espinhal, causando stresse oxidativo (Goecks *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2008).

No entanto, após a análise dos resultados do protocolo 2, a hipótese de existir um efeito da manipulação cirúrgica no desenvolvimento de dano oxidativo no DNA nos primeiros dias de dor foi posta em causa, uma vez que os grupos SNI e *sham* apresentaram menor dano oxidativo do que o grupo *naïve*. O facto de não existirem diferenças entre os animais SNI e *sham* em nenhum dos protocolos experimentados, tempos estudados e marcadores utilizados sugere que os níveis de stresse oxidativo espinhais poderão não estar a ser afetados pela cirurgia SNI. De facto, a produção aumentada de ROS espinhais após indução de dor neuropática periférica encontra-se bem descrita apenas nos modelos SNL e CCI (Gao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Yowtak *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2004; Goecks *et al.*, 2012; Varija *et al.*, 2009). No modelo SNL a ligação é executada nos nervos espinhais dos segmentos L5 e L6, que se encontram anatomicamente próximos dos DRGs e da medula espinhal. No modelo CCI, a constrição do nervo ciático origina uma reação inflamatória relevante no nervo, que se poderá propagar a nível espinhal. No entanto, no modelo SNI, a cirurgia é realizada nos ramos do nervo ciático, que se localizam numa posição mais distal à medula espinhal do que os nervos afetados pelo modelo SNL, e não induz um processo inflamatório tão relevante como o modelo CCI. Estes fatores podem levar a que, no modelo SNI, as alterações espinhais sejam induzidas mais tarde do que nos outros modelos de dor neuropática, o que explica a ausência de diferenças nos marcadores de stresse oxidativo entre os animais SNI e *sham* nos tempos avaliados. Alguns estudos realizados com o modelo SNI descrevem, ao dia 14, um aumento de marcadores de stresse oxidativo em segmentos de nervo ciático de animais SNI (Kaur *et al.*, 2010; Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2012) e níveis ligeiramente superiores destes marcadores na medula espinhal e nos DRGs de animais SNI quando comparados com controlos (Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2012). Nos tempos avaliados neste estudo (1, 3, 7 e 14 dias) não se detetaram diferenças entre os animais SNI e *sham*, pelo que será necessário avaliar a evolução da disfunção redox espinhal em tempos maiores de neuropatia. Os resultados obtidos evidenciam a impossibilidade de detetar alterações no estado redox da medula espinhal de animais SNI nos primeiros períodos de desenvolvimento de dor neuropática (até aos 14 dias após a cirurgia), ao contrário do que acontece com outros modelos de dor neuropática periférica. Apesar do modelo SNI ser comumente utilizado em estudos de dor neuropática que avaliam as alterações na sensibilidade do membro afetado a diferentes estímulos (Decosterd & Woolf, 2000), este estudo coloca em foco a necessidade de se proceder a uma caracterização dos processos que decorrem a nível espinhal neste modelo, nomeadamente o aumento de ROS e consequente disfunção redox.

## **CAPÍTULO V**

### **Conclusão**



## 5. Conclusão

A avaliação da percepção dolorosa no modelo experimental de dor neuropática periférica SNI permitiu identificar com clareza o desenvolvimento de hipersensibilidade na pata submetida à axotomia dos ramos tibial e peroneal comum do nervo ciático (pata ipsilateral). Esta sensibilidade aumentada refletiu-se na resposta exagerada a um estímulo mecânico nódico (hiperalgesia) e na presença de resposta a dois estímulos inócuos (alodínia), um mecânico e um frio. Os animais SNI apresentaram um aumento crescente da sensibilidade na pata ipsilateral ao longo do estudo, sendo esta evolução mais marcada na alodínia mecânica. Surpreendentemente, os animais *sham* também apresentaram alodínia mecânica nos dias 3 e 7, quando comparados com os *naïve*, embora não apresentassem hiperalgesia mecânica nem alodínia ao frio.

De acordo com os objetivos propostos, procedeu-se à avaliação da disfunção redox na medula espinhal, tentando-se estabelecer uma correlação entre o dano oxidativo e nitrosativo espinhal e a indução e/ou desenvolvimento de hipersensibilidade. Apesar da hipersensibilidade demonstrada anteriormente neste modelo experimental, e patente em doentes com dor neuropática, se dever a mecanismos de sensibilização central desencadeados pela lesão nervosa periférica e, possivelmente, relacionados com disfunção redox, não se detetou qualquer relação entre os resultados comportamentais e a presença de dano oxidativo e nitrosativo espinhal. A presença de níveis semelhantes de dano oxidativo e nitrosativo espinhal nos animais SNI e *sham* constitui um dado novo neste modelo experimental. Este facto, aliado à variação observada nos animais *naïve* e à inexistência de diferenças entre os lados ipsi e contralateral, indica que, até aos 14 dias, a cirurgia SNI poderá não ser capaz de induzir disfunção redox na medula espinhal. Sendo executada numa porção distal do nervo ciático (e não induzindo reação inflamatória muito relevante no nervo), os efeitos da axotomia efetuada na cirurgia SNI poderão não originar alterações redox espinhais significativas, ou originá-las de forma mais morosa do que outros modelos de neuropatia periférica com uma componente inflamatória no nervo bastante marcada (CCI) e/ou que lesem porções mais proximais do nervo (SNL).

Os resultados obtidos indicam que as cirurgias SNI e *sham* causam diferentes níveis de sensibilização nos animais, sendo fulcral executar uma avaliação do estado redox com

outros marcadores de stresse oxidativo e prolongar os tempos de neuropatia, de forma a elucidar se existem ROS envolvidas nesta sensibilização e, em caso positivo, poder identificar essas espécies, bem como as suas fontes.

Planeamos agora efetuar uma análise mais abrangente da disfunção redox espinhal, recorrendo a outros marcadores. Esta tarefa deverá incluir a determinação direta das ROS presentes na medula espinhal (nomeadamente do  $O_2^{\bullet-}$  e do  $H_2O_2$ ), bem como uma avaliação da atividade enzimática de moléculas antioxidantes, como a SOD e a catalase no tecido fresco (não fixado). Pretendemos também, recorrendo a um dos modelos de dor neuropática periférica mais estudados e com stresse oxidativo espinhal comprovadamente associado (SNL ou CCI), melhorar e “validar” o protocolo de imunohistoquímica, de modo a poder estender a avaliação do dano oxidativo no DNA e dano nitrosativo a tempos mais longos de SNI. Só então poderemos determinar o possível envolvimento das isoformas da NOX no desenvolvimento (ou manutenção) de dor neuropática e perceber quais os tipos celulares envolvidos (microglia e/ou neurónios). A avaliação do efeito terapêutico da administração de inibidores específicos das isoformas NOX envolvidas na génese e/ou manutenção da dor neuropática periférica – potencial estratégia terapêutica para o tratamento da dor neuropática em fases iniciais da doença – está dependente da obtenção prévia desses resultados.

## Referências Bibliográficas

- Ago, T., Kuroda, J., Kamouchi, M., Sadoshima, J. & Kitazono, T. 2011. Pathophysiological roles of NADPH oxidase/NOX family proteins in the vascular system. Review and perspective. *Circ J*, 75, 1791-800.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E. & Starkov, A. A. 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 200-14.
- Anrather, J., Racchumi, G. & Iadecola, C. 2006. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem*, 281, 5657-67.
- Baliki, M., Calvo, O., Chialvo, D. R. & Apkarian, A. V. 2005. Spared nerve injury rats exhibit thermal hyperalgesia on an automated operant dynamic thermal escape task. *Mol Pain*, 1, 18.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N. & Krause, K. H. 2000. A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *Science*, 287, 138-42.
- Bedard, K. & Krause, K. H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87, 245-313.
- Bennett, G. & Xie, Y. K. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33, 87-107.
- Bourquin, A. F., Suveges, M., Pertin, M., Gilliard, N., Sardy, S., Davison, A. C., Spahn, D. R. & Decosterd, I. 2006. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain*, 122, 14e1-e14.
- Boyce-Rustay, J. M. & Jarvis, M. F. 2009. Neuropathic Pain: Models and Mechanisms. *Curr Pharm Des*, 15, 1711-6.
- Braz, J. M., Sharif-Naeini, R., Vogt, D., Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., Rubenstein, J. L. & Basbaum, A. I. 2012. Forebrain GABAergic neuron precursors integrate into adult spinal cord and reduce injury-induced neuropathic pain. *Neuron*, 74, 663-75.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, J. & Krause, K. 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142:w13659.
- Cheret, C., Gervais, A., Lelli, A., Colin, C., Amar, L., Ravassard, P., Mallet, J., Cumano, A., Krause, K. H. & Mallat, M. 2008. Neurotoxic activation of microglia is promoted by a NOX1-dependent NADPH oxidase. *J Neurosci*, 28, 12039-51.
- Costigan, M., Scholz, J. & Woolf, C. J. 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, 32, 1-32.
- Decosterd, I. & Woolf, C. J. 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 87, 149-58.
- Doyle, T., Bryant, L., Muscoli, C., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Chen, Z. & Salvemini, D. 2010. Spinal NADPH oxidase is a source of superoxide in the development of morphine-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *Neurosci Lett*, 483, 85-9.

- Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K. & Sobey, C. G. 2011. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 453-71.
- Dworkin, R. H., O'connor, A. B., Backonja, M., Farrar, J. T., Finnerup, N. B., Jensen, T. S., Kalso, E. A., Loeser, J. D., Miaskowski, C., Nurmikko, T. J., Portenoy, R. K., Rice, A. S., Stacey, B. R., Treede, R. D., Turk, D. C. & Wallace, M. S. 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*, 132, 237-51.
- Fazen, L. E. & Ringkamp, M. 2007. The pathophysiology of neuropathic pain: A review of current research and hypotheses. *Neurosurgery Quarterly*, 17, 245-62.
- Forstermann, U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*, 459, 923-39.
- Freyhagen, R. & Bennett, M. I. 2009. Diagnosis and management of neuropathic pain. *BMJ*, 339, b3002.
- Gao, X., Kim, H. K., Chung, J. M. & Chung, K. 2007. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain*, 131, 262-71.
- Goecks, C. S., Horst, A., Moraes, M. S., Scheid, T., Kolberg, C., Bello-Klein, A. & Partata, W. A. 2012. Assessment of Oxidative Parameters in Rat Spinal Cord After Chronic Constriction of the Sciatic Nerve. *Neurochem Res*, 37, 1952-8.
- Gryglewski, R. J., Palmer, R. M. & Moncada, S. 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320, 454-6.
- Guedes, R. P., Araujo, A. S., Janner, D., Bello-Klein, A., Ribeiro, M. F. & Partata, W. A. 2008. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol*, 28, 1049-56.
- Gwak, Y. S., Kang, J., Unabia, G. C. & Hulsebosch, C. E. 2011. Spatial and temporal activation of spinal glial cells: Role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, 234, 362-72.
- Ibi, M., Matsuno, K., Shiba, D., Katsuyama, M., Iwata, K., Kakehi, T., Nakagawa, T., Sango, K., Shirai, Y., Yokoyama, T., Kaneko, S., Saito, N. & Yabe-Nishimura, C. 2008. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci*, 28, 9486-94.
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpaa, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S. & Treede, R. D. 2011. A new definition of neuropathic pain. *Pain*, 152, 2204-5.
- Jensen, T. S., Gottrup, H., Sindrup, S. H. & Bach, F. W. 2001. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 429, 1-11.
- Joplovich, P., Minert, A. & Devor, M. 2012. Spontaneous pain in partial nerve injury models of neuropathy and the role of nociceptive sensory cover. *Exp Neurol*, 236, 103-11.
- Kallenborn-Gerhardt, W., Schroder, K., Del Turco, D., Lu, R., Kynast, K., Kosowski, J., Niederberger, E., Shah, A. M., Brandes, R. P., Geisslinger, G. & Schmidtko, A. 2012. NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 32, 10136-45.

- Kaur, G., Jaggi, A. S. & Singh, N. 2010. Ameliorative potential of pralidoxime in tibial and sural nerve transection-induced neuropathic pain in rats. *Biol Pharm Bull*, 33, 1331-6.
- Kim, D., You, B., Jo, E. K., Han, S. K., Simon, M. I. & Lee, S. J. 2010. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14851-6.
- Kim, H. K., Kim, J. H., Gao, X., Zhou, J. L., Lee, I., Chung, K. & Chung, J. M. 2006. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain*, 122, 53-62.
- Kim, H. K., Park, S. K., Zhou, J. L., Taglialatela, G., Chung, K., Coggeshall, R. E. & Chung, J. M. 2004. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 111, 116-24.
- Kim, S. H. & Chung, J. M. 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50, 355-63.
- Klusakova, I. & Dubovy, P. 2009. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. *Ann Anat*, 191, 248-59.
- Kobayashi, H., Chattopadhyay, S., Kato, K., Dolkas, J., Kikuchi, S., Myers, R. R. & Shubayev, V. I. 2008. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. *Mol Cell Neurosci*, 39, 619-27.
- Krause, K. H. 2007. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol*, 42, 256-62.
- Kuhlein, H. N., Tegeder, I., Moser, C., Lim, H. Y., Haussler, A., Spieth, K., Jennes, I., Marschalek, R., Beckhaus, T., Karas, M., Fauth, M., Ehnert, C., Geisslinger, G. & Niederberger, E. 2011. Nerve injury evoked loss of latexin expression in spinal cord neurons contributes to the development of neuropathic pain. *PLoS One*, 6, e19270.
- Mannion, R. J., Doubell, T. P., Coggeshall, R. E. & Woolf, C. J. 1996. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. *J Neurosci*, 16, 5189-95.
- Martyn, K. D., Frederick, L. M., Von Loehneysen, K., Dinauer, M. C. & Knaus, U. G. 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*, 18, 69-82.
- Mika, J., Osikowicz, M., Rojewska, E., Korostynski, M., Wawrzczak-Bargiela, A., Przewlocki, R. & Przewlocka, B. 2009. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 623, 65-72.
- Millan, M. J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57, 1-164.
- Moore, K. A., Kohno, T., Karchewski, L. A., Scholz, J., Baba, H. & Woolf, C. J. 2002. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*, 22, 6724-31.
- Melzack, R. & Wall, P. D. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150, 971-9.
- Morgado, C., Pereira-Terra, P. & Tavares, I. 2011. alpha-Lipoic acid normalizes nociceptive neuronal activity at the spinal cord of diabetic rats. *Diabetes Obes Metab*, 13, 736-41.

- Niederberger, E., Kuhlein, H. & Geisslinger, G. 2008. Update on the pathobiology of neuropathic pain. *Expert Rev Proteomics*, 5, 799-818.
- Paravicini, T. M. & Touyz, R. M. 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, S170-80.
- Park, E. S., Gao, X., Chung, J. M. & Chung, K. 2006. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett*, 391, 108-111.
- Pinho, D., Morais, M., Carvalho, L., Sousa, R., Marques-Lopes, J., Tavares, I. & Albino-Teixeira, A. NADPH oxidase as a therapeutic target against neuropathic pain: a study in the angiotensin II-hypertensive Rat. 2012. *Pain Practice*, 16-17.
- Polgar, E., Hughes, D. I., Arham, A. Z. & Todd, A. J. 2005. Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci*, 25, 6658-66.
- Riganti, C., Costamagna, C., Bosia, A. & Ghigo, D. 2006. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanil.lone) induces oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, 212, 179-87.
- Salvemini, D., Little, J. W., Doyle, T. & Neumann, W. L. 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med*, 51, 951-66.
- Seltzer, Z., Dubner, R. & Shir Y. 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, 43, 205-18.
- Shields, S. D., Eckert, W. A., 3rd & Basbaum, A. I. 2003. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain*, 4, 465-70.
- Sorce, S. & Krause, K. H. 2009. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2481-504.
- Stocker, R. & Keaney, J. F., Jr. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 84, 1381-478.
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. & Lambeth, J. D. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401, 79-82.
- Szeto, H. H. 2006. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. *AAPS J*, 8, E521-31.
- Takac, I., Schroder, K. & Brandes, R. P. 2012. The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? *Curr Hypertens Rep*, 14, 70-8.
- Tal, M. & Bennett, G. J. 1994. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain*, 57, 375-82.
- Tanabe, M., Nagatani, Y., Saitoh, K., Takasu, K. & Ono, H. 2009. Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology*, 56, 702-8.
- Touyz, R. M. 2008. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension*, 51, 172-4.

- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. & Fiotakis, C. 2009. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 27, 120-39.
- Varija, D., Kumar, K. P., Reddy, K. P. & Reddy, V. K. 2009. Prolonged constriction of sciatic nerve affecting oxidative stressors & antioxidant enzymes in rat. *Indian J Med Res*, 129, 587-92.
- Vejrazka, M., Micek, R. & Stipek, S. 2005. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1722, 143-7.
- Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., Tomkiewicz, M. M. 1979. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, 7, 103-11.
- Wagner, R., Heckman, H. M. & Myers, R. R. 1998. Wallerian degeneration and hyperalgesia after peripheral nerve injury are glutathione-dependent. *Pain*, 77, 173-9.
- Woolf, C. J. & Mannion, R. J. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, 353, 1959-64.
- Woolf, C. J. & Salter, M. W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288, 1765-9.
- Woolf, C. J. 2011. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152, S2-15.
- Yowtak, J., Lee, K. Y., Kim, H. Y., Wang, J., Kim, H. K., Chung, K. & Chung, J. M. 2011. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain*, 152, 844-52.
- Zimmermann, M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16, 109-10.