UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

FRANCISCO ISAAC FERNANDES GOMES

Papel da via succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática

periférica induzida por paclitaxel

Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

FRANCISCO ISAAC FERNANDES GOMES

Papel da via succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática

periférica induzida por paclitaxel

Ribeirão Preto

FRANCISCO ISAAC FERNANDES GOMES

Papel da via succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática periférica induzida por paclitaxel

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Farmacologia

Orientador: Thiago Mattar Cunha

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Francisco Isaac Fernandes

Papel da via succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. Ribeirão Preto, 2019.

84p. : il ; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Cunha, Thiago Mattar

1.succinato. 2.GPR91. 3.dor neuropática. 4.paclitaxel. 5.quimioterapia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francisco Isaac Fernandes Gomes

Papel da via succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática periférica induzida por paclitaxel

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ___/__/___

Banca Examinadora:

Presidente: Prof. Dr Thiago Mattar Cunha

Assinatura: _____

Examinador 1:

Assinatura: _____

Examinador 2:

Assinatura: _____

Examinador 3:

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2017/23815-0.

DEDICATÓRIA

Hoje meu coração é só gratidão por poder findar planos e saber que dei o meu melhor. Dedico esse trabalho a todos que acreditaram em mim mais que eu mesmo pude acreditar. Dedico também esta pesquisa a todos os animais de experimentação, que os respeitemos e os tratemos como protagonistas do trabalho executado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela família e oportunidades que me deu, pois sem dúvida sem cada um deles eu não seria metade do que sou.

Meu muito obrigado aos meus pais **Silene Maria Fernandes Gomes** e **Antônio Sena Gomes** pelo apoio incondicional em cada momento e por nunca terem aparado minhas asas e nem minha vontade de ir além do que jamais imaginaram. Tenho orgulho de ser filho de vocês dois, pessoas simples, mas que me transmitiram valores inestimáveis.

Ao meu irmão **Antônio Felipe Fernandes Gomes** pelo exemplo de irmão, pelo apoio, ajuda e por tudo que sempre fez por nossa família. Meu muito obrigado por ser um irmão tão dedicado.

À minha namorada **Maria Gerusa Brito Aragão**, que desde muito tempo me acompanha nessa intensa e longa jornada da vida, obrigado pela paciência, determinação e apoio incondicional. Sem você metade do que vivi não teria sido o mesmo.

As minhas orientadoras de iniciação científica da Universidade Federal do Ceará – campus Sobral **Hellíada Vasconcelos Chaves** e **Mirna Marques Bezerra** agradeço as oportunidades no Laboratório de Farmacologia de Sobral. Ter passado por vocês me fez querer estar aqui.

Ao meu orientador professor **Thiago Mattar Cunha** muito obrigado pela oportunidade em compor seu grupo de pesquisa onde muito aprendemos. Agradeço também por ter me recebido mesmo sem me conhecer e por aceitar me orientar. Estar aqui me mudou para sempre, muito obrigado pela oportunidade.

Aos professores **Fernando Cunha** e **José Carlos Alves** pelas importantes e acaloradas discussões científicas, por podermos aprender sempre um pouco mais com vocês e por

serem profissionais dedicados ao desenvolvimento científico de maneira responsável e ética.

Aos meus amigos de pós-graduação e em especial Nathália Inês, Ana Letícia, Maria Claudia Cavallini, Nicole Silva, Rafaela Mano, Alexandre Lopes, Ricardo Kusuda, Elidiane Aníbal, Atlante Mendes, Alexandre Maganin, Ayda Schneider, Danilo Sasso, Tatiane Cecílio, Douglas Prado, obrigado por toda ajuda, suporte, risos e desesperos.

À **leda Regina** por sua competência, zelo e paciência em ensinar. Obrigado pelo seu exemplo de pessoa e profissional. Sem sua ajuda metade desse projeto não seria executado da maneira mais correta.

À Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa científica realizada na Universidade de São Paulo e fora dele.

À minha *Alma mater* **Universidade Federal do Ceará** agradeço cada oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional ao longo da graduação. Tenho orgulho de ser filho de uma instituição tradicional, de excelência e que, apesar de todas as dificuldades enfrentadas, garante aos seus uma formação de qualidade.

Mais uma vez à **CAPES** pela oportunidade ímpar de realizar graduação sanduíche no exterior. Sem dúvidas o investimento em minha formação fez de mim um ser humano mais capacitado pessoal e profissionalmente para busca e realização de sonhos. Ter estudado na Universidade de Sydney me deu uma base mais sólida e me fez querer ainda mais o mundo científico.

Aos meus professores do Curso de Odontologia **Francisco Cesar Barroso Barbosa** e **Iriana Zanin** meu muito obrigado por todo apoio em seguir a carreira acadêmica e pela oportunidade de ter trabalhado com vocês na graduação.

Aos demais técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor Kátia, Serginho, Juliana e **Diva**, obrigado por toda ajuda que nos dão.

Aos funcionários do biotério **Orlando**, **Eliane** e **Marquinhos**, obrigado também pelos serviços a nós prestados.

Aos funcionários do departamento **Gislaine** e **Ramon**, obrigado por estarem a frente de todas as burocracias pertinentes ao trabalho de vocês.

Aos funcionários responsáveis pela manutenção da FMRP, que apesar de parecerem invisíveis a muitos, para mim são pessoas inestimáveis, meu muito obrigado pelo zelo e dedicação nos serviços diários prestados.

Aos demais membros do **Laboratório de Inflamação e Dor** (LID) por comporem um grupo de pesquisa robusto e de referência nacional e internacional na área de doenças inflamatórias.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia e aos demais docentes desse campus, obrigado pela dedicação, paciência e empenho nas disciplinas ministradas.

Aos meus amigos do vôlei (LAURP, Fisioterapia e CEFER) obrigado por trazer aos meus dias cansativos a leveza e a magia do esporte. Sem dúvidas ter a companhia de todos vocês fez minha rotina na USP mais confortante.

Meu muito obrigado a todos que contribuíram para a minha caminhada até este momento.

"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu"

Eclesiastes 3:1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise do perfil gênico de nociceptores do gânglio da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel.

Figura 2. Decurso temporal dos níveis de succinato nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

Figura 3. Perfil de respostas nociceptivas de camundongos C57BI/6 wildtype e com deleção total do receptor de succinato durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

Figura 4. Localização do GPR91 em subtipos neuronais do gânglio da raiz dorsal da medula espinal.

Figura 5. Localização do GPR91 no corno dorsal da medula espinal.

Figura 6. Expressão relativa do receptor de succinato no sistema nociceptivo durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

Figura 7. Expressão relativa das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

Figura 8. Expressão relativa das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos nos nervos ciáticos durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

RESUMO

GOMES, F.I.F. **Papel da via succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática induzida por paclitaxel.** Dissertação de mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2019.

Paclitaxel é um quimioterápico amplamente empregado no tratamento de tumores sólidos, mas a neuropatia periférica é um efeito adverso dose-limitante e uma causa comum de interrupção do tratamento oncológico. Paradoxalmente, neurônios são suscetíveis ao paclitaxel apesar de não serem células em divisão. Degeneração axonal e demielinização se correlacionam com os sintomas clínicos que persistem além da descontinuação do tratamento. A patogênese da neuropatia induzida por paclitaxel não está totalmente elucidada. Ademais, a neuropatia periférica induzida por paclitaxel pode causar alterações metabólicas no sistema nociceptivo e intermediários do ciclo do ácido cítrico, como o succinato, podem se acumular nessas condições e transduzir sinais através da ativação de GPR91. Resultados mostram que animas GPR91^{-/-} são menos propensos a desenvolverem hipersensibilidade mecânica e térmica durante neuropatia periférica induzida por paclitaxel. Diante dessas informações, propomos no presente projeto avaliar os mecanismos pelos quais o receptor GRP91 participa do desenvolvimento da dor crônica de origem neuropática induzida por paclitaxel utilizando ferramentas farmacológicas e genéticas em modelos murinos. O esclarecimento do papel funcional deste receptor adicionaria um conceito inédito na área de pesquisa de dores crônicas, sugerindo um novo alvo terapêutico para o campo da analgesia.

Palavras-chave: succinato, GPR91, dor neuropática, paclitaxel, quimioterapia.

ABSTRACT

GOMES, F.I.F. **Role of succinate/GPR91 pathway in the development of paclitaxelinduced peripheral neuropathic pain.** Master's dissertation – Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2019.

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent widely employed in the treatment of solid tumors, but the ensuing peripheral neuropathy is a dose-limiting side-effect and a common cause of treatment interruption. Paradoxically, neurons are susceptible to paclitaxel albeit they are not dividing cells. Axonal degeneration and demyelination correlate with clinical symptoms that persist well beyond treatment cessation. The pathogenesis of paclitaxelinduced neuropathic pain is not fully elucidated. Additionally, paclitaxel-induced neuropathy can cause metabolic changes in the nociceptive system and the levels of citric acid cycle intermediates such as succinate can rise in such conditions and this metabolite can transduce signals through GPR91 activation. Preliminary results from our group show that GPR91^{-/-} mice are less prone to develop mechanical and thermal hypersensitivity during paclitaxel-induced peripheral neuropathy. Knowing such information, this research project aims to evaluate the mechanisms through which GPR91 is involved in the development of paclitaxel-induced neuropathic pain by using pharmacological and genetic tools in experimental murine models. Clarifying the functional role of this receptor would add an unprecedented concept in the chronic pain field of study, suggesting a novel therapeutic target for studies on analgesia.

Keywords: succinate, GPR91, neuropathic pain, paclitaxel, chemotherapy.

SUMÁRIO

1.	Introdução	. 16
1	I.1. Neurobiologia da dor	. 16
1	I.2. Classificação da dor	. 20
1	I.3. Neuropatia induzida por agentes quimioterapêuticos	. 22
	I.4. Mecanismos envolvidos na neuropatia periférica induzida por paclitaxel	. 24
	I.5. Repercussões metabólicas na neuropatia periférica induzida por paclitaxel	. 28
1	I.6. O papel sinalizador do succinato via GPR91	. 31
2.	Objetivos	. 36
3.	Metodologia	. 37
4.	Resultados	. 44
5.	Discussão	. 62
6.	Conclusão	. 67
	Referências	. 68
	Anexo	. 39

INTRODUÇÃO

1.1 Neurobiologia da dor

A dor é uma experiência complexa e multidimensional que envolve aspectos sensório-discriminativos, cognitivos, emocionais e motivacionais. Ela está associada a danos teciduais reais/potenciais ou ainda descrita em termos desse dano (IASP Task Force, 2012). Tal fenômeno possui importante função biológica de defesa e alerta do organismo uma vez que a iminência de danos teciduais sinaliza para respostas motoras reflexas de escape ou respostas autonômicas frente ao estímulo potencialmente danoso (Williams; Craig, 2016).

Estímulos nocivos ativam nociceptores que são terminações nervosas livres de neurônios sensitivos, que estão presentes na pele, articulações e músculos. Tais estruturas são ativadas quando a intensidade de um estímulo alcança um determinado limiar nocivo, sugerindo a existência de propriedades moleculares e biomecânicas que os permitem detectar seletivamente e responder estímulos potencialmente nocivos (Schaible, 2007; Cohen; Jangro; Neff, 2017).

Existem duas classes principais de nociceptores. A primeira classe inclui fibras aferentes mielinizadas de médio diâmetro (fibras tipo Aδ) que medeiam a dor aguda bem localizada. Estas fibras diferem consideravelmente de fibras de maior diâmetro e de rápida condução, fibras tipo Aβ. Estas respondem à estimulação mecânica inócua como o toque leve. A segunda classe de nociceptores corresponde às fibras aferentes de pequeno diâmetro, não-mielinizadas e de baixa velocidade de condução (fibras tipo C). Estas fibras medeiam a dor difusa, lancinante e em queimação (Meyer et al., 2012; Inoue; Tsuda, 2018).

Estudos eletrofisiológicos subdividiram ainda as fibras nociceptivas Aδ em duas classes principais. Tipo I, que responde a ambos estímulos mecânicos e químicos, mas que possuem um limiar térmico relativamente alto (> 50°C). Porém, se o estímulo térmico é mantido, estas fibras aferentes serão sensibilizadas e o limiar de ativação seja mecânico ou térmico será reduzido no contexto do tecido em questão. A subclasse tipo II de fibras tipo Aδ possuem um limiar térmico de ativação menor, todavia apresentam um elevado limiar mecânico (Basbaum et al., 2009; Cobos et al., 2018).

As fibras não-mielinizadas tipo C são um grupo heterogêneo de fibras polimodais assim como a sua contraparte mielinizada, o que inclui populações mutuamente sensitivas a estímulos termomecânicos. De interesse particular são as fibras aferentes não-mielinizadas responsivas ao calor e mecano-insensitivas, que também são chamadas de receptores silentes. Tais fibras são mais responsivas à estímulos químicos como capsaícina e histamina comparadas ao subgrupo de fibras dualmente responsivas a estímulos térmicos ou mecânicos e certamente possuem papel quando o microambiente inflamatório altera suas propriedades. Subgrupos dessas fibras aferentes são também responsivas a uma variedade de produtos pruritogênicos. Ademais, é importante considerar que nem todas fibras tipo C são nociceptores. Algumas respondem ao resfriamento e uma população de aferentes não mielinizados responde a estímulos mecânicos inócuos, mas não à estimulação química ou térmica quente (Perl, 2007; OlaussoN et al., 2008; Basbaum et al., 2009; Pinto et al., 2019).

Para que tais fibras nociceptivas sejam capazes de captar e transmitir estímulos, eventos neurofisiológicos são necessários. Eles estão envolvidos na conversão de estímulos nocivos externos em sinais nociceptivos ao longo do neuroeixo e compreendem aos eventos de transdução, transmissão, modulação e percepção (Tominaga et al., 2003). Em linhas gerais, o estímulo nocivo despolariza o terminal do neurônio aferente primário, gerando potenciais de ação que se propagam centralmente (D'MellO; Dickenson, 2008). A membrana dos nociceptores contem receptores capazes de converter a energia mecânica, térmica ou química dos estímulos nociceptivos em potencial elétrico despolarizante (Besson; Chaouch, 2017; Maatuf; Geron; Priel, 2019). Exemplos de tais receptores incluem a família de canais iônicos de potencial de receptor transitório (TRP – *transient receptor potential*) – TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4 (Nishida et al., 2015; Huang et al., 2019), canais de sódio – Na_V1.1, Na_V1.3, Na_V1.6, Na_V1.7, Na_V1.8 e Na_V1.9 (Wood et al., 2004; Priestley, 2017), receptores purinérgicos ionotrópicos ativados por trifosfato de adenosina (Borea et al., 2018) e membros da família de receptores associados à proteína G relacionados ao Mas (*Mrg* – *Mas-related G protein-coupled receptor*) que são ativados por ligandos peptídicos (Tiwari et al., 2016; Li et al., 2017).

Uma vez que estímulos nociceptivos sejam transduzidos na membrana terminal, o potencial de ação gerado é transmitido pelo neurônio aferente primário, cujo corpo celular localiza-se no gânglio da raiz dorsal, realizando a primeira sinapse junto ao neurônio aferente secundário cujo corpo celular encontra-se no corno dorsal da medula espinal. Nesta etapa, a informação nociceptiva ascendente é passível de modulação local ao nível espinal (D'mello; Dickenson, 2008; Besson; Chaouch, 2017; Dickie Et Al., 2019; Gutierrez-Mecinas et al., 2019).

A transmissão descrita acima depende de neurotransmissores pró-nociceptivos liberados a partir de aferentes primários tanto na periferia como na primeira sinapse nociceptiva no corno dorsal da medula espinal. Tais neurotransmissores incluem a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a neurocinina A (NKA), o glutamato, o trifosfato de adenosina (ATP), o óxido nítrico (NO), as prostaglandinas (PGs) e neurotrofinas como o fator neurotrópico derivado do cérebro (BNDF). Ademais, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18) também participam de mecanismos de sensibilização centrais e periféricos (Min et al., 2008; Abbadie et al., 2009; Kuner, 2010; González-Ramírez et al., 2017; Chen et al., 2018; Dembo et al., 2018; Sousa-Valente; Brain, 2018).

A informação nociceptiva transmitida ao neurônio aferente secundário então ascende a centros neurais superiores, chegando ao tálamo onde ocorre a segunda sinapse entre os neurônios de segunda e terceira ordem, que por sua vez se projeta ao córtex somatossensorial. Nesta estrutura, a informação nociceptiva é então percebida de maneira consciente e também passível de modulação por circuitos descendentes inibitórios ou facilitatórios (Boadas-Vaello et al., 2016; Juarez-Salinas et al., 2018; Tobaldini et al., 2018).

Por fim, a dor é ainda um fenômeno que passa por sistemas de classificação em função de aspectos inerentes à sua fisiopatologia, percepção e duração, sendo tais sistemas classificatórios melhor discutidos na próxima seção.

1.2 Classificação da dor

A dor é um fenômeno que tem sido classificado e categorizado ao longo do tempo em virtude de seu decurso temporal, intensidade e tipo. O primeiro critério considera o tempo de duração da dor, classificando-a em dor aguda quando perdura de 3 e 6 meses, dor crônica caso apresente tempo superior a 3 e 6 meses, persista além do decurso de uma doença aguda ou que se manifeste após o fim de um processo cicatricial. Por fim, dor aguda em dor crônica quando um episódio de dor aguda se sobrepõe a um quadro de dor crônica já estabelecida ou mesmo está subjacente a este (Chapman; Vierck, 2017; St. John Smith, 2018)

Em relação à sua intensidade, a dor pode ser classificada em dor leve, moderada e severa. Em geral utiliza-se uma escala numérica para estratificação da dor que varia de 0 a 10. Nesta escala, uma pontuação de zero implica em nenhuma dor enquanto dez correlaciona-se com a maior dor imaginável (Williams; Davies; Chadury, 2000).

Por fim, em relação ao tipo, a dor pode ser classificada em dor nociceptiva, dor inflamatória ou dor neuropática. A dor nociceptiva representa a resposta normal a insultos nocivos ou danos a tecidos como a pele, articulações, músculos, órgãos viscerais, tendões ou ossos e pode ser musculoesquelética, cutânea ou visceral. A dor inflamatória resulta da ativação e sensibilização de vias nociceptivas por uma miríade de mediadores liberados no sítio inflamatório. Mediadores cruciais que possuem um papel-chave são citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 alfa e beta (IL-1 α , IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, aminas vasoativas, mediadores lipídicos, trifosfato de adenosina, ácidos e produtos da ativação de leucócitos infiltrantes, células endoteliais vasculares ou mastócitos residentes (Taneja; Della Pasqua; Danhof, 2017; Totsch; Sorge, 2017; Cook et al., 2018).

Por fim, a dor pode ser classificada como dor neuropática, que é iniciada ou causada por uma lesão primária ou doença do sistema somatossensorial. Esta definição é ampla, abrange mais de cem condições clínicas e envolve injúrias ao longo do neuroeixo (Baron, 2006; Mannion; Woolf, 2012). Uma classificação fenomenológica da dor neuropática está relacionada ao tipo de dano ou fisiopatologia subjacentes: danos nervosos mecânicos, doenças metabólicas, doenças virais neurotrópicas, mecanismos imunológicos ou inflamatórios, isquemia focal do sistema nervoso e neurotoxicidade devido ao uso de agentes quimioterápicos (Zimmermann, 2001).

Para cada mecanismo fisiopatológico subjacente à gênese da dor neuropática, existem modelos experimentais que buscam reproduzir características relacionadas ainda que de maneira limitada tais como os modelos "*spared-nerve injury*" para danos mecânicos (Woolf; Decosterd, 2000), neuropatia diabética para doenças metabólicas (Feldman et al., 2017), neuralgia pós-herpética para doenças virais neurotrópicas (Cunha et al., 2017), dor pós-acidente vascular encefálico para isquemias focais do sistema nervoso (O'Brien et al., 2016) e neuropatia periférica induzida por quimioterápicos que se relaciona a modelos experimentais de dor neuropática relacionados a neurotoxicidade (Starobova; Vetter, 2017).

1.3 Neuropatia induzida por agentes quimioterapêuticos

O investimento em pesquisa clínica, prevenção e diagnóstico do câncer reduziu as taxas de incidência e mortalidade dessa doença, aumentando as taxas de sobrevivência. Os tratamentos antineoplásicos, as medidas de suporte e acompanhamento de pacientes oncológicos e o diagnóstico precoce permitem que quadros clínicos considerados irreversíveis possam ser controlados ou resolvidos (Peto, 2001; Herbst et al., 2006; Winer et al., 2009; Petrelli et al., 2009; Kris et al., 2010; Vogelzang et al., 2012; Roth et al., 2013; Patel et al., 2014; Masters et al., 2015; Dizon et al., 2016; Burstein et al., 2017). Todavia, um fator limitante ao tratamento quimioterápico é a existência de intensos efeitos colaterais (Byar et al., 2006). Dentre tais efeitos adversos, destaca-se a neuropatia periférica induzida por agentes quimioterapêuticos (Seretny et al., 2014; Carozzi; Canta; Chiorazzi, 2015; De Iuliis et al., 2015).

A neuropatia induzida por antineoplásicos é um efeito neurotóxico dose-limitante e uma causa comum de descontinuação do tratamento oncológico. Cerca de 30-70% dos indivíduos sob tratamento quimioterápico desenvolvem neuropatia periférica, o que depende particularmente do fármaco em uso, da combinação empregada ou posologia (Lees et al., 2017; Makker et al., 2017). Dentre os principais sintomas clínicos relacionados ao desenvolvimento da neuropatia periférica induzida por esta classe de fármacos destaca-se a dor neuropática.

A dor neuropática é caracterizada por sintomas como dor intensa e persistente na ausência de estímulos, hipersensibilidade a estímulos dolorosos e não dolorosos, dormência, formigamento e queimação que acometem especialmente as extremidades do corpo como pés e mãos (Meyer et al., 2012). Em relação à neuropatia periférica induzida por quimioterápicos, sabe-se que tais sintomas podem se manifestar durante e/ou após o término dos ciclos terapêuticos e que podem se agravar ao longo de semanas ou meses (Janes et al., 2014). Embora a neuropatia ocorra em cerca de 20% dos pacientes que recebem doses padrões de quimioterápicos, este cenário pode acontecer com quase a totalidade dos indivíduos tratados com doses aumentadas destes fármacos (Park, 2014). Fatores como a existência de neuropatia prévia, diabetes, etilismo ou ainda a combinação de quimioterápicos aumenta as chances do desenvolvimento da neuropatia no decorrer do tratamento (Jaggi; Singh, 2012).

Uma informação alarmante advinda de ensaios clínicos randomizados placebocontrolados é que muitos fármacos empregados para o tratamento de outros quadros de dor neuropática demonstram pouco efeito analgésico na dor neuropática periférica induzida por quimioterápicos (Chaudhry et al., 1994; Rao et al., 2007; Kautio et al., 2008). Por isso, modificações posológicas ou a cessação da quimioterapia são os únicos recursos capazes de limitar a insurgência da neuropatia (Li et al., 2014; Sisignano et al., 2014). Contudo, tais ajustes posológicos afetam sobremaneira o prognóstico desses pacientes (Burstein et al., 2017).

Dessa forma, é essencial que se conheça possíveis mecanismos que culminam no desenvolvimento da neuropatia periférica para que se possa reduzir a incidência deste grave efeito colateral sem a necessidade de alterações posológicas que afetem a efetividade da quimioterapia em erradicar o câncer. Adicionalmente, muitos antineoplásicos não compartilham mecanismos comuns de neurotoxicidade e aqui discutiremos aqueles relacionados ao paclitaxel.

1.4 Mecanismos envolvidos na neuropatia periférica induzida por paclitaxel

O desenvolvimento e gravidade da neuropatia periférica dependem de inúmeros fatores tais como a estrutura molecular do fármaco, as doses empregadas em cada infusão, doses cumulativas e tempo de tratamento (Cavaletti; Marmiroli, 2015). Dentre os quimioterápicos indutores de neuropatia periférica, os pertencentes à classe dos taxanos como docetaxel e paclitaxel estão altamente relacionados a essa patologia, sendo o último amplamente utilizado clinicamente para tratamento de tumores sólidos como câncer de ovário, pulmão, próstata, bexiga e esôfago (Eniu, 2005; ShimozumA et al., 2012; De Iuliis et al., 2015).

O paclitaxel foi originalmente isolado do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) e foi aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) inicialmente para o tratamento de câncer ovariano refratário, sendo introduzido no mercado em janeiro de 1993 (Rowinsky et al., 1993; Chaudhry et al., 1994). Contrariamente a outros quimioterápicos que impedem a formação de microtúbulos, este fármaco age estabilizando estas estruturas e prevenindo sua despolimerização, resultando na inibição da dinâmica normal de reorganização da rede de microtúbulos com consequente interrupção da mitose na fase G2/M seguida de morte celular por apoptose (Manfredi; Parness; Horwitz, 1982; Wilson et al., 1985; Carozzi; Canta; Chiorazzi, 2015).

Por isso, o paclitaxel, assim como todos os outros quimioterápicos que agem sobre a reorganização de microtúbulos, induzem a morte de células que estão em constante proliferação como as células tumorais, células dos folículos pilosos e células epiteliais (C.; M.A., 2010; Carozzi; Canta; Chiorazzi, 2015)

Além disso, estudos demonstram que este fármaco pode causar a morte celular de forma independente do processo de mitose. Neste caso, a droga poderia se acoplar à proteína Bcl-2, induziria sua fosforilação e morte celular por apoptose (Blagosklonny et al., 1996; Haldar; Chintapalli; Croce, 1996).

Muito embora dados impactantes de sobrevivência frente ao câncer sejam frequentemente associados ao uso de regimes quimioterápicos sustentados por taxanos, a adminstração de medicamentos pertencentes a esta classe, em especial o paclitaxel, provoca neuropatia sensorial distal e também uma síndrome de dor aguda cujos picos de dor ocorrem entre 3 a 4 dias após a administração da droga em alguns pacientes (Loprinzi et al., 2011; Sisignano et al., 2014).

Parte dos mecanismos de ação pelos quais o paclitaxel induz esses efeitos colaterais já são bem caracterizados. Dentre os mecanismos mais comuns incluem: danos ao DNA nuclear, alteração nos mecanismos de transporte axonal, mudanças nos microtúbulos, alterações na integridade do retículo endoplasmático, disfunções em canais de cálcio, potássio e sódio, mudanças na sinalização Ca⁺²-dependente, modificações na vascularização periférica, mudanças na expressão de receptores TRP e na sinalização glutamatérgica, produção de espécies reativas de oxigênio e prejuízos às funções mitocondriais (Canta; Pozzi; Carozzi, 2015)

Um dos principais mecanismos de ação do paclitaxel sobre neurônios caracteriza-se pela ruptura do transposte axonal. Uma vez que esta droga atua como um factor de estabilização de tubulina, a inibição da despolimerização de microtúbulos induzida pela droga dificulta o transporte axonal e pode levar à axonopatia e, consequentemente, à perda de inervação epidérmica (Siau; Xiao; Bennett, 2006; Kavallaris, 2010; Shemesh; Spira, 2010; LaPointe et al., 2013).

Por fim, sabe-se que a síndrome de dor aguda desenvolvida durante o tratamento com paclitaxel está associada à sensibilização de neurônios sensoriais periféricos, que poderiam ser causados por sensibilização inicial ou a ativação de diferentes canais iônicos após a administração do quimioterápico tais como canais de cálcio, receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDAR) e receptores de potencial transitório do tipo vanilóide 4 (TRPV4) (Alessandri-Haber et al., 2008; Pascual et al., 2010; Loprinzi et al., 2011).

Estudos demonstram que o tratamento com quelantes de cálcio assim como com antagonistas dos ligantes desses canais são capazes de reduzir a hiperalgesia durante a síndrome da dor aguda provocada pelo paclitaxel (Alessandri-Haber et al., 2008; Pascual et al., 2010; Loprinzi et al., 2011). Uma vez que o próprio paclitaxel não é capaz de ativar esses canais iônicos diretamente, é possível que mediadores de sinalização endógenos induzidos pela droga participem da sensibilização desses canais, alterando sua ativação e induzindo modificações celulares importantes no desenvolvimento da neuropatia (Sisignano et al., 2014).

Além dos seus efeitos sobre os neurônios, o tratamento com paclitaxel, direta ou indiretamente provoca uma robusta ativação de astrócitos, o que desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1β e IL-6 (Jaggi; Singh, 2012; Sisignano et al., 2014).

Estas citocinas causam a sensibilização de neurônios nociceptivos e desencadeiam um quadro de inflamação neurogênica. O papel dessas citocinas sobre as células da micróglia ainda permanece obscuro e a participação da micróglia espinal no desenvolvimento da neuropatia induzida por paclitaxel permanece controverso (Peters et al., 2007a, 2007b; Zhang et al., 2012). Entretanto, alguns estudos reportam que a inibição farmacológica seletiva desses células com minociclina atenua o desenvolvimento de dor neuropática induzida por esse fármaco (Cata et al., 2006).

E importante ressaltar que a lesão neuronal induzida por paclitaxel pode também ser o estímulo inicial para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória local nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal. É descrito que após a lesão dessas células há a infiltração de macrófagos nos gânglios e nos nervos periféricos (Peters et al., 2007b). O recrutamento robusto e ativação de células inflamatórias, com subsequente desenvolvimento de um quadro de inflamação neurogênica nos gânglios da raiz dorsal ocorre após a fase aguda do tratamento com paclitaxel (Siau; Xiao; Bennett, 2006; Sisignano et al., 2014). O processo inflamatório inicia-se de 4 a 7 dias após o tratamento quando a dor aguda inicial já cessara (Peters et al., 2007b; Sisignano et al., 2014). Desse modo, especula-se que a resposta inflamatória gerada nessa fase contribuiria para o desenvolvimento da dor neuropática persistente que é típica da neuropatia periférica induzida por paclitaxel (Sisignano et al., 2014).

Todavia, ainda que mecanismos neurodegenerativos pareçam possuir papel relevante na fisiopatologia da neuropatia periférica induzida por paclitaxel, os danos à homeostase energética parecem ser tão cruciais quanto os mecanismos citados. Dessa forma, a disfunção bioenergética resultante do tratamento quimioterápico contribui sobremaneira para a gênese e manutenção dessa doença e é um aspecto primordial a ser discutido.

1.5 Repercussões metabólicas na neuropatia periférica induzida por paclitaxel

Mitocôndrias são organelas celulares localizadas no citoplasma de células eucarióticas, possuem DNA próprio também chamado de DNA mitocondrial (DNAm), que por sua vez codifica cerca de treze proteínas. Estas organelas estão envolvidas na síntese das subunidades proteícas da cadeia de transporte de elétrons e estão implicadas na produção energética celular (Clayton, 2002).

Possuem uma maquinaria complexa e o seu correto funcionamento é essencial para a preservação de diversas vias de sinalização inter-relacionadas tais como as vias de sinalização apoptótica, regulação do cálcio intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio. Estão envolvidas também em eventos de morte celular dependentes da enzima citocromo c, que participa de processos apoptóticos em resposta a estímulos inerentes a tais processos, sendo liberada no citosol com consequente ativação da caspase 9 e interação com o fator-1 de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) e ATP (Ferri; Kroemer, 2001; Shishkin et al., 2002; Kim et al., 2004; Joseph; Levine, 2006).

Nos últimos anos, diversos modelos animais de neuropatia induzida por quimioterápicos atentaram para a "hipótese da mitotoxicidade" que suporta o prejuízo funcional da mitocôndria devido a danos aos neurônios sensoriais. Corroborando com tal hipótese, alterações morfológicas e funcionais da mitocôndria parecem estar envolvidas na neuropatia induzida por agentes quimioterapêuticos (Flatters; Bennett, 2006; Xiao et al., 2011a; Zheng; Xiao; Bennett, 2011b; Xiao; Bennett, 2012; Xiao; Zheng; Bennett, 2012).

Ademais, a repercussão da toxicidade mitocondrial reverbera em regiões de alta demanda metabólica como os neurônios aferentes primários os quais possuem elevada concentração mitocondrial. Em neurônios, o dano mitocondrial pode causar prejuízo bioenergético que modifica o funcionamento correto de canais de sódio voltagem-dependentes, alterando a capacidade neuronal de sintetizar transportadores iônicos.

Isso contribui para despolarização da membrana e descargas espontâneas anômalas seguidas de degeneração dos neurônios sensoriais primários e das fibras intraepidermais (Klooster; Studholme; Yazulla, 2001; Xiao; Naso; Bennett, 2008; Xiao; Bennett, 2012; Areti et al., 2014; Bennett; Doyle; Salvemini, 2014).

Adicionalmente, análises microscópicas realizadas em axônios de neurônios sensoriais primários de ratos revelou alterações na morfologia mitocondrial como aumento do volume e formação de vacúolos mitocondriais (Flatters et al., 2006; Jin et al., 2008), fenômeno presente também nos gânglios da raiz dorsal de animais tratados com paclitaxel (Xiao et al., 2011; Zheng; Xiao; Bennett, 2011). Estes danos precedem apoptose neuronal cuja participação de diferentes vias apoptóticas podem ocorrer tais como ativação da cascata de caspase, desregulação do cálcio intracelular, danos ao DNA mitocondrial, perca da atividade de enzimas antioxidantes, alterações na cadeia de transporte de elétrons e potencial de membrana (Siau; Bennett, 2006; Bennett, 2010). Adicionalmente, o tratamento com paclitaxel promove um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para que o dano mitocondrial também dependa do estresse oxidativo como um provável mecanismo (Han; Smith, 2013; Areti et al., 2014; Griffiths; Flatters, 2015; Duggett et al., 2016; Carrasco et al., 2018).

Além disso, a neuropatia periférica induzida por paclitaxel pode causar alterações metabólicas no sistema nociceptivo. O aumento do consumo de glicose no em neurônios aferentes primários enfatiza alterações metabólicas locais e sugere fortemente que o acúmulo de metabólitos possa ser uma consequência significante da neuropatia. Ademais, foi demonstrado que os neurônios do gânglio da raiz dorsal sofrem danos bioenergéticos com aumento do metabolismo glicolítico e prejuízo funcional à cadeia de transporte de elétrons com consequente redução na capacidade respiratória (Zheng; Xiao; Bennett, 2011b; Xiao; Bennett, 2012; Duggett; Griffiths; Flatters, 2017).

Tal prejuízo na dinâmica bioenergética pode levar a mudanças metabólicas, ocorrendo parada ou mesmo reversão do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Intermediários do ciclo do ácido cítrico, como o succinato, se acumulam na mitocôndria, no citosol e fora da célula em condições de deprivação de oxigênio tais como ocorre em doenças neurodegenerativas com as quais a neuropatia periférica compartilha vias moleculares comuns (Lukyanova; Kirova, 2015; Lukyanova; Kirova; Germanova, 2016). Tal fenômeno deve-se à inibição da succinato desidrogenase por nucleotídeos de flavinas e nicotinamidas não oxidados assim como por espécies reativas de oxigênio, que são produzidas concomitantemente (Sapieha et al., 2008; Toma et al., 2008; Ariza; Deen; Robben, 2012).

Recentemente, alterações metabólicas são alvos de intensa investigação científica em diferentes sistemas biológicos e a quebra da homeostase devido ao desequilíbrio metabólico causado pela atividade celular anormal é uma consequência comum dentre diversas patologias (Johnson; Ivanisevic; Siuzdak, 2016). Muito se conhece a respeito da mudança fenotípica do sistema nociceptivo durante e após a transição de dor aguda para dor crônica. Todavia, não há evidências sobre o papel de metabólitos direta ou indiretamente nesse processo de transição e existe a possibilidade de se comportarem como ligantes de receptores específicos ou de mudarem o ambiente tecidual ou celular (Zelezniak; Sheridan; Patil, 2014).

Nesse contexto, diante da impossibilidade da oxidação do succinato pela atividade da succinato desidrogenase conforme descrito, este intermediário poderia se acumular e ser exportado para domínios extra-mitocondriais pela atividade do cotransportador succinato/fumarato/malato (Krebs, 1970) e exercer efeitos biológicos por meio da ativação do receptor de succinato também conhecido como GPR91 ou SUCNR1 (He et al., 2004; Hebert, 2004; De Castro Fonseca et al., 2016). Dessa forma, descrever o papel dessa via de sinalização em outros contextos patológicos pode fornecer subsídios para a compreensão de seu possível papel na dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

1.6 O papel sinalizador do succinato via GPR91

Em 1920, o succinato foi primeiramente correlacionado a uma sequência de oxidação de carboidratos proposta por Thorsten Thunberg (Thunberg, 1920). Na década seguinte, esta sequência de reações oxidativas foi melhor descrita graças aos estudos de Albert Von Szent-Györgyi com os músculos peitorais de pombos (Banga; Szent-Györgryi, 1936). Consequentemente, o papel catalítico do succinato como um intermediário carreador de hidrogênio na respiração aeróbica foi descoberta.

No fim da década de 1930, Hans Krebs descreveu o cerne da respiração aeróbica, o ciclo de Krebs – também conhecido como ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo do ácido cítrico (Krebs, 1970; Krebs; Johnson, 1980). Após muitas décadas, o succinato foi considerado apenas como um intermediário desse ciclo o qual foi considerado como sua via sintética única.

Todavia, evidências científicas já demonstraram que o succinato pode ser produzido por vias alternativas além da oxidação do succinil-CoA pela succinil-CoA sintetase. Isto se torna possível em situações de estresse oxidativo nas quais algumas enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos estão inibidas. Uma possível fonte de succinato pode ser devido ao acúmulo de α -cetoglutarato alternativamente produzido por transaminação que, combinado com a inibição da α -cetoglutarato desidrogenase, leva à descarboxilação não-enzimática de α -cetoglutarato a succinato (Fedotcheva; Sokolov; Kondrashova, 2006). Adicionalmente, o succinato pode se originar pela transaminação do oxalacetato com o glutamato, formando α -cetoglutarato e aspartato, servindo de aporte para a síntese de succinato (Fedotcheva; Sokolov; Kondrashova, 2006).

De maneira alternativa, a exposição à hipóxia tecidual induz reprogramações regulatórias na cadeia de transporte de elétrons tais como a supressão da função de transporte de elétrons dos complexos mitocondriais I e ativação da via de oxidação do succinato pelo complexo mitocondrial II ou succinato desidrogenase. A contribuição da

respiração dependente de NAD em tecidos diminui e a contribuição da oxidação dependente de succinato aumenta, atingindo 70 – 80% do consumo de oxigênio total no corpo. O decréscimo na eficiência do complexo mitocondrial I e ativação da succinato desidrogenase em estágios iniciais da hipóxia tecidual estão interrelacionados e representam uma resposta compensatória frente à baixa disponibilidade de oxigênio (Lukyanova; Kirova; Germanova, 2016).

Contrariamente aos dados reportados, estudos mostram que infusões de dimetilmalonato, um precursor de malonato e inibidor competitivo da succinato desidrogenase reduziu o acúmulo de succinato em modelos experimentais de isquemia, demonstrando que a elevação nos níveis desse intermediário durante um contexto isquêmico é devido à um funcionamento reverso da succinato desidrogenase, reduzindo o fumarato gerado pela lançadeira malato/aspartato e do ciclo de purinas nucleotídicas formados em tais condições (Taegtmeyer, 1978; Chouchani et al., 2014; O'Neill, 2014; Murphy; O'Neill, 2018)

Dessa forma, o succinato assume um papel central no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, sendo um importante ponto de convergência bioquímica que pode ser gerado por diferentes vias metabólicas mitocondriais. Em condições de hipóxia, o succinato passa a ser formado por vias alternativas a esse ciclo, sua concentração tecidual pode aumentar e esse metabólito pode exercer efeitos além de sua função energética (De Castro Fonseca et al., 2016).

Assim, uma vez acumulado na matriz mitocondrial, o succinato pode ser transportado ao citosol pelo transportador localizado na membrana mitocondrial interna. O SLC25A10, um cotransportador dos íons succinato/fumarato/malato é considerado até o momento como responsável por essa translocação. A segunda fase desse transporte, na qual o succinato atravessa a membrana mitocondrial externa, ocorre supostamente por meio de porinas. Estas são canais proteicos através das quais moléculas cujo peso molecular não ultrapassa 1,5KDa podem atravessar de maneira inespecífica (Helfand et al., 2002; Ganapathy et al., 2004).

Por último, o succinato possui um sistema de efluxo rápido para a corrente sanguínea. A proteína de transporte chamada INDY (*I'm not dead yet* – em relação à sua aparente relação com a longevidade) é um transportador de ânions sódioindependente que é capaz de realizar a permuta de ânions dicarboxílicos e citrato através da membrana celular (Helfand et al., 2002; Ganapathy et al., 2004).

É interessante mencionar que já em 1970 Krebs notou que alguns dos metabólitos estudados, incluindo succinato, poderiam se acumular em espaços intersticiais em situações de deprivação de oxigênio apesar dos mecanismos e implicações metabólicas para tal fenômeno não estivessem completamente elucidados à época (Krebs, 1970).

Muitas funções relacionadas ao succinato além do seu papel energético no ciclo dos ácidos tricarboxílicos estão associadas com um receptor acoplado à proteína G conhecido como GPR91 ou SUCNR1, que possui o succinato como ligante específico e medeia diversas funções biológicas (He et al., 2004).

O GPR91 emergiu então como um dos primeiros respondedores a condições de estresse como isquemia, hipóxia e hiperglicemia (He et al., 2004). De acordo com muitas bases de dados, a sequência humana do gene de GPR91 (Acc. Número EAW78789) codifica uma proteína de 334 aminoácidos cuja regulação em níveis molecular e celular ainda é limitada, muito embora já esteja claro que este receptor é presente na membrana celular onde se liga ao succinato. (Ariza; Deen; Robben, 2012).

O succinato foi identificado como ligante para o até então receptor órfão GPR91 usando cromatografia líquida de fase reversa acoplada com espectroscopia de massas. Os valores de EC₅₀ para a ativação do receptor variaram entre 20 - 50µM dependendo do ensaio utilizado. Foi demonstrado de maneira definitiva que o succinato é o ligante

33

endógeno desse receptor após o teste de 800 compostos farmacologicamente ativos e ligantes conhecidos de receptores acoplados à proteína G assim como 200 ácidos carboxílicos e compostos estruturalmente relacionados ao succinato, incluindo intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos α-cetoglutarato, citrato, isocitrato, malato e oxalacetato, além de múltiplos compostos purinérgicos (He et al., 2004).

Em relação à distribuição tecidual do receptor de succinato, análises da expressão gênica demonstraram a presença de GPR91 nos rins, fígado e baço (He et al., 2004). Ademais, a presença do receptor foi também confirmada no tecido adiposo branco, cardiomiócitos, plaquetas, macrófagos, células dendríticas imaturas e neurônios do gânglio retinal (Ariza; Deen; Robben, 2012).

O GPR91 foi originalmente descrito como sendo acoplado a ambas proteínas G_i e G_q em células embrionárias humanas (HEK293) (He et al., 2004). Esses resultados iniciais foram posteriomente confirmado em células renais caninas polarizadas (MDCK) (Robben et al., 2009). Muitos outros estudos confirmaram também a ativação da proteína G_i pela demonstração de um aumento nos níveis de AMP cíclico após acoplamento do succinato ao GPR91 (HakaK et al., 2009; Gnana-Prakasam et al., 2011; Högberg et al., 2011; Sundström et al., 2013; Gilissen et al., 2015). Porém, o acoplamento do GPR91 à proteína G_q tem sido proposto por diversos estudos que observaram mobilização de cálcio intracelular como consequencia da ativação da enzima fosfolipase- β pelo dímero $\beta\gamma$ (Sundström et al., 2013; Gilissen et al., 2015).

O acoplamento do succinato ao GPR91 leva à ativação da via das MAP kinases, especialmente as kinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERK-1/2) em linhagens celulares HEK293 (He et al., 2004; Gilissen et al., 2015), MDCK (Robben et al., 2009), células dendríticas imaturas (Rubic et al., 2008), linhagens celulares de neurônios do gânglio retinal (Hu et al., 2013) e cardiomiócitos (Aguiar et al., 2014). Muitos desses resultados sugerem que a ativação de ERK-1/2 é um evento dependente da atividade de G_i e deveria provavelmente ser mediada pelo dímero $\beta\gamma$ (Hakak et al., 2009). Ademais, a ativação desse receptor promove o aumento da atividade da enzima proteína kinase A (PKA), sugerindo uma sinalização de GPR91 via proteína Gs/AMPc em plaquetas (Högberg et al., 2011).

A implicação biológica da via de sinalização succinato/GPR91 é reportada em diversos contextos patológicos em que esse intermediário metabólico parece exercer papel relevante tais como hipertensão (Aguiar et al., 2014), diabetes e obesidade (Toma et al., 2008), fisiologia plaquetária e hematopoiética (Hakak et al., 2009; Högberg et al., 2011), angiogênese retinal (Sapieha et al., 2008), danos por isquemia e reperfusão (He et al., 2004) e doenças inflamatórias (Tannahill et al., 2013; Chouchani et al., 2014; Mills; O'Neill, 2014; Mills et al., 2016, 2018a, 2018b).

Dentro do sistema nociceptivo, o papel do receptor de succinato se mantem pouco explorado, havendo apenas evidência da expressão do GPR91 em neurônios aferentes primários e secundários e um estudo clínico que valida o GPR91 como biomarcador da fibromialgia (Diehl et al., 2016; Malatji et al., 2017). Não havendo ainda nenhum estudo que correlacione o papel da via de sinalização succinato/GPR91 na fisiopatologia da neuropatia induzida por paclitaxel, que conforme descrito anteriormente, possui um forte comprometimento mitocondrial (Feldman et al., 2017).

Portanto, sabendo-se que a neuropatia induzida por paclitaxel causa déficit bioenergético mitocondrial devido ao prejuízo funcional aos complexos mitocondriais I e II e por elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (Xiao; Bennett, 2012; Duggett et al., 2016; Duggett; Griffiths; Flatters, 2017; Feldman et al., 2017), mecanismos estritamente relacionados ao acúmulo de succinato (Lukyanova; Kirova, 2015), hipotetizamos que a via de sinalização succinato/GPR91 possa contribuir para a gênese da neuropatia periférica induzida por paclitaxel. Tal hipótese se mantém inexplorada, havendo apenas evidência da expressão do GPR91 em neurônios aferentes primários e secundários e um estudo clínico que valida o GPR91 como biomarcador da fibromialgia (Diehl et al., 2015; Malatji et al., 2017).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar o papel da via de sinalização succinato e seu receptor (GPR91) no desenvolvimento da dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

Objetivos específicos

2.1.1. Avaliar o perfil de expressão gênica global e diferencial da população de neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal da medula espinal após o tratamento com paclitaxel

2.1.2. Determinar o decurso temporal dos níveis de succinato no gânglio da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel

2.1.3. Avaliar o decurso temporal de respostas nociceptivas na dor neuropática periférica induzida por paclitaxel na ausência e presença do receptor GPR91

2.1.4. Determinar a localização do GPR91 dentro do sistema nociceptivo e o perfil de expressão gênica desse receptor durante a dor neuropática induzida por paclitaxel

2.1.5. Determinar o perfil de expressão gênica das enzimas do ciclo do ácido cítrico nos nervos ciático e gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise de transcritos de TRAP – SEQ

O banco de dados de sequenciamento gênico GSE113941 foi utilizado para avaliação de genes diferencialmente expressos pela população de neurônios Nav1.8 positivos do gânglio da raiz dorsal da medula espinal em condição normal ou após quatro ciclos de tratamento com paclitaxel. Foi utilizado o pacote *gplots* para o cálculo de *fold-changes* calculada em log2 da diferença de expressão entre grupos e se considerou p<0,1 como diferença estatisticamente significante na análise entre os grupos "normal" vs "CIPN". Posteriormente, realizou-se uma normalização gene a gene para a execução da função *heatmap.2* e obtenção de um *heatmaps* representativos dos genes diferencialmente expressos nas duas condições estabelecidas.

3.2 Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob o protocolo 225/2017 (**Anexo 1**). Foram utilizados camundongos C57BL/6 e camundongos deficientes para GPR91 obtidos no Biotério Central e do Departamento de Genética do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, respectivamente. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas pela IASP (International Association for the Study of Pain) a fim de minimizar o sofrimento animal durante todo o curso do procedimento experimental.

3.3 Determinação de metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos

A concentração de succinato nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal foi determinada por meio de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (H-NMR, 600Hz). Os animais foram sacrificados e a coleta das amostras biológicas deu-se na ausência de perfusão intra-cardíaca. As amostras tiveram o peso úmido determinado após coleta, foram acondicionadas em -80 °C até posterior processamento. Para isto, 500 µL de uma solução metanol/clorofórmio (2:1) a 4 °C foi adicionada a cada amostra, que foi então sonicada por 60 segundos em uma frequência de 60 Hz. Após 15 minutos de repouso a 4 °C, foi adicionado um volume proporcional de solução de água deionizada e clorofórmio a 4 °C. Após isso, as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos e centrifugadas a 14000 rpm durante 20 minutos a 4ºC. Ao término dessa etapa, a fração do sobrenadante que contém metanol, água e metabólitos foi coletada e transferida para novos tubos. Por fim, as amostras foram liofilizadas (SpeedVac) até que nenhum sinal visível de umidade permanecesse nas amostras. Uma vez liofilizadas, as amostras foram diluídas em água deuterada (D₂O) e ácido trimetilsililpropanóico (TSP - 0,5mM; pH 7,4), que foi usado como padrão interno do ensaio. A aquisição dos espectros foi realizada em espectrômetro de ressonância magnética nuclear (H-NMR, 600Hz) e a interpretação e processamento dos dados foi realizada no software Chenomx v7.1. A concentração dos metabólitos foi determinada em relação a concentração do padrão interno TSP e foi posteriormente ajustada à massa do tecido coletado, sendo representada em µM/mg de tecido.

3.4 Modelo Experimental de Dor Neuropática

3.4.1 Neuropatia Induzida por Paclitaxel

Camundongos C57BL/6 e GPR91^{-/-} receberam quatro doses alternadas de paclitaxel (ONTAX®) 8 mg/kg por via de administração intraperitoneal, totalizando 32 mg/kg a dose cumulativa ao término do tratamento.

3.4.2 Nocicepção Mecânica

A avaliação da hipersensibilidade nociceptiva mecânica em camundongos foi realizada como previamente descrito (Cunha *et al.*, 2004). Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 30-45 minutos antes do experimento, para habituação ao ambiente. O limiar mecânico foi determinado pelo método de von Frey filamentos avaliando o limiar de retirada após estimulação na área central da pata. O estímulo foi interrompido após a observação da resposta nociceptiva, caracterizada por flexão seguida de retirada da pata, "*flinch*". Cada um dos filamentos de von Frey foi aplicado uma vez por aproximadamente 3 segundos. O filamento de menor força capaz de induzir resposta foi determinado como sendo o limiar mecânico de retirada da pata (g).

3.4.3 Frequência de retirada da pata

Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 30-45 minutos antes do experimento, para habituação ao ambiente. A frequência de retirada de pata foi determinada pelo uso de dois filamentos de von Frey (0.02g e 0.16g), avaliando o número de respostas de retirada da pata após 10 estímulos na área central da pata caracterizada por flexão seguida de retirada da pata, "*flinch*". As respostas foram expressas em médias absolutas do número de respostas positivas após dez estímulos.

3.4.4 Alodinia ao frio (teste da acetona)

No mesmo aparato onde é realizado o teste de von Frey e sob as mesmas condições, uma gota (50 µL) de acetona PA foi instilada na área central da superfície plantar da pata posterior com auxílio de uma seringa de 1 mL, sem agulha, abrangendo a superfície plantar e o dorso da pata. O estímulo frio causado pela acetona provoca comportamentos de agitação e elevação da pata além de lambidas. Esse tipo de resposta é caracterizado como comportamento nocifensivo e o tempo gasto pelo animal foi mensurado em segundos com o auxílio de um cronômetro. As respostas podem ser intermitentes, por isso, o cronômetro era parado e ativado conforme o comportamento do animal. Cada animal foi observado por um total de 60 segundos.

3.4.5 Latência ao calor (Método de Hargreaves)

Os animais foram colocados em um aparelho Hargreaves (Hugo Basile) para avaliação da latência de resposta a um estímulo térmico a 32°C. Após 45 minutos de ambientação à plataforma, um feixe infravermelho foi direcionado ao centro da pata de cada animal e o tempo necessário para a elaboração de uma resposta de retirada da pata, caracterizada por flexão seguida de retirada da pata, "*flinch*", foi registrado em segundos. Cada registro foi realizado em triplicata para cada animal e a média das três medidas foi utilizada para a expressão do tempo de latência de resposta ao estímulo térmico. Um total de 20 segundos foi utilizado como *cut-off* para esta avaliação comportamental, acima do qual não se considerou nenhum valor que possivelmente pudesse ser obtido durante a avaliação.

3.5 Coleta e processamento de amostras biológicas

Os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.) por via subcutânea e perfundidos tão logo não apresentassem mais qualquer sinal reflexo. Para a realização dos experimentos de qRT-PCR, os camundongos foram perfundidos apenas com tampão fosfato (PBS pH 7,2-7,4), em temperatura ambiente, por três minutos (5 mL/min), enquanto para a realização dos experimentos de imunofluorescência, os camundongos foram perfundidos com tampão fosfato (PBS pH 7,2-7,4), em temperatura ambiente, por três minutos (5 mL/min), enquanto para a realização dos experimentos de imunofluorescência, os camundongos foram perfundidos com tampão fosfato (PBS pH 7,2-7,4), em temperatura ambiente, por três minutos (5 mL/min) seguido de 4% PFA a 4ºC. Posteriormente, foi realizada uma incisão póstero-mediana no dorso do animal,

seguida de abertura, por planos, até a exposição das lâminas ósseas da coluna vertebral. Após laminectomia, a região medular foi exposta, permitindo a coleta da medula e dos gânglios correspondentes. Além disso, a região lateral de ambas as patas posteriores foi incisada, os músculos divulsionados e amostras do nervo ciático medindo entre 3 a 5 mm foram coletadas. As regiões coletadas correspondem às aferências de fibras nervosas sensitivas dos membros posteriores do animal.

3.6 Ensaio de qRT-PCR

As amostras coletadas foram armazenadas em reagente de Trizol (Sigma) e acondicionadas em freezer -80°C. Após trituração do tecido, a extração do RNA total foi realizada de acordo com o fabricante. O RNA total foi reversamente transcrito para DNA complementar pela enzima transcriptase reversa MultiScribe®, pertencente ao kit High Capacity (Life-Invitrogen). A amplificação dos genes de interesse se deu a partir da utilização de primer Sigma® para os genes descritos (tabela 1). O ensaio de qRT-PCR foi executado com volume final da reação de 10 µL e mantido a 95° C (10 min), seguido de 40 ciclos de 95° C (15 segundos) e 60° C (1 min). A reação foi realizada no sistema Step One (Life-Applied Biosystems) e a expressão do RNA mensageiro para gapdh usada como controle da integridade tecidual e da reação em todas as amostras. Os resultados foram analisados através do método comparativo de *cycle threshold* (CT) (Schmittgen, Livak, 2008).

Gene	Sigla	Sequência F	Sequência R
Gliceraldeído	gapdh	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-	5'-
fosfato		3'	CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'
desidrogenase			
Citrato sintase	CS	5'-	5'-
		GGACAATTTTCCAACCAATCTGC	TCGGTTCATTCCCTCTGCATA-
		-3'	3'
Isocitrato	idh-2	5'-CACCGTCCATCTCCACTACC-	5'-CAGCACTGACTGTCCCCAG-
desidrogenase		3'	3'
-2			
Aconitase-2	aco-2	5'-	5'-
		ATCGAGCGGGGAAAGACATAC-	TGATGGTACAGCCACCTTAGG-
		3'	3'
Oxoglutarato	ogdh	5'- GGAACTGCCCTCTAGGGAGA-	5'-
desidrogenase		3'	GACGCTACCACTGTTAATGACC
			-3'
Succinil-CoA	sucla-	5'-	5'-
sintetase	2	ACTGCCATGACTATTCCTTGTG-	ACAGTCCAGCAAGTAACAGAA
		3'	G-3'
Succinato	sdh-a	5'-	5'-
desidrogenase		GGAACACTCCAAAAACAGACCT-	CCACCACTGGGTATTGAGTAG
– subunidade a		3'	AA-3'
Succinato	sdh-b	5'-GCTGCGTTCTTGCTGAGACA-	5'-
desidrogenase		3'	ATCTCCTCCTTAGCTGTGGTT-
– subunidade b			3'
Succinato	sdh-c	5'-TGGTCAGACCCGCTTATGTG-	5'-
desidrogenase		3'	GGTCCAGTGGAGAGATGCAG-
– subunidade c			3'
Fumarato	fh	5'-	5'-
hidratase		GAATGGCAAGCCAAAATTCCTT-	CGTTCTGTAGCACCTCCAATCT
		3'	T-3'
Malato	mdh-2	5'-TTGGGCAACCCCTTTCACTC-3'	5'-
desidrogenase			GCCTTTCACATTTGCTCTGGTC
-2			-3'
Receptor	gpr91		
acoplado à			
proteína G 91			

Tabela 1 – Lista de sequencias de *primers* para PCR em tempo real.

3.7 Imunofluorescência

Amostras de gânglios da raiz dorsal e medula espinal foram pós-fixadas em PFA 4% *overnight*, desidratadas em sacarose 10%, congeladas em TissueTek® e mantidas a -20°C para realização de reações de imunofluorescência. Foram empregados anticorpos específicos anti-GPR91, anti-CGRP, anti-TRPV1, anti-IB4 e anti-NF200, marcadores do receptor de succinato, fibras peptidérgicas e não-peptidérgicas e neurônios de grande diâmetro. Foram realizados cortes de 16 e 20 micrômetros de espessura de gânglio da raiz dorsal e medula espinal, respectivamente. Os cortes foram fixados em câmara a vácuo por 40 minutos, posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS por 5 minutos, bloqueadas por 60 minutos em solução de PBS contendo 0,1 % de Triton X 100 e 1% de BSA para o bloqueio das ligações inespecíficas e permeabilização do tecido. Após um ciclo de 3 lavagens de 5 minutos com PBS, os cortes de tecidos foram incubados com anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos diluídos na mesma solução do bloqueio, *overnight* a 4°C. Após novo ciclo de lavagens, os cortes foram cobertos com lamínulas, que foram fixadas com o meio de montagem apropriado contendo DAPI e posteriormente analisadas por microscopia confocal.

3.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) que foram então avaliados por meio de ANOVA one-way seguido de Bonferroni. O nível de significância foi considerado para valores de p< 0,05. As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software*).

4. RESULTADOS

Análise da expressão gênica global e de vias celulares diferencialmente expressas em nociceptores na dor neuropática induzida por paclitaxel

A partir de um banco de dados obtido do sequenciamento de RNA de célula única de neurônios NaV1.8 positivos presentes nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal (Dougherty et al., 2018) após quatro ciclos de tratamento com paclitaxel (4mg/kg; i.p.) realizamos a análise da expressão global de genes diferencialmente expressos, de vias biológicas enriquecidas e dos genes codificadores das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos por análise de bioinformática.

A avaliação do conjunto de transcritos após purificação por afinidade ao ribossomo (TRAP – SEQ), que por sua vez representa a fração do RNA sendo traduzida, mostra o conjunto global de genes diferencialmente expressos na população de neurônios sensitivos NaV1.8 positivos após quatro ciclos completos de tratamento com paclitaxel (Figura 1a).

Dentro dessa avaliação inicial, realizamos a análise das vias celulares diferencialmente expressas na população neuronal citada. Esta avaliação agrupa conjuntos de genes que participam de vias celulares comuns e pode sugerir o enriquecimento de certas vias biológicas que possam estar perturbadas. Os resultados do *reactoma* demonstram que o ciclo dos ácidos tricarboxílicos foi a via biológica que apresentou maior expressão diferencial após tratamento com paclitaxel (Figura 1b).

Ademais, quando se avaliou a expressão gênica de cada componente enzimático deste ciclo, observou-se também aumento da expressão diferencial das enzimas que compõem esta via biológica (Figura 1c). Dessa forma, estes dados sugerem que o tratamento com paclitaxel pode promover uma desregulação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e que esta alteração pode contribuir para a gênese da dor neuropática induzida por este quimioterápico.



Figura 1. Análise do perfil gênico de nociceptores do gânglio da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel. **(a)** Perfil gênico global de neurônios NaV1.8+ do gânglio da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel. **(b)** Perfil de genes diferencialmente expressos (log2 fold-change -1.5< e >1.5) pela população de neurônios NaV1.8+ do gânglio da raiz dorsal da medula espinal após tratamento com paclitaxel (p<0.1). **(c)** *Reactome* de vias biológicas diferencialmente expressas em neurônios NaV1.8+ do gânglio da raiz dorsal da medula espinal na dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. **(d)** Rede de interação proteica de enzimas da via dos ácidos tricarboxílicos e enzimas mitocondriais em neurônios NaV1.8+ do gânglio da raiz dorsal da medula espinal na dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. **(d)** Rede de interação proteica de enzimas da via dos ácidos tricarboxílicos e enzimas mitocondriais em neurônios NaV1.8+ do gânglio da raiz dorsal da medula espinal na dor neuropática periférica induzida por paclitaxel a dor neuropática periferica induzida por paclitaxel. **(d)** Rede de interação proteica de enzimas da via dos ácidos tricarboxílicos e enzimas mitocondriais em neurônios NaV1.8+ do gânglio da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel.

Avaliação dos níveis de succinato nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel

A primeira série experimental averiguou o decurso temporal dos níveis teciduais de succinato nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante o tratamento com paclitaxel por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Figura 2). Observouse que a concentração de succinato no grupo veículo alcançou valores superiores a 0,05 µM/mg de tecido e que, apesar de não se ter observado diferenças estatisticamente significativas, a concentração deste metabólito tendeu a aumentar ao longo do decurso temporal da doença. Apesar das limitações da técnica aplicada, a abordagem experimental revela que os níveis do ligante de GPR91 parece se elevar durante a doença, o que pode sugerir um papel para o eixo de sinalização succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática induzida por paclitaxel.



Succinato - Gânglio da raiz dorsal

Figura 2. Decurso temporal dos níveis de succinato nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. Concentração de succinato em μM/mg de tecido determinada por H-NMR (600Hz).

A deleção do receptor de succinato atenua a dor neuropática induzida por paclitaxel

A segunda série experimental averiguou o perfil de respostas nociceptivas de animais com deleção total do receptor de succinato. Para tanto, animais wildtype e com deleção total de GPR91 foram submetidos a quatro ciclos de tratamento com paclitaxel (8mg/kg; i.p.) e tiveram seu perfil de respostas nociceptivas determinado (Figura 3).

Os resultados dos valores de limiar de retirada de pata (log₁₀ mg) mostram que camundongos C57Bl/6 apresentam estabelecimento da alodinia mecânica após o segundo ciclo de tratamento com paclitaxel (8 mg/kg; i.p.), que se mantem até o último dia experimental de avaliação, apresentando caráter irreversível (Figura 3a).

Em relação aos valores de limiar de retirada de pata dos camundongos C57BI/6 com deleção de GPR91, nota-se um perfil de atenuação da neuropatia induzida por paclitaxel seguindo esse regime posológico e que existe diferença estatística entre os grupos com deleção do receptor de succinato e paclitaxel durante todo o decurso temporal avaliado (Figura 3a).

Adicionalmente, o perfil de resposta de alodinia ao frio, observado no teste da evaporação da acetona, mostrou um aumento médio do tempo dispendido em respostas nocifensivas no grupo de camundongos C57Bl/6 *wildtype* tratados com paclitaxel. Esse perfil contrasta com o do grupo de camundongos com deleção total do receptor de succinato, no qual o perfil de respostas nocifensivas apresentou-se atenuado (Figura 3b).

A análise da frequência de retirada de pata após dez estímulos com filamentos Von Frey 0,02g e 0,16g demonstrou também um perfil de atenuação da neuropatia induzida por paclitaxel (Figuras 3c e 3d). Os gráficos de frequência de respostas mostram também um perfil de resposta atenuada em camundongos C57BI/6 com deleção total de GPR91 em relação ao grupo paclitaxel.

Em relação à resposta comportamental de hipoalgesia ao calor, camundongos C57BI/6 tratados com paclitaxel apresentaram um aumento no tempo de latência de

resposta ao calor, diferindo estatisticamente do grupo veículo entre os dias experimentais 3 e 16, havendo um retorno aos níveis basais de tempo de resposta após 19 dias de avaliação (Figura 3e).

Esse aumento no tempo de latência de resposta está fortemente relacionado à perda da inervação sensitiva intra-epidermal característico do modelo experimental de neuropatia periférica induzida por paclitaxel. A análise do decurso temporal do tempo de latência ao calor mostra que os camundongos com deleção total de GPR91 diferem de maneira estatisticamente significante do grupo tratado com paclitaxel entre os dias experimentais 5 a 16, havendo uma nítida diferença no período compreendido entre os dias 13 e 16 após a primeira injeção de paclitaxel (Figura 3e).

Por fim, observamos também que a injeção intra-dérmica de succinato no dorso da pata de camundongos C57Bl/6 *wildtype* evocou respostas nociceptivas de retirada de pata frente à estimulação com filamentos Von Frey. Essa sensibilização provocada pelo succinato foi prevenida em animais com deleção total de GPR91 (Figura 3f).



Figura 3. Perfil de respostas nociceptivas de camundongos C57Bl/6 wildtype e com deleção total do receptor de succinato durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. (a) limiar mecânico de retirada de pata (log limiar mg), (b) tempo de duração de respostas nociceptivas, (c) frequência de retirada de pata a estímulos com filamento Von Frey 0,02g, (d) frequência de retirada de pata a estímulos com filamento Von Frey 0,16g, (e) tempo de latência ao calor (32°C), (f) limiar mecânico de retirada de pata após injeção de succinato. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, *p<0,05 em relação ao grupo WT + veículo, #p<0,05 GPR91^{-/-} + paclitaxel versus WT + paclitaxel (n=8) e teste t de Student, *p<0,05 em relação ao grupo WT + succinato (n=6).

O receptor de succinato é expresso por neurônios aferentes primários e secundários de pequeno e grande diâmetros

Considerando o conjunto de resultados anteriores, analisamos a localização do receptor de succinato dentro do sistema nociceptivo. Para tanto, camundongos C57Bl/6 em condições basais foram utilizados em uma série experimental para determinação da localização celular do GPR91 por meio de imunofluorescência em microscopia confocal.

A análise das imagens adquiridas a partir de amostras de gânglios da raiz dorsal da medula espinal revelou que o receptor de succinato é expresso em uma grande variedade de corpos celulares neuronais do gânglio da raiz dorsal (L4) em condição basal de camundongos C57Bl/6. O receptor de succinato parece ser expresso principalmente por neurônios de grande diâmetro considerando-se a co-expressão abundante entre GPR91 e NF200 assim como em neurônios de menor diâmetro, duplamarcação positiva entre GPR91 e neurônios positivos para CGRP e TRPV1, mas não em fibras tipo C não-peptidérgicas, IB4 positivas (Figura 4).

Corroborando os achados anteriores, imagens obtidas de amostras do corno dorsal da medula espinal mostram marcação positiva de GPR91 nos terminais aferentes centrais do neurônio aferente primário nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal de camundongos C57BI/6 em condição basal. Observa-se que o GPR91 colocaliza-se com terminais TRPV1 e CGRP positivos, mas não em fibras IB4 positivas (Figura 5).

Em suma, as informações obtidas sugerem que no sistema nociceptivo o receptor de succinato seja expresso por neurônios de pequeno e grande diâmetro no gânglio da raiz dorsal da medula espinal, sugerindo que a via de sinalização succinato e seu receptor nesse tipo celular exerça um papel na dor neuropática induzida por paclitaxel.



Figura 4. Localização do GPR91 em subtipos neuronais do gânglio da raiz dorsal da medula espinal. Imagens representativas de imunofluorescência em microscopia confocal mostrando que o receptor de succinato é expresso em uma grande variedade de corpos celulares neuronais do gânglio da raiz dorsal (L4) em condição basal de camundongos C57BI/6. Técnica de dupla marcação seguida de estudo da co-expressão mostrou que neurônios GPR91 positivos co-expressam CGRP, TRPV1 e NF200, mas não em neurônios IB4 positivos. Escalas: 100µm e 50 µm.



Figura 5. Expressão de GPR91 no corno dorsal da medula espinal. Imagens representativas de imunofluorescência em microscopia confocal mostrando marcação positiva de GPR91 nos terminais aferentes centrais do neurônio aferente primário nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal em condição basal de camundongos C57BI/6. Técnica de dupla marcação mostra que GPR91 está co-localizado com terminais TRPV1 e CGRP positivos, mas não em terminais IB4 positivas. Escala: 100µm.

A expressão gênica do receptor de succinato está elevada durante a dor neuropática induzida por paclitaxel

Uma vez que se determinou o perfil de respostas comportamentais na ausência e presença do receptor de succinato durante o decurso temporal da dor neuropática induzida por paclitaxel e que a localização do GPR91 dentro do sistema nociceptivo foi averiguada, determinou-se o perfil de expressão gênica relativa desse receptor no sistema.

Para tanto, camundongos C57Bl/6 receberam quatro doses alternadas de paclitaxel (8 mg/kg; i.p) nos dias experimentais 0, 2, 4 e 8. Após 3, 7, 10 e 14 dias após a primeira injeção de paclitaxel, esses animais foram eutanasiados, seguindo-se a excisão do nervo ciático, gânglios da raiz dorsal (L4-L6) e corno dorsal da medula espinal correspondente à região delimitada entre a região L4 – L6 da medula espinal para análise da expressão gênica relativa do GPR91.

Os resultados obtidos mostram um aumento significativo na expressão gênica de GPR91 em relação ao endógeno gapdh apenas nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal, mas não no nervo ciático e nem no corno dorsal da medula espinal (Figura 6b). O que pode sugerir um possível efeito restrito ao neurônio aferente primário durante a neuropatia induzida por paclitaxel, que poderia ser em virtude do paclitaxel apresentar baixa capacidade de permear membranas biológicas como a barreira hematoencefálica. Isso restringiria seus efeitos ao neurônio de primeira ordem, que está exposto a esse fármaco e, portanto, susceptível aos seus efeitos de maneira bem mais pronunciada que o neurônio de segunda ordem no corno dorsal da medula espinal, que está confinado pela barreira hematoencefálica (Gornstein e Schwarz, 2014).



Figura 6. Expressão relativa do receptor de succinato no sistema nociceptivo durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. **(a)** Nervo ciático, **(b)** gânglio da raiz dorsal da medula espinal, **(c)** corno dorsal da medula espinal. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, *p<0,05 em relação ao grupo veículo (n=6).

O ciclo dos ácidos tricarboxílicos parece estar alterado nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática induzida por paclitaxel

Considerando-se a forte sugestão que o tratamento quimioterápico com paclitaxel possa perturbar o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, propôs-se avaliar o decurso temporal da expressão gênica relativa das enzimas dessa via metabólica no nervo ciático e nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal por serem locais do sistema nociceptivo diretamente expostos ao quimioterápico e, portanto, mais propensos a disfunções metabólicas.

Os resultados obtidos mostram um aumento significativo na expressão gênica de todas as enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos aos 14 dias após a primeira injeção de paclitaxel (8 mg/kg; i.p.) em comparação ao grupo veículo (Figura 7). Tais alterações estiveram restritas apenas aos gânglios da raiz dorsal da medula espinal, mas não nos nervos ciáticos (Figura 8).

Dessa forma, os resultados obtidos sugerem a ocorrência de um prejuízo bioenergético nas células que compõem esse sítio anatômico, o que poderia sugerir um déficit funcional ao nível do gânglio da raiz dorsal, contribuindo para o desenvolvimento da dor neuropática periférica induzida por paclitaxel.

Aconitase - 2

7d 10d 14d

•

7d 10d 14d

<u>14</u>d

Paclitaxel (8mg/kg)

Dias

7 d 10 d

Dias

Paclitaxel (8mg/kg)

7d 10d 14d

•

10d 14d

Paclitaxel (8mg/kg)

Dias

7d

: •

Paclitaxel (8mg/kg)

Dias



Dias

Paclitaxel (8mg/kg) Dias

Figura 7. Expressão relativa das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. (a) citrato sintase, (b) isocitrato desidrogenase-2, (c) aconitase-2, (d) oxoglutarato desidrogenase, (e) succinil-CoA sintetase, (f) succinato desidrogenase – subunidade a, (g) succinato desidrogenase – subunidade b, (h) succinato desidrogenase – subunidade c, (i) fumarato hidratase, (j) malato desidrogenase – 2. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, *p<0,05 em relação ao grupo veículo (n=6).



Figura 8. Expressão relativa das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos nos nervos ciáticos durante a dor neuropática periférica induzida por paclitaxel. (a) citrato sintase, (b) isocitrato desidrogenase-2, (c) aconitase-2, (d) oxoglutarato desidrogenase, (e) succinil-CoA sintetase, (f) succinato desidrogenase – subunidade a, (g) succinato desidrogenase – subunidade b, (h) succinato desidrogenase – subunidade c, (i) fumarato hidratase, (j) malato desidrogenase – 2. One-way ANOVA seguido de pósteste de Bonferroni, *p<0,05 em relação ao grupo veículo (n=6).

5. DISCUSSÃO

A dor neuropática periférica induzida por paclitaxel é um efeito adverso doselimitante responsável pela descontinuação do tratamento oncológico e a consequente recorrência do câncer (Burstein et al., 2017). A parcela de indivíduos sob tratamento com o paclitaxel que desenvolve dor neuropática varia entre 30 a 60%, podendo atingir quase a totalidade desses indivíduos (Gornstein; Schwarz, 2014). Nesse sentido, elucidar a fisiopatologia dessa condição é necessária para o estabelecimento de alvos preventivos ou terapêuticos eficazes.

Os mecanismos moleculares relacionados aos efeitos do paclitaxel sobre o sistema nervoso periférico vão desde ativação de respostas neuroinflamatórias mediadas pela ativação de células gliais e do sistema imune até respostas estritamente neuronais tais como degeneração axonal, prejuízo à dinâmica dos microtúbulos e alterações na homeostase mitocondrial tais como prejuízos funcionais à cadeia de transporte de elétrons. (Zheng; Xiao; Bennett, 2011a; Duggett et al., 2016; Duggett; Griffiths; Flatters, 2017; Starobova; Vetter, 2017b).

Em consonância com tais evidências, observou-se que vias biológicas relacionadas ao metabolismo foram diferencialmente expressas em neurônios Nav1.8 positivos do gânglio da raiz dorsal, sendo o ciclo dos ácidos tricarboxílicos a via biológica que apresentou um proeminente perfil de expressão diferencial após análise por bioinformática dos transcritos consultados.

Adicionalmente, o decurso temporal dos níveis de succinato no gânglio da raiz dorsal mensurados por H-NMR tendeu a um aumento relativo. Apesar de não se observar diferença estatística entre grupos, é importante considerar limitações experimentais da técnica utilizada, da possível interferência de outros tipos celulares nessa quantificação e da quantidade de amostra de tecido em uso para extração metabólica. Dessa forma, os níveis mensurados de succinato podem estar subestimados nessa análise semi-quantitativa.

Como parte do ciclo dos ácidos tricarboxílicos na matriz mitocondrial, o succinato é formado pela succinil-CoA sintetase e subsequentemente oxidado a fumarato pela succinato desidrogenase. Como possivelmente esperado para um componente do ciclo do ácido cítrico, este metabólito está normalmente presente na mitocôndria. Contudo, o succinato pode ser liberado para o espaço extracelular devido a distúrbios metabólicos locais (Krebs, 1970; Ariza; Deen; Robben, 2012) tais como a neuropatia induzida por paclitaxel.

Em outros contextos, a concentração plasmática de succinato mensurada por LC/MS em roedores varia de 6 a 20µM enquanto em humanos os níveis desse metabólito foram detectados na ordem de 2-3µM (Sadagopan et al., 2007) e 2-20µM (Kushnir et al., 2001). Já foi demonstrado que os valores de dose eficaz mediana do receptor de succinato humano e murino foram 56±8 e 28±5 µM, respectivamente (He et al., 2004). Considerando que os valores basais de succinato são duas vezes menores do que o necessário para metade da resposta máxima ser atingida, apenas um pequeno aumento na concentração desse ligante seria capaz de ativar GPR91. Dessa forma, talvez fosse válido considerar a determinação plasmática de succinato no modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel uma vez que o efeito sistêmico deste fármaco poderia promover um aumento dos níveis plasmáticos de succinato que por sua vez contribuiriam para o desenvolvimento da dor neuropática.

Adicionalmente, a abordagem comportamental em um contexto de presença e ausência do receptor de succinato sugere fortemente o papel do eixo de sinalização succinato/GPR91 no desenvolvimento da dor neuropática induzida por paclitaxel. O conjunto de dados demonstra que a ausência do receptor de succinato atenuou o perfil de respostas nociceptivas em animais submetidos a este modelo experimental de dor. Ademais, a injeção intra-dérmica de succinato em animais com deleção total do receptor e em sua contraparte *wildtype* demonstrou a capacidade desse metabólito de sensibilizar nociceptores e, assim, evocar respostas nociceptivas apenas em animais *wildtype*.

Tal perfil de proteção ou atenuação de processos patológicos é observado em modelos experimentais de injúria renal por reperfusão (Ariza; Deen; Robben, 2012), diabetes melito (Toma et al., 2008), doença metabólica (Sadagopan et al., 2007), artrite reumatoide (Saraiva et al., 2018), alergias (Rubić-Schneider et al., 2017), obesidade (Van Diepen et al., 2017) e respostas imunológicas mediadas por macrófagos (Tannahill et al., 2013; Mills et al., 2016; Peruzzotti-Jametti et al., 2018). Essa observação denota o elevado potencial farmacológico do bloqueio que o receptor de succinato possui, uma vez que os efeitos mediados via ativação de GPR91 contribui sobremaneira para a fisiopatologia de diversos contextos patológicos.

Em relação à distribuição do receptor de succinato no sistema nociceptivo, observamos no gânglio L4 da raiz dorsal que neurônios NF200 positivos, fibras de grande diâmetro, neurônios TRPV1 e CGRP positivos, fibras tipo C peptidérgicas, mas não neurônios IB4 positivos, fibras tipo C não-peptidérgicas, expressam GPR91 em condições basais assim como observamos também o mesmo padrão de co-expressão nos terminais centrais do neurônio aferente primário no corno dorsal da medula espinal.

A presença de GPR91 em neurônios periféricos aqui apontada é confirmada também em um estudo de análise do perfil transcripcional do sistema nervoso central e periférico (Zeisel et al., 2018) e seu perfil de co-expressão com fibras de grande diâmetro e fibras tipo C peptidérgicas apontam para possíveis aspectos mecanísticos dessa via de sinalização dentro do sistema nociceptivo. Assim, conhecendo-se as características neurofisiológicas das fibras nociceptivas do tipo Aδ, Aβ e C, do perfil de co-localização do GPR91 no gânglio da raiz dorsal e do padrão de respostas comportamentais a estímulos mecânicos inócuos e nocivos bem como aos estímulos térmicos podemos de maneira indireta sugerir um papel desse receptor em fibras de

grande diâmetro e, em uma menor extensão, possivelmente em fibras sensitivas de diâmetro menor. Porém, a confirmação dessa suposição requer abordagens eletrofisiológicas e estudos de ganho e perda de função tais como uso de animais geneticamente modificados com deleção condicional de fibras sensitivas específicas ou mesmo por ferramentas quimiogenéticas (DREADDs) ou por optogenética a fim de se avaliar o efeito da ativação específica desse receptor em contextos mais controlados para que corroboremos essa hipótese.

Avaliamos ainda o efeito do tratamento com paclitaxel sobre a expressão gênica relativa do receptor de succinato dentro do sistema nociceptivo ao longo do tempo. Observou-se que a expressão gênica desse receptor se modificou de maneira tecido-específica. Foi apenas nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal onde se pode observar alterações significativas na expressão desse receptor, ao passo que a expressão de GPR91 nos nervos ciáticos e corno dorsal da medula espinal manteve-se inalterada. Tais dados podem ser sugestivos de uma resposta adaptativa da população celular local em resposta ao tratamento com paclitaxel e especulamos que tal aumento reflita uma resposta aos níveis crescentes do seu ligante no decurso temporal da dor neuropática induzida por paclitaxel.

Por fim, averiguamos o perfil de expressão gênica do conjunto de enzimas que compõem o ciclo do ácido cítrico tanto nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal como nos nervos ciáticos. Novamente, as alterações moleculares observadas restringiram-se ao gânglio da raiz dorsal apenas. Nesse sítio anatômico observamos aumento da expressão gênica relativa de quase todo o conjunto das enzimas dessa via biológica, exceto por citrato sintase e as subunidades a e c da enzima succinato desidrogenase. Os dados de expressão gênica relativa não são capazes de explicar os mecanismos atrelados às alterações em curso uma vez que a resposta de expressão gênica poderia refletir mais uma possível resposta contrarreguladora a um desbalanço

metabólico local do que propriamente explicar a fonte do possível succinato em excesso no microambiente do gânglio da raiz dorsal.

Dessa maneira, averiguar aspectos funcionais da enzima succinato desidrogenase irá responder se de fato o succinato poderia se acumular devido a sua inibição ou ao prejuízo mitocondrial conforme descrito em outros estudos (Flatters; Bennett, 2006; Zheng; Xiao; Bennett, 2011b; Xiao; Bennett, 2012; Duggett et al., 2016; Duggett; Griffiths; Flatters, 2017). Por outro lado, o aumento da expressão gênica da succinato desidrogenase poderia também ser uma resposta compensatória ao acúmulo de metabólitos localmente conforme defendido por outros estudos (Lukyanova; Kirova, 2015; Lukyanova; Kirova; Germanova, 2016).

Considerando que a dor neuropática é um dos principais fatores responsáveis pela descontinuação do tratamento oncológico com paclitaxel, impactando diretamente na taxa de sobrevida e recorrência de neoplasias, a busca por alvos moleculares responsáveis por este efeito adverso debilitante adicionaria novas perspectivas terapêuticas para o tratamento dessa condição. Assim, os achados desse estudo demonstram que a via de sinalização succinato/GPR91 pode ser contribuitória para o desenvolvimento dessa condição patológica.

Embora a resposta biológica gerada pelo acoplamento do succinato ao seu receptor ainda necessita de mecanismos explicativos nesse modelo experimental, a hipótese mais plausível seja de que este metabólito sensibilize o neurônio aferente primário que amplifica então sinais nociceptivos. Considerando-se que não existe descrição do papel desse eixo de sinalização na dor neuropática, nosso estudo lança de maneira inédita um novo conceito no campo da analgesia, em que um metabólito cuja função era compreendida como estritamente energética, passa agora a ter um papel crucial de sinalização na dor neuropática induzida por paclitaxel.

6. CONCLUSÃO

A via succinato/GPR91 contribui para o desenvolvimento da dor neuropática induzida por paclitaxel em virtude de um provável desbalanço metabólico que favorece o acúmulo de succinato no gânglio da raiz dorsal da medula espinal que por sua vez poderia exercer seus efeitos no neurônio sensitivo primário.

REFERENCIAS

ABBADIE, C. et al. Chemokines and pain mechanisms. Brain Research Reviews, 2009.

AGUIAR, C. J. et al. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. **Cell Communication and Signaling**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2014.

ALESSANDRI-HABER, N. et al. Interaction of Transient Receptor Potential Vanilloid 4, Integrin, and Src Tyrosine Kinase in Mechanical Hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**, 2008.

ARETI, A. et al. Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 289–295, 2014.

ARIZA, A. C.; DEEN, P. M. T.; ROBBEN, J. H. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. FEB, p. 1–8, 2012.

BANGA, I.; SZENT-GYÖRGRYI, I. Über die Bedeutung der Fumarsäure fär die tierische Gewebsatmung Mitteilung. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, 1936.

BARON, R. Mechanisms of disease: Neuropathic pain - A clinical perspective. Nature Clinical Practice Neurology, 2006.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.

BENNETT, G. J. Pathophysiology and Animal Models of Cancer-Related Painful Peripheral Neuropathy. **The Oncologist**, 2010.

BENNETT, G. J.; DOYLE, T.; SALVEMINI, D. Mitotoxicity in distal symmetrical sensory peripheral neuropathies. Nature Reviews Neurology, 2014.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, 2017.

BLAGOSKLONNY, M. V. et al. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. **Cancer Research**, 1996.

BOADAS-VAELLO, P. et al. Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: Reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. Spinal Cord, 2016.

BOREA, P. A. et al. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiological Reviews**, 2018.

BURSTEIN, H. J. et al. Clinical cancer advances 2017: Annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. Journal of Clinical Oncology, 2017.

BYAR, K. L. et al. Impact of Adjuvant Breast Cancer Chemotherapy on Fatigue, Other Symptoms, and Quality of Life. **Oncology Nursing Forum**, 2006.

C., D.; M.A., J. Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010.

CANTA, A.; POZZI, E.; CAROZZI, V. Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). **Toxics**, v. 3, n. 2, p. 198–223, 2015.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, v. 596, p. 90–107, 2015.

CARRASCO, C. et al. Neuropathic pain: Delving into the oxidative origin and the possible implication of transient receptor potential channels. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–15, 2018.

CATA, J. P. et al. Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Minerva Anestesiologica**, 2006.

CAVALETTI, G.; MARMIROLI, P. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. Current Opinion in Neurology, 2015.

CHAPMAN, C. R.; VIERCK, C. J. The Transition of Acute Postoperative Pain to Chronic Pain: An Integrative Overview of Research on Mechanisms. **Journal of Pain**, 2017.

CHAUDHRY, V. et al. Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: Clinical and electrophysiological studies. **Annals of Neurology**, 1994.

CHEN, G. et al. Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. Neuron, 2018.

CHOUCHANI, E. T. et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. **Nature**, 2014.

CLAYTON, D. Replication And Transcription Of Vertebrate Mitochondrial Dna. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2002.

COBOS, E. J. et al. Mechanistic Differences in Neuropathic Pain Modalities Revealed by Correlating Behavior with Global Expression Profiling. **Cell Reports**, v. 22, n. 5, p. 1301–1312, 2018.

COHEN, M. J.; JANGRO, W. C.; NEFF, D. Pathophysiology of Pain. In: **Challenging Neuropathic Pain Syndromes: Evaluation and Evidence-Based Treatment**. [s.l: s.n.]

COOK, A. D. et al. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 3, p. 240–255, 2018.

CUNHA, T. M. et al. Neuroimmune–Glia Interactions in the Sensory Ganglia Account for the Development of Acute Herpetic Neuralgia. **The Journal of Neuroscience**, 2017.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. British Journal

of Anaesthesia, 2008.

DE CASTRO FONSECA, M. et al. GPR91: Expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. **Cell Communication and Signaling**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2016.

DE IULIIS, F. et al. Taxane induced neuropathy in patients affected by breast cancer: Literature review. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2015.

DEMBO, T. et al. Primary Afferent-Derived BDNF Contributes Minimally to the Processing of Pain and Itch. **Eneuro**, v. 5, n. 6, p. ENEURO.0402-18.2018, 2018.

DICKIE, A. C. et al. Morphological and functional properties distinguish the substance P and gastrin-releasing peptide subsets of excitatory interneuron in the spinal cord dorsal horn. **Pain**, 2019.

DIEHL, J. et al. Expression and localization of GPR91 and GPR99 in murine organs. **Cell and Tissue Research**, v. 364, n. 2, p. 245–262, 2016.

DIZON, D. S. et al. Clinical cancer advances 2016: Annual report on progress against cancer from the American society of clinical oncology. In: Journal of Clinical Oncology, **Anais**...2016.

DOUGHERTY, P. M. et al. Nociceptor Translational Profiling Reveals the Ragulator-Rag GTPase Complex as a Critical Generator of Neuropathic Pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 3, p. 393–411, 2018.

DUGGETT, N. A. et al. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. **Neuroscience**, v. 333, p. 13–26, 2016.

DUGGETT, N. A.; GRIFFITHS, L. A.; FLATTERS, S. J. L. Paclitaxel-induced painful neuropathy is associated with changes in mitochondrial bioenergetics, glycolysis, and an energy deficit in dorsal root ganglia neurons. **Pain**, v. 158, n. 8, p. 1499–1508, 2017.

ENIU, A. Weekly Administration of Docetaxel and Paclitaxel in Metastatic or Advanced Breast Cancer. **The Oncologist**, 2005.

FEDOTCHEVA, N. I.; SOKOLOV, A. P.; KONDRASHOVA, M. N. Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 2006.

FELDMAN, E. L. et al. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. **Neuron**, v. 93, n. 6, p. 1296–1313, 2017.

FERRI, K. F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nat Cell Biol**, 2001.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxelinduced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**, 2006.

GANAPATHY, V. et al. Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. **Biochemical Journal**, 2004.

GILISSEN, J. et al. Forskolin-free cAMP assay for Gi-coupled receptors. **Biochemical Pharmacology**, 2015.

GNANA-PRAKASAM, J. P. et al. Expression and iron-dependent regulation of succinate receptor GPR91 in retinal pigment epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 2011.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, R. et al. TRP channels and pain. In: **Neurobiology of TRP Channels**. [s.l: s.n.]

GORNSTEIN, E.; SCHWARZ, T. L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART A, p. 175–183, 2014.

GRIFFITHS, L. A.; FLATTERS, S. J. L. Pharmacological Modulation of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy. **Journal** of Pain, v. 16, n. 10, p. 981–994, 2015.
GUTIERREZ-MECINAS, M. et al. Expression of Calretinin Among Different Neurochemical Classes of Interneuron in the Superficial Dorsal Horn of the Mouse Spinal Cord. **Neuroscience**, 2019.

HAKAK, Y. et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 5, p. 837–843, 2009.

HALDAR, S.; CHINTAPALLI, J.; CROCE, C. M. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. **Cancer Research**, 1996.

HAN, Y.; SMITH, M. T. Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). Frontiers in Pharmacology, v. 4 DEC, n. December, p. 1–16, 2013.

HE, W. et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. **Nature**, 2004.

HEBERT, S. C. Orphan detectors of metabolism. Nature, 2004.

HELFAND, S. L. et al. Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene Indy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002.

HERBST, R. S. et al. Clinical Cancer Advances 2005: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening - A report from the American Society of Clinical Oncology. In: Journal of Clinical Oncology, **Anais**...2006.

HÖGBERG, C. et al. Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase-β signaling. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2011.

HU, J. et al. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. **Experimental Eye Research**, 2013.

HUANG, Y. et al. Endogenous TRPA 1 and TRPV 1 activity potentiates glutamatergic

input to spinal lamina I neurons in inflammatory pain . Journal of Neurochemistry, 2019.

IASP TASK FORCE. Classification of Chronic Pain, Second Edition (Revised). **IASP Press**, 2012.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 138–152, 2018.

JAGGI, A. S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. Toxicology, 2012.

JANES, K. et al. The development and maintenance of paclitaxel-induced neuropathic pain require activation of the sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016.

JOSEPH, E. K.; LEVINE, J. D. Mitochondrial electron transport in models of neuropathic and inflammatory pain. **Pain**, v. 121, n. 1–2, p. 105–114, 2006.

JUAREZ-SALINAS, D. L. et al. Pain relief by supraspinal gabapentin requires descending noradrenergic inhibitory controls. **PAIN Reports**, 2018.

KAUTIO, A. L. et al. Amitriptyline in the Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Symptoms. Journal of Pain and Symptom Management, 2008.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. Nature **Reviews Cancer**, 2010.

KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, n. 1–2, p. 116–124, 2004.

KLOOSTER, J.; STUDHOLME, K. M.; YAZULLA, S. Three-dimensional reconstruction of scleral cold thermoreceptors of the cat eye. **Journal of Comparative Neurology**, 2001.

KREBS, H. A. Rate control of the tricarboxylic acid cycle. Advances in Enzyme Regulation, v. 8, n. C, p. 335–353, 1970.

KREBS, H. A.; JOHNSON, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. **FEBS Letters**, 1980.

KRIS, M. G. et al. Clinical cancer advances 2010: Annual report on progress against cancer from the american society of clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**, 2010.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. Nature Medicine, 2010.

KUSHNIR, M. M. et al. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. **Clinical Chemistry**, 2001.

LAPOINTE, N. E. et al. Effects of eribulin, vincristine, paclitaxel and ixabepilone on fast axonal transport and kinesin-1 driven microtubule gliding: Implications for chemotherapyinduced peripheral neuropathy. **NeuroToxicology**, 2013.

LEES, J. G. et al. Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **European Journal of Cancer**, v. 73, p. 22–29, 2017.

LI, Y. et al. Toll-like receptor 4 signaling contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Journal of Pain**, v. 15, n. 7, p. 712–725, 2014.

LI, Z. et al. Targeting human Mas-related G protein-coupled receptor X1 to inhibit persistent pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2017.

LOPRINZI, C. L. et al. Natural history of paclitaxel-associated acute pain syndrome: Prospective cohort study NCCTG N08C1. Journal of Clinical Oncology, 2011. LUKYANOVA, L. D.; KIROVA, Y. I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. OCT, 2015.

LUKYANOVA, L. D.; KIROVA, Y. I.; GERMANOVA, E. L. Specific Features of Immediate Expression of Succinate-Dependent Receptor GPR91 in Tissues during Hypoxia. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 160, n. 6, p. 742–747, 2016.

MAATUF, Y.; GERON, M.; PRIEL, A. The Role of Toxins in the Pursuit for Novel Analgesics. [s.l: s.n.]v. 11

MAKKER, P. G. S. et al. Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–24, 2017.

MALATJI, B. G. et al. A diagnostic biomarker profile for fibromyalgia syndrome based on an NMR metabolomics study of selected patients and controls. **BMC Neurology**, 2017.

MANFREDI, J. J.; PARNESS, J.; HORWITZ, S. B. Taxoi binds to cellular microtubules. Journal of Cell Biology, 1982.

MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. Pain Mechanisms and Management: A Central Perspective. **The Clinical Journal of Pain**, 2012.

MASTERS, G. A. et al. Clinical cancer advances 2015: Annual report on progress against cancer from the American society of clinical oncology. In: Journal of Clinical Oncology, **Anais**...2015.

MEYER, R. A. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. [s.l: s.n.]

MILLS, E. L. et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 457–470.e13, 2016.

MILLS, E. L. et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via

alkylation of KEAP1. Nature, v. 556, n. 7699, p. 113–117, 2018a.

MILLS, E. L. et al. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. **Nature**, v. 560, n. 7716, p. 102–106, 2018b.

MILLS, E.; O'NEILL, L. A. J. Succinate: A metabolic signal in inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 5, p. 313–320, 2014.

MIN, M. Y. et al. Physiological and morphological properties of, and effect of substance P on, neurons in the A7 catecholamine cell group in rats. **Neuroscience**, 2008.

MURPHY, M. P.; O'NEILL, L. A. J. Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers. **Cell**, v. 174, n. 4, p. 780–784, 2018.

NISHIDA, M. et al. **TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets**. [s.l: s.n.]

O'BRIEN, A. T. et al. Motor Cortex Neurostimulation Technologies for Chronic Poststroke Pain: Implications of Tissue Damage on Stimulation Currents. **Frontiers in Human Neuroscience**, 2016.

O'NEILL, L. A. J. Succinate strikes. Nature, 2014.

OLAUSSON, H. et al. Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: Sympathetic response and perceptual localization. **Experimental Brain Research**, 2008.

PARK, H. J. Chemotherapy induced peripheral neuropathic pain. Korean Journal of Anesthesiology, 2014.

PASCUAL, D. et al. Antinociceptive effect of three common analgesic drugs on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2010.

PATEL, J. D. et al. Clinical cancer advances 2013: Annual report on progress

against cancer from the American Society of Clinical Oncology. Journal of Clinical Oncology, 2014.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. Nature Reviews Neuroscience, 2007.

PERUZZOTTI-JAMETTI, L. et al. Macrophage-Derived Extracellular Succinate Licenses Neural Stem Cells to Suppress Chronic Neuroinflammation. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 3, p. 355–368.e13, 2018.

PETERS, C. M. et al. An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. **Brain Research**, v. 1168, n. 1, p. 46–59, 2007a.

PETERS, C. M. et al. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. **Experimental Neurology**, 2007b.

PETO, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decadeNature, 2001.

PETRELLI, N. J. et al. Clinical cancer advances 2009: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening -A report from the American Society of Clinical Oncology. In: Journal of Clinical Oncology, **Anais**...2009.

PINTO, L. G. et al. Non-Peptidergic Nociceptive Neurons Are Essential for Mechanical Inflammatory Hypersensitivity in Mice. **Molecular Neurobiology**, 2019.

PRIESTLEY, T. Voltage-Gated Sodium Channels and Pain. Current Drug Target -CNS
& Neurological Disorders, v. 3, n. 6, p. 441–456, 2017.

RAO, R. D. et al. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial (N00C3). **Cancer**, 2007.

ROBBEN, J. H. et al. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. **Kidney International**, 2009.

ROTH, B. J. et al. Clinical cancer advances 2012: Annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. In: Journal of Clinical Oncology, **Anais**...2013.

ROWINSKY, E. K. et al. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). **Seminars in oncology**, 1993.

RUBIĆ-SCHNEIDER, T. et al. GPR91 deficiency exacerbates allergic contact dermatitis while reducing arthritic disease in mice. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 3, p. 444–452, 2017.

RUBIC, T. et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. **Nature Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1261–1269, 2008.

SADAGOPAN, N. et al. Circulating Succinate is Elevated in Rodent Models of Hypertension and Metabolic Disease. **American Journal of Hypertension**, v. 20, n. 11, p. 1209–1215, 2007.

SAPIEHA, P. et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 14, n. 10, p. 1067–1076, 2008.

SARAIVA, A. L. et al. Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of T $_{\rm h}$ 17 cells in the lymph nodes. **The FASEB Journal**, n. June, p. fj.201800285, 2018.

SCHAIBLE, H. G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 2007.

SERETNY, M. et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **Pain**, v. 155, n. 12, p. 2461–2470, 2014.

SHEMESH, O. A.; SPIRA, M. E. Paclitaxel induces axonal microtubules polar reconfiguration and impaired organelle transport: Implications for the pathogenesis of paclitaxel-induced polyneuropathy. **Acta Neuropathologica**, 2010.

SHIMOZUMA, K. et al. Taxane-induced peripheral neuropathy and health-related quality of life in postoperative breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy: N-SAS BC 02, a randomized clinical trial. In: Supportive Care in Cancer, **Anais**...2012.

SHISHKIN, V. et al. Role of mitochondria in intracellular calcium signaling primary and secondary sensory neurones of rats. **Cell Calcium**, 2002.

SIAU, C.; BENNETT, G. J. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. **Anesthesia and Analgesia**, 2006.

SIAU, C.; XIAO, W.; BENNETT, G. J. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: Loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. **Experimental Neurology**, 2006.

SISIGNANO, M. et al. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 12, p. 694–707, 2014. SOUSA-VALENTE, J.; BRAIN, S. D. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 3, p. 229–236, 2018.

ST. JOHN SMITH, E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. Journal of Neurology, 2018.

STAROBOVA, H.; VETTER, I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. May, p. 1–21, 2017.

SUNDSTRÖM, L. et al. Succinate receptor GPR91, a Gαicoupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLCβ. **FEBS Letters**, v. 587, n. 15, p. 2399–2404, 2013.

TAEGTMEYER, H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. **Circulation Research**, 1978.

TANEJA, A.; DELLA PASQUA, O.; DANHOF, M. Challenges in translational drug research in neuropathic and inflammatory pain: the prerequisites for a new paradigm. European Journal of Clinical Pharmacology, 2017.

TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 2013.

THUNBERG, T. Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels und der dabei wirksamen Enzyme. **Skandinavisches Archiv Für Physiologie**, 1920.

TIWARI, V. et al. Mas-related G protein-coupled receptors offer potential new targets for pain therapy. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. [s.l: s.n.]

TOBALDINI, G. et al. Pain Inhibits Pain: an Ascending-Descending Pain Modulation Pathway Linking Mesolimbic and Classical Descending Mechanisms. **Molecular Neurobiology**, 2018.

TOMA, I. et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and rennin release in murine and rabbit kidney. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 7, p. 2526–2534, 2008.

TOMINAGA, M. et al. Molecular mechanisms of nociception. Japanese Journal of Neuropsychopharmacology, 2003.

TOTSCH, S. K.; SORGE, R. E. Immune system involvement in specific pain conditions. Molecular Pain, 2017.

VAN DIEPEN, J. A. et al. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 7, p. 1304–1313, 2017.

VOGELZANG, N. J. et al. Clinical cancer advances 2011: Annual report on progress

against cancer from the American Society of Clinical Oncology. In: Journal of Clinical Oncology, **Anais**...2012.

WILLIAMS, A. C. D. C.; DAVIES, H. T. O.; CHADURY, Y. Simple pain rating scales hide complex idiosyncratic meanings. **Pain**, 2000.

WILLIAMS, A. C. de C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. PAIN, 2016.

WILSON, L. et al. Taxol Stabilization of Microtubules in Vitro: Dynamics of Tubulin Addition and Loss at Opposite Microtubule Ends. **Biochemistry**, 1985.

WINER, E. et al. Clinical cancer advances 2008: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening-a report from the american society of clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**, 2009.

WOOD, J. N. et al. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. Journal of Neurobiology, 2004.

WOOLF, C. J.; DECOSTERD, I. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, p. 149–158, 2000.

XIAO, W. H. et al. Mitochondrial abnormality in sensory, but not motor, axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy in the rat. **Neuroscience**, 2011a.

XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. Effects of mitochondrial poisons on the neuropathic pain produced by the chemotherapeutic agents, paclitaxel and oxaliplatin. **Pain**, v. 153, n. 3, p. 704–709, 2012.

XIAO, W. H.; ZHENG, H.; BENNETT, G. J. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. **Neuroscience**, 2012.

XIAO, W.; NASO, L.; BENNETT, G. J. Experimental studies of potential analgesics for the treatment of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. **Pain Medicine**, 2008. ZEISEL, A. et al. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. Cell, 2018.

ZELEZNIAK, A.; SHERIDAN, S.; PATIL, K. R. Contribution of Network Connectivity in Determining the Relationship between Gene Expression and Metabolite Concentration Changes. **PLoS Computational Biology**, 2014.

ZHANG, H. et al. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of paclitaxel-induced painful neuropathy. **Journal of Pain**, 2012.

ZHENG, H.; XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. **Experimental Neurology**, 2011.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. European Journal of Pharmacology, 2001.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

FMRP



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "Envolvimento do receptor de succinato GPR91 na gênese da dor neuropática induzida por paclitaxel", registrado com o número 225/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 11 de dezembro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 318 camundongos C57Bl/6 machos pesando 20g oriundos do Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e 210 camundongos GPR-91 KO machos pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 11/12/2017 a 30/12/2019.

We certify that the Protocol nº 225/2017, entitled "Involvement of the Succinate Receptor GPR91 in the Genesis of Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 12/11/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans) for research purposes, and includes the use of 318 male C57Bl/6 mice weighing 20g from the Animal House of Department of Pharmacology of Ribeirao Preto Medical School, and 210 male GPR-91 KO mice weighing 20g from the Breeding Center of Special Mice of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/30/2019.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315-3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 11 de dezembro de 2017

RNNON Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho Presidente da CEUA-FMRP - USP