FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Alexandre Gomes de Macedo Maganin

**PAPEL DA QUINURENINA 3-MONOOXIGENASE EXPRESSA EM ASTRÓCITOS
DA MEDULA ESPINAL NA MANUTENÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA**

RIBEIRÃO PRETO
2019

Alexandre Gomes de Macedo Maganin

**PAPEL DA QUINURENINA 3-MONOOXIGENASE EXPRESSA EM ASTRÓCITOS
DA MEDULA ESPINAL NA MANUTENÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. 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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Maganin, Alexandre Gomes de Macedo

Papel da quinurenina 3-monooxigenase expressa em astrócitos da medula espinal na manutenção da dor neuropática.

Ribeirão Preto, 2019.

75 p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Farmacologia- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Thiago Mattar Cunha

Palavras chaves: neuropatia, via das quinureninas, KMO, astrócitos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alexandre Gomes de Macedo Maganin

Papel da quinurenina 3-monooxigenase expressa em astrócitos da medula espinal na manutenção da dor neuropática.

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

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora:

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 – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

À minha mãe Cristina e ao meu pai Antonio que mesmo com a distância sempre estiveram me apoiando, compreendendo que nem sempre eu poderia estar por perto, mas mesmo assim fizeram de tudo para eu conseguir seguir meus sonhos, obrigado por todo carinho e amor que sempre me proporcionaram. Obrigado por me ensinarem a ser o melhor de mim, a ser correto e os valores da vida e da família.

Amo vocês.

Ao meu avô Luis Gomes de Macedo, em memória, que com sua alegria nos ensinou a ver sempre o lado bom em todos os momentos, nos ensinando o quão importante aproveitar a vida, mesmo que sem muitos bens, mas sempre com honestidade. Um avô sempre presente em nossas vidas nos apoiando e ensinando com todo carinho do mundo.

Obrigado vô.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proteger e me guiar. Por todas as oportunidades que Ele me concedeu, pela minha saúde e sempre me manter forte nas batalhas.

Aos meus pais, Antonio e Cristina, e meus irmãos, Luiz Felipe e Henrique por todo suporte, conselhos e encorajamento. Ao Zé e a Lulu e também a minha pequena aby, que no momento mais difícil me mostrou uma nova forma de enxergar as dificuldades e fazer sempre eu dar o meu melhor.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha pela oportunidade de estar em um grande centro de pesquisa, pela orientação, sendo importante na minha formação como pesquisador e pela oportunidade de executar esse trabalho.

Prof. Dr. Fernando Queiróz Cunha pelo apoio e pelo exemplo como profissional. Por ceder seu laboratório e permitir que eu desenvolvesse esse projeto

Prof. Dr. José Carlos Alves-Filho por ceder seu laboratório e permitir que eu desenvolvesse esse projeto.

À banca pela disponibilidade de estar aqui presente e somando às discussões desse trabalho.

À Miriam por me acolher quando cheguei ao laboratório, pelos ensinamentos e paciência comigo, mas principalmente pelo carinho e amizade comigo.

Aos amigos Alexandre Lopes e Rangel pelas orientações, ensinamentos, ajudas e pelas conversas no decorrer do meu mestrado e no meu amadurecimento científico

À Ayda pela amizade, pelas risadas, companheirismo e por todo suporte e apoio.

À Lili pela amizade sincera, pelas conversas e risadas.

Aos meus amigos de Piracicaba: Eduardo, Flavia, por sempre me apoiarem.

À Ieda Regina dos Santos pela ajuda técnica fundamental no desenvolvimento do projeto, além das conversas e risadas. Obrigado.

À Katia pelos incentivos, conselhos, pelo carinho que sempre teve comigo e ajudas durante toda essa jornada.

Ao técnico e amigo Sergio Rosa, pela ajuda e organização em todos os momentos.

À Diva Amábile de Souza pela convivência, amizade e pelo carinho com que sempre me tratou.

Grupo de Dor: Taty, Ricardo, Isaac, Atlante, Andreza, Nicole, Rafaela, Maria e Lucas que participaram de forma direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho, pelo convívio e pela oportunidade de estar sempre conversando e aprendendo cada dia mais.

Ao Guilherme Souza por me ajudar no desenvolvimento do trabalho.

Ao DOL pela oportunidade de discutir e aprender mais sobre dor.

Aos colegas e amigos do laboratório de inflamação e dor.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia, em especial ao coordenador Prof. Dr. Leonardo Restel.

Aos colegas da pós-graduação do Departamento de Farmacologia.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Gislaine e Ramon pela dedicação e competência.

Aos bioteristas Júlio, Dener, Eliana, Marquinhos e Orlando pelo cuidado com os animais do biotério, fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os funcionários da FMRP-USP pela competência e dedicação.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização desse projeto.

Por fim agradeço a todos que passaram por minha vida e contribuíram para me tornar uma pessoa melhor.

“A vida é limitada; contudo a honra e o respeito duram para sempre. “

Miyamoto Musashi.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

KMP – via metabólica da quinurenina;

Kyn – quinurenina;

SNC – sistema nervoso central;

KMO – quinurenina 3-monooxigenase;

3-Hk – 3-hidroxiquinurenina;

α – alfa;

δ – delta;

GFAP – glial fibrilar ácida;

IDO-1 – indoleamina 2,3-dioxigenase;

3-Haa – 3-hidroxiantranílico;

QA – ácido quinolinico;

HAAO – dioxigenase do ácido 3-hidroxiantranílico;

NMDA – N-metil D-Aspartato;

ONS – óxido nítrico sintase;

SNI – *spared nerve injury* (lesão do nervo poupado);

° – graus;

μg – micrograma;

μL – microlitro;

Anova – análise de variância;

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro;

C – Celsius;

cm – centímetro;

DNA – ácido desoxirribonucleico;

EPM – erro padrão da média;

g – grama;

h – hora

IASP – *International Association for Study of Pain* (Associação Internacional para o Estudo da dor);

LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*;

mL – mililitro;

mg – miligrama;

mm – milímetro;

ng – nanograma;

RPM – rotação por minuto;

RT – transcriptase reversa;

s – segundo;

TNF α – fator de necrose tumoral alfa;

IL-6 – interleucina 6

MCM – meio condicionado de micróglia;

IL-1 β – interleucina um beta

WT – *wide tipe* (tipo selvagem)

RESUMO

MAGANIN, A. G. M. PAPEL DA QUINURENINA 3-MONOOXIGENASE EXPRESSA EM ASTRÓCITOS DA MEDULA ESPINAL NA MANUTENÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA.

Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2019.

A dor neuropática é causada por lesão ou doenças associadas ao sistema nervoso somatossensorial. Já é sabido que a ativação de células gliais (microglia / astrócitos / oligodendrócitos) na medula espinhal parece desempenhar um papel determinante na indução/ manutenção da dor neuropática; descobriu-se que os astrócitos sofrem alterações no seu funcionamento, após danos nos nervos periféricos, e desempenham um papel na sensibilização das vias nociceptivas, atuando na manutenção da dor neuropática. Essas alterações podem estar relacionadas com a via metabólica da quinurenina (KMP), sistema catabólico ligado ao processo fisiopatológico. As quinureninas (Kyn) neuroativas são geradas pelo catabolismo oxidativo do aminoácido triptofano nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central (SNC). Distúrbios no metabolismo de Kyn foram relacionados em várias doenças humanas, como depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer e Huntington. Além disso, Kyn pode ser convertido em vários metabólitos através da quinurenina-3-monooxigenase (KMO), que possuem ação neurotóxica. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa identificou que, após a lesão do nervo periférico, há uma regulação positiva do KMP, levando a um aumento de Kyn no plasma, que parece estar envolvido na manutenção da dor neuropática. A KMO é a enzima “downstream” limitante da velocidade na via da quinurenina que metaboliza oxidativamente Kyn em 3-hidroxiquinurenina (3-Hk), porém os mecanismos pelos quais Kyn periférica medeia a dor neuropática ainda não foram esclarecidos. Dentro deste contexto nossa hipótese é que a manutenção da dor neuropática é dependente do aumento de KMO presente na medula espinhal, que oxida a Kyn periférica.

Palavras-chaves: neuropatia; via das quinureninas; astrócitos.

ABSTRACT

ABSTRACT

MAGANIN, A. G. M. **PAPER OF QUINURENINE 3-MONOXYGENASE EXPRESSED IN SPINAL CORD ASTROCYTES IN THE MAINTENANCE OF NEUROPATHIC PAIN.** Master's Dissertation - Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2019.

Neuropathic pain is part of the lesion or system related to the somatosensory nervous system. It is already known that the activation of glial cells (microglia / astrocytes / oligodendrocytes) in the spinal cord seems to play a decisive role in the induction / maintenance of neuropathic pain; it was discovered that the astrocytes suffered alterations in the functioning, after the injection in the peripheral nerves, and played a role in the sensitization of the nociceptive pathways, acting in the maintenance of neuropathic pain. These changes may be related to the metabolic kinurenine (KMP), a catabolic system linked to the pathophysiological process. Neuroactive kynurenins (Kyn) are generated by the oxidative catabolism of the amino acid tryptophan in the peripheral and central nervous system (CNS) systems. Non-metabolism disorders of Kyn have been reported in several human diseases such as depression, schizophrenia, Alzheimer's disease and Huntington's. In addition, Kyn can be converted into various metabolites through kinurenine-3-monooxygenase (KMO), which has neurotoxic action. Our previous study identified a positive KMP pressure following peripheral nerve injury, leading to increased plasma Kyn, which appears to be involved in the maintenance of neuropathic pain. KMO is a "downstream" enzyme, which can be used in the oxidative metabolism of 3-hydroxyquinurenine (3-Hk), that is, the peripheral Kyn of the neuropathic has not yet been clarified. In this context, we are maintaining the neuropathic is dependent on the growth of KMO present in the spinal cord, which oxidizes to peripheral Kyn.

Keywords: neuropathy; via of the quinureninas; astrocytes.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1. Dor.....	22
1.2. Dor neuropática.....	23
1.3. Células da glia.....	25
1.4. Astrócitos e dor neuropática.....	26
1.5. Via das quinureninas.....	29
 2. Objetivo.....	 32
 3. Materiais e Métodos.....	 34
3.1. Animais.....	35
3.1.1. Delineamento experimental.....	35
3.2. Indução da lesão do nervo periférico pelo modelo SNI.....	35
3.3. Avaliações dos limiares nociceptivos mecânicos.....	36
3.4. Administração de drogas.....	36
3.5. Imunofluorescência.....	37
3.6. Cultura primária de astrócitos.....	37
3.7. Western Blot.....	38
3.8. Extração de RNAm e RT-PCR.....	39
3.9. Citometria de fluxo.....	40
3.10. Preparo de soluções, drogas e reagentes.....	40
3.11. Reagentes.....	43
3.12. Análise estatística.....	43
 4. Resultados.....	 44
 5. Discussão.....	 60
 6. Conclusão.....	 66
 7. Referências bibliográficas.....	 68
 8. Anexos.....	 73

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dor constitui um mecanismo de proteção, detectando estímulos nocivos e estabelecendo limiares específicos para tais estímulos.

1.1. Dor

Descartes já descrevia a dor como resultado do desbalanço entre o sistema nervoso periférico e o cérebro (TEIXEIRA; OKADA, 2003). Contudo, a dor é considerada uma resposta ao reconhecimento de um estímulo nocivo capaz de ser modulado devido a eventos vividos anteriormente pelo indivíduo ou por ação de fatores externos. Sendo assim, a dor pode ser entendida como um estado físico que difere entre os indivíduos, já que depende da percepção e comportamento perante situações já vividas. Atualmente a dor é descrita como uma experiência emocional e sensorial desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial (IASP, 2012).

Fisiologicamente a dor tem função no controle da homeostase, pelo qual o corpo busca preservação e reparo tecidual, que sem controle podem se tornar patológico ou prejudicial. Essa detecção e transmissão dos estímulos nocivos ocorre através de receptores sensoriais especializados, conhecidos como nociceptores, mas o que faz da dor uma experiência de descrição complexa é que sempre há uma experiência emocional passada profunda, que leva ao aprendizado e atenção a determinadas situações (NOBACK et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999). Uma definição mais simples é de que a dor é uma “Percepção Desagradável de uma Sensação Nociceptiva”, definição essa que vem sendo trabalhada pelo nosso grupo de pesquisa, e que distingue dos conceitos importantes da dor, a nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”) ocorre através da codificação de estímulos capazes de lesionar os tecidos, codificação essa que ocorre pelos nociceptores, e a percepção que envolve

o emocional e experiências anteriores. Levando esse conceito em consideração podemos entender que nem todos os estímulos nocivos podem ser classificados como dor. O que faz que a dor seja uma experiência multidimensional, não somente uma resposta fisiológica do nosso organismo.

Além da classificação fisiológica da dor, como um alerta protetivo evocado por um estímulo nocivo, a dor ela também pode perder o seu papel fisiológico se tornando prolongada e apresentar características de patologia, sendo classificada como dor crônica. Sendo assim, a dor crônica pode ser compreendida como reações musculoesqueléticas e psicocomportamentais, induzindo incapacidade e repercussões socioeconômicas desfavoráveis (Claphan, 2003). Dentre os tipos de dor crônica, temos a dor neuropática

1.2. Dor Neuropática

A dor neuropática é caracterizada principalmente pelo sintoma de alodinia, isso é, um estímulo que antes não era doloroso passa a apresentar resposta dolorosa; além disso também acarreta sensação de queimação continua e dores espontâneas.

A dor neuropática é um dos sintomas da neuropatia, que está relacionada a lesão ou doenças associadas ao sistema nervoso somatossensorial, sendo um tipo de dor crônica (IASP, 2012) desencadeada por estímulos como diabetes, infecção (*Herpes zoster*), quimioterápicos, compressão ou lesão do nervo e doenças autoimunes (Campbell; Meyer, 2006). Na população a incidência fica entre 0,8 e 17,9% (Smith; Torrance, 2012), reduzindo a qualidade de vida do portador, prejudicando o humor, causando danos físicos e trazendo sérios problemas socioeconômicos (Jennifer; Lisa, 2000). Os tratamentos para neuropatia atualmente utilizados, tais como inibidores da degradação ou recaptção de serotonina e/ou

norepinefrina, moduladores do canal de cálcio $\alpha_2\delta$ ou lidocaína tópica, se limitam a apenas reduzir seus sintomas, geralmente através de alterações na atividade neural (Scholz; Woolf, 2007). No entanto, menos de 50% dos pacientes que utilizam essas terapias alcançam o alívio, sendo necessário, em vários casos, a combinação de medicamentos, o que ocasiona maior número de efeitos colaterais e, em alguns casos, sem remissão do quadro doloroso (O'Connor, Dworkin, 2009).

Para que haja o desenvolvimento da dor neuropática é necessário mais do que apenas as vias neurais, mas também a participação de células especializadas, as células da glia, tais como células de schwann, células satélites, micróglia, astrócitos e células do sistema imune (Scholz, Woolf, 2007; Kuner, Flor, 2016). Durante a indução e manutenção da dor neuropática, ocorre a liberação de neurotransmissores, mediadores lipídicos, fragmentos do sistema do complemento, fatores neurotróficos, citocinas e quimiocinas nos gânglios da raiz dorsal e/ou medula espinal. Estes componentes fazem parte da "comunicação multi-direcional entre neurônio-leucócito-glia", tanto no sistema nervoso central como no periférico, ocasionando a sensibilização periférica (sensibilização de nociceptores) e central (neuroplasticidade) (Silva et al, 2017). A elucidação das funções desempenhadas por cada uma destas células da glia, nas alterações fisiopatológicas após a lesão do nervo, é certamente necessária para identificar uma nova abordagem de tratamento (Scholz; Woolf, 2007). À vista desta nova abordagem, estudos pré-clínicos têm explorado várias vias de modulação imune e glial (Watkins, Maier, 2003; Tiwari, Guan, Raja, 2014).

1.3. Células da glia

O sistema nervoso é constituído principalmente por neurônios e pelas células da glia. Rudolf Virchow, Theodor Schwann e Robert Remak descreveram as células da glia no século XIX através da constatação de que essas células se diferenciavam de neurônios porque não participavam diretamente na transmissão sináptica. No entanto atualmente já se sabe que essas células estão envolvidas na transmissão sináptica, através de liberação de neurotransmissores, como glutamato, quimiocinas e citocinas além de promoverem neuroplasticidade (Lippincott, Williams e Wilkins, 2007; Ndubaku e Bellard, 2008; Chung et al., 2013).

Além de participarem da neurotransmissão as células da glia são responsáveis pela nutrição, manutenção e estímulo dos neurônios, como também sustentação de outras células e defesa (Sofroniew, Vinters, 2010). Essas células se encontram tanto no Sistema Nervoso Periférico, onde as principais são as células de Schwann (ficam ao redor das fibras nervosas) e as células satélites (células de suporte dos gânglios da raiz dorsal, como os trigeminais); E as do Sistema Nervoso Central, formadas principalmente pelos oligodendrócitos (dão suporte aos axônios), micróglia (células do sistema imune residentes do SNC) e os astrócitos (responsáveis principalmente pela homeostasia neuronal), sendo as células mais abundantes no SNC (Ref).

Mais recentemente foi demonstrado que as células da glia tem papel importante na indução e manutenção da dor crônica. Dentre elas, os astrócitos aparentam sofrer alterações em seu funcionamento durante a dor neuropática, passando a ter papel fundamental na sensibilização das vias nociceptivas (Mika et al., 2007; Sung et al., 2012; Zhang et al., 2013; Xu et al. 2016).

1.4. Astrócitos e dor neuropática

Os astrócitos são responsáveis por fornecer suporte aos neurônios, modular a formação e o funcionamento das sinapses, fornecer nutrientes e captar o glutamato (Sofroniew, Vinters, 2010; Liddelow, Barres, 2015). Além de sua função na homeostase dos neurônios do SNC, os astrócitos parecem sofrer alterações no seu funcionamento durante condições patológicas, como durante lesões no cérebro ou isquemia, neurodegeneração e dor neuropática (Gao, Li e Chopp, 2005; Xu et al., 2016; Zhang et al., 2013). Eles são ativados e respondem a essas alterações, modificando sua morfologia e expressão gênica, em um processo conhecido astrogliose (Pekny e Nilsson, 2005; Sofroniew, 2009).

A primeira descrição do que hoje é conhecido como astrogliose foi feita por Rudolf Virchow em 1855, quando foi descrita em autópsia uma lesão na coluna cercada por uma cicatriz espessa altamente fibrilar (Revisão Liddelow). Mas, somente em 1971, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) foi descrita, e o aumento dessas proteínas foi observado em pacientes com cicatrizes fibrilares (Eng et al., 1971). Então, GFAP passou a ser usado como um marcador para astrócitos reativos.

Embora já se saiba que os astrócitos não são totalmente homogêneos como se acreditava (Liddelow et al, 2017), a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) aparentemente é expressa constitutivamente em todos astrócitos presentes na medula espinal (Ji et al, 2006; Liddelow et al, 2017). Watkins e Maier (2003) mostram que a ativação de astrócitos leva a alterações morfológicas, hipertrofia, aumento da expressão de GFAP e produção de diversas substâncias, dentre elas algumas com a capacidade de alterar a excitabilidade neuronal. Em concordância, estudos mostram a ativação de astrócitos no corno dorsal da medula espinhal após a indução da neuropatia periférica (Watkins, Maier, 2003; Tanga, Raghavendra, DeLeo, 2004; Romero-Sandoval et al., 2008). A

hiperalgesia mecânica, manifestada no início da neuropatia, isso é de 1 a 7 dias, é correlacionada ao aumento da expressão de Iba-1 (marcador da ativação microglial), enquanto que o aumento expressão de GFAP é visto a partir do 4º ao 7º dia após a indução da neuropatia. Esses resultados sugerem que a micróglia esteja relacionada à indução, enquanto os astrócitos participem na manutenção da dor crônica (Tanga, Raghavendra, DeLeo, 2004; Ledeboer et al., 2005; Romero-Sandoval et al., 2008). De fato, a inibição da ativação microglial por minociclina alguns dias após a indução da neuropatia, não atenua a hiperalgesia e a alodinia pré-existentes (Raghavendra, Tanga, DeLeo, 2003), diferentemente do que ocorre quando fluoroacetate (inibidor da ativação de astrócitos) é administrado (Watkins e Maier, 2003; Tanga, Raghavendra, DeLeo, 2004; Romero-Sandoval et al., 2008).

Quando ativados, os astrócitos podem liberar gliotransmissores como glutamato, ATP, D-serina, citocinas, tais como Interleucina-6 (IL-6) e quimiocinas como CCL2 e CXCL-1, os quais são relacionados ao processo de hiperexcitabilidade nociceptiva na neuropatia (Ji et al, 2006; Tiwari, Guan, Raja, 2014). Contudo, a existência de uma relação causal entre glia e processamento da dor crônica ainda não foi demonstrada *in vivo*. A maioria dos estudos com astrócitos baseiam-se no efeito analgésico, através da inibição e morte deles, mediado por substâncias como fluoroacetate, o qual inibe a aconitase (enzima que participa do ciclo de Krebs) devido a sua maior sensibilidade a droga (Hassel et al., 1992; Meller et al., 1994; Goncharov, Jenkins, Radilov, 2006; Sung et al., 2012). Poucos estudos usaram técnicas experimentais específicas para interferir ou bloquear uma das funções essenciais dos astrócitos para demonstrar seu envolvimento em diferentes estados de dor (Chiang, Sessle, Dostrovsky, 2012). Recentemente, um estudo demonstrou o papel da estimulação seletiva de astrócitos na dor, utilizando adenovirus para induzir a

expressão do canal de cátions sensível à luz (canalrhodopsina 2; ChR2H134R) sob o controle do promotor de GFAP. A ativação deste canal por fotoestimulação causa sensibilização das vias nociceptivas, observada após uma hora, com pico em um dia, e retorna aos níveis basais após 10 dias, sugerindo que apenas a estimulação astrocitária é suficiente para a hiperexcitabilidade das vias nociceptivas (Nam et al., 2016). Outro exemplo foi publicado por Fu e colaboradores (2010), que demonstraram que a inibição do NF- κ B em células GFAP+ (astrócitos) atenua dor e inflamação após lesão do nervo periférico. A superexpressão astrocitária de I κ B α , que controla a ativação de NF- κ B, inibe a expressão das citocinas CCL2 e CXCL10 na medula espinal e reduz a dor neuropática, sabe-se que a ativação de NF- κ B pode ocorrer via acionamento dos receptores de TNF (fator de necrose tumoral) (Kretz-Remy et al, 1996; Chen, Reed, Lane, 2017).

O TNF α é uma citocina pró-inflamatória responsável pela apoptose de células tumorais, secretada principalmente por macrófagos e micróglia, responsável por causar a sensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula espinal após lesões, tendo papel essencial na manutenção da dor neuropática (Kawasaki et al, 2008; Wen et al, 2011). No entanto, as alterações na expressão genética que desencadeiam a ativação e função dos astrócitos na indução/manutenção na dor neuropática permanecem desconhecidas. Essa ativação dos astrócitos via TNF α pode levar a alterações na via das quinureninas (Rojewska et al., 2016). Contudo ainda é necessário entender primeiramente a função e os mecanismos pelos quais a via das quinureninas são moduladas nas células da glia, levando assim a modulação das vias de condução da dor (Tiwari, Guan, Raja, 2014).

1.5. Via das quinureninas

A via da quinurenina, que se inicia pelo metabolismo oxidativo do triptofano (Anagrama 1), começou a ser estudada com algum detalhe na primeira parte do século XX. Inicialmente, essa via foi descrita somente como responsável pela síntese de nicotinamida e, portanto, para a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADp), co-fator crucial para muitas enzimas (citar as enzimas + ref).

A via da quinurenina também foi associada a disponibilidade dietética de vitamina B6 e ao metabolismo do triptofano (Badawy, 2016), devido ao fato da maior parte das enzimas presentes na cascata serem dependente de B6, e a deficiência de B6 foi caracterizada pelo aumento da excreção, ácido xanturênico na urina (Bender et al., 1990). Contudo, nenhuma atividade neurobiológica da via das quinureninas e seus produtos catabólicos havia sido demonstrada; somente em 1978, que Lapin demonstrou que metabólitos de triptofano poderiam produzir convulsões quando injetados diretamente no cérebro. Várias publicações haviam relatado concentrações anormais de quinurenina em vários distúrbios cerebrais, embora esses resultados tenham sido interpretados em termos de seus efeitos nos níveis de triptofano e serotonina e não dos metabólitos da via da quinurenina (KMP) (Curzon, 1969; Dewhurst, 1970; Wood et al., 1978).

Atualmente, aumento dos níveis de KMP no sistema nervoso central está relacionada a diversas doenças neuronais, como Parkinson, depressão, esquizofrenia, doença de Huntington e Alzheimer, tornando-se alvo para estudo em outras doenças que acometem o sistema nervoso central (O'Connor et al., 2009; Zwilling et al., 2011).

As quinureninas (Kyn) neuroativas são geradas após o catabolismo oxidativo do triptofano pela indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Takikawa et al., 1986; Ball et al., 2014), formando a Kyn, a qual pode ser convertida em vários metabólitos, tais como 3-hidroxiquinurenina (3-Hk), ácido 3-hidroxiانترانílico (3-Haa) e ácido quinolínico (QA), que são mediados principalmente por duas enzimas: quinurenina-3-monooxigenase (KMO) e dioxigenase do ácido 3-hidroxiانترانílico (HAAO), respectivamente (Chiarugi et al., 1995; Smith, Jamie, Guillemin, 2016).

Os metabólitos da Kyn, 3-HK e QA, apresentam propriedades neurotóxicas; sabe-se que o ácido quinolínico é seletivo para os receptores NMDA (Stone, Perkins, 1981; Lapin, 1978), fazendo com que ocorra liberação de glutamato pelos neurônios e também inibindo a recaptação pelos astrócitos. Altos níveis de glutamato extracelular fazem com que a ativação neuronal persista, levando a uma excitotoxicidade devido ao influxo aumentado de cálcio, levando a disfunções mitocondriais, ativação de caspases e proteases, bem como ativação de óxido nítrico sintase (ONS) (Tavares et al., 2002; Cruz, Carrillo-mora, Santamaría, 2012). Já a 3-HK, sintetizada pela KMO, produz radicais livres que oxidam moléculas com que interagem (Vazquez et al., 2009;), como demonstrado nos estudos de Okuda et al. (1996, 1998) onde cultura de neurônio tratada com 3-HK tinha uma menor viabilidade, redução no tamanho das células e do crescimento neurítico, mostrando o efeito neurotóxico da 3-HK.

Essas “quinureninas” são biologicamente ativas tanto na periferia quanto no Sistema Nervoso Central (SNC). A regulação positiva do metabolismo de Kyn é geralmente uma consequência de ativação de células imunes e gliais (Schwarcz et al. 2012; Wang et al., 2015). Contudo o seu papel na sinalização da dor neuropática ainda é pouco elucidado.

Anagrama 1- Esquema representativo dos metabólitos produzidos pela degradação do triptofano através da via metabólica das Quinureninas (adaptado de Wirthgen et al., 2015).

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho é demonstrar o papel da KMO produzida na medula espinhal na manutenção da dor neuropática através da oxidação da quinurenina periférica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para o desenvolvimento experimental desse trabalho foram utilizados camundongos isogênicos SPF (livre de patógenos) da linhagem *C57/Bl6*, machos, selvagens, pesando entre 20 a 25g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP) – Campus Ribeirão Preto; ou camundongos *C57/Bl6* geneticamente deficiente para TNFR1, provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE), mantidos com alimentos e água *ad libitum*, temperatura controlada e ciclo de claro/ escuro de 12h. Todos os protocolos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas e aprovados pelo Comitê de Bem-Estar Animal da FMRP (045/2013 e 120/2018).

3.1.1. Delineamento experimental

Os animais foram divididos em diferentes grupos (n= 4 – 6): Sham – animais que não tiveram a lesão no nervo; SNI – animais com lesão no nervo; Veículo – tratados com salina; Ro 61-8048 – tratados com fármaco inibidor da KMO; ShScramble - tratados com veículo do Sh; ShRNA-KMO – tratados com inibidor genético da KMO e 3-hidroxykynurenine – tratados com o metabólito da KMO, a 3-hk.

3.2. Indução da lesão do nervo periférico pelo modelo SNI

Os animais foram anestesiados com isoflurano 1,5% (via inalatória) previamente aos procedimentos cirúrgicos, seguindo as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP. O modelo de lesão do nervo SNI consiste na ligadura por fio de sutura seguido da transecção de dois (peroneal e tibial) dos três

ramos do nervo isquiático dos camundongos, como descrito por Bourquin e colaboradores (2006).

3.3. Avaliações dos limiares nociceptivos mecânicos

Antes das avaliações nociceptivas mecânicas, os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 30-40 minutos antes do experimento, para habituação ao ambiente.

A hiperalgesia neuropática foi avaliada por filamentos de von Frey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA), os quais foram aplicados na região medial da pata posterior direita e/ou esquerda. A resposta nociceptiva é caracterizada por flexão seguida de súbita retirada da pata. O filamento de menor força capaz de induzir resposta nociceptiva foi apresentado como limiar mecânico (g).

3.4. Administração de drogas

Para a administração das drogas os animais foram anestesiados com isoflurano 1,5% (via inalatória). A quinurenina foi administrada via intravenosa (i.v.), feita pela cauda dos animais; enquanto RO 61-8048, Sh (*Scramble* e RNA-KMO) e 3-hidroxiquinurenina foram administrados por via intratecal (i.t.). Para a administração i.t. os animais anestesiados passaram por tricotomia na região dorsal. Utilizando seringa de insulina de 30 unidades (BD Ultra Fine™ II), as drogas foram administradas (5 µl) entre as vértebras L4 e L5, a confirmação da aplicação correta se dava pelo reflexo da cauda dos animais.

3.5. Imunofluorescência

No 14º dia após indução da lesão (SNI), os animais *C57/B16* neuropáticos ou falsamente operados (sham) foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (100mg/Kg) e perfundidos com paraformaldeído 4% antes da retirada cirúrgica das medulas espinais (ao nível de L3-L6), deixadas fixando em PFA 4% por 12h e depois em sacarose 20% durante 5 dias para desidratação do tecido, em seguida foram congelados em “*Optimal Cutting Temperature*” (*Tissue-Tek®*) e armazenadas a -70°C, depois cortadas em criostato. Após o corte das medulas a 20µm e fixadas em lâminas gelatinizadas, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS por 5 min e deixadas submersas em solução de glicina 0,1 M em PBS por 30 min, para retirada de grupos de aldeídos. Em seguida realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas, através da incubação de BSA 1% e Triton 0,1% durante 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos primários usados foram: GFAP, IBA, NeoN (marcadores de astrócitos, micróglia e neurônios, respectivamente) e KMO. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS durante 5 min antes de incubar com os anticorpos secundários por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários eram marcados com Alexa Fluor (488 ou 594;). As lâminas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS durante 5 min, para retirada do excesso de anticorpo secundário e foram montadas com fluormount diluído em PBS contendo DAPI (1:2). As imagens foram obtidas por meio do microscópio confocal (Leica TCS-SP5 AOBS, Wetzlar, Alemanha).

3.6. Cultura primária de astrócitos

Para cultura primária de astrócitos, os camundongos recém-nascidos (1-5 dias) foram anestesiados no gelo e depois decapitados. Os cérebros foram coletados de

camundongos WT e TNFR1, processados com kit enzimático para dissociação cerebral (Miteny Biotec) e separados por kit MicroBeads para ACSA1 (Miteny Biotec), os astrócitos obtidos foram colocados em placas de cultura. Após uma semana, a purificação foi verificada usando Citometria de Fluxo para células GFAP + (FACSVerse - BD Biosciences). As culturas purificadas foram tratadas com TNF recombinante (10 ng / ml) ou LPS (100 ng / ml) durante 24 horas. As células foram coletadas para análise em qPCR e Western blot.

3.7. Avaliação da expressão proteica: Western Blot

O lizado proteico do corno dorsal da medula espinal de camundongos ou lizado celular foi preparado em tampão de extração de proteínas com inibidor de protease, o tecido foi macerado com o tampão e as amostras foram armazenadas a 70 °C. Após, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM por 12 minutos a 4 °C; e de uma alíquota do sobrenadante foi feita a dosagem de proteínas. A separação das proteínas foi feita por SDS-eletroforese em gel de poliacrilamida e transferida para membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). A expressão proteica de KMO (56 kDa), GFAP (55 kDa) com SDS, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose (Merck Millipore). As membranas foram bloqueadas com leite a 10% por 2 horas e incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos primários monoclonais de camundongo contra KMO, GFAP. Após incubação as membranas foram lavadas com TBS-T 3 vezes por 10 minutos, e incubadas por 2 horas com anticorpos secundários em leite 5%. A imuno detecção foi realizada utilizando o aparelho Quemi TM-Doc XRS (BioradLaboratories).

3.8. Avaliação da expressão gênica: Extração de RNAm e RT-PCR em tempo real

As alterações na expressão dos genes de KMO e GFAP foram validados por PCR-RT. Astrócitos foram isolados (como descrito no item 3.6) e as medulas coletas para a extração de RNA utilizando TriZol® (Sigma) e congeladas a -70°C. Para evitar qualquer contaminação das amostras durante os procedimentos foram utilizados materiais plásticos e soluções livres de RNAses.

Após extração, a concentração de RNA foi determinada pela densidade ótica (comprimento de onda de 260nm) por meio do equipamento NanoDrop One (Thermo Scientific). A transcrição de mRNA em cDNA ocorreu através do kit enzimático cDNA-High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsland, CA), seguindo os protocolos fornecidos pelo kit. A reação quantitativa do RT-PCR foi feita utilizando o sistema de fluorescência SYBR-green® (Invitrogen, Carlsbad, USA), e a leitura feita no stepOne Plus Real-Time PCR System. O PCR-RT foi realizado em placa com volume final de 6,25 µl, 1 µl de cDNA e 5,25 µl de Mix (3,125 µl SYBR-green + 0,25 µl do primer da sequencia sense + 0,25 µl do primer da sequencia anti-sense + 1,625 µl de água). A placa foi mantida a 95 °C por 10min, passando por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C e 2 minutos a 72°C. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “cycle threshold” (CT). Os pares de primers de camundongos utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos pares de primers utilizado.

Genes	Sequência Sense	Sequência Anti-Sense
GAPD H	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAA-3'	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGT-3'
KMO	5'-TGTGCCCATGAAAGCCAGAA- 3'	5'-GCACCTTCGACTTGGCATAG- 3'
GFAP	5'- AGGGCGAAGAAAACCGCATCAC C-3'	5'- TCTAAGGGAGAGCTGGCAGGGC T-3'

*Todos os primers foram fornecidos por Sigma Aldrich

3.9. Citometria de Fluxo

A suspensão de células da cultura primária de astrócitos foi fixada e permeabilizada utilizando o kit de fixação e permeabilização (BD Bioscience) e as células foram marcadas com anticorpos anti-GFAP conjugado com fluorocromo APC. As células foram adquiridas no citometro FACSVerse (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o software FlowJo (BD Biosciences)

3.10. Preparo de soluções, drogas e reagentes

3.10.1. Solução de tampão salina-fosfato (PBS)

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck)8,0g
 Cloreto de Potássio (KCl, Merck)0,2g
 Fosfato de Sódio dibásico (Na₂HPO₄, Merck)1,15g
 Fosfato de Potássio monobásico (KH₂PO₄, Merck)0,2g

Água Milli-Q q.s.p1L

O pH foi ajustado para 7,4 e estocada em garrafas estéreis a 4 °C.

3.10.2. Tampões utilizados para Western Blot

Solução TBS 10%

Tris60,5g

NaCl87,87g

Água Milli-Q q.s.p.1L

pH ajustado para 8, diluição 1:10 mais adicionado 0,5% de tween 20.

Solução SDS 10%

SDS10g

Água Milli-Q100ml

Tampão de amostra

0,5M tris-HCL pH=6.81ml

Glicerol0,8ml

SDS 10%1,6ml

2-Mercaptoetanol0,4ml

1% Azul de bromofenol0,4ml

Água Deionizada3,8ml

Após preparo as alíquotas foram armazenadas em temperatura de -20 °C.

Tampão eletroforese 10%

Tris 25mM30g

Glicina 250mM pH=8,3144,2g

SDS 1%100ml

Água Destilada1L

Bis/Acrilamida

Acrilamida29g

N'Bis-Metileno1g

Água Milli-Q100ml

1,0M tris-HCl

Tris base12,11g

Água Milli-Q100ml

Ajustar pH=6,8 e armazenar em 4 °C.

1,5M tris-HCl

Tris base27,24g

Água Milli-Q100ml

Ajustar o pH=8,8 e armazenar a 4 °C.

3.10.3. Meio de Cultura Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

(DMEM) Completo

DMEM 1x (Corning)500ml

Soro Fetal Bovino (Sigma)50ml

L-glutamina (Sigma)150 µl/ml

Penicilina/Gentamicina (Sigma)150µl/ml

Streptomicina (Sigma)100µg/ml

3.10.3. Tampões Utilizados para Imunofluorescência

Solução de Glicina 0,1M

Glicina0,75g

PBS q.s.p.100ml

Solução de Bloqueio

BSA0,5g

Soro Fetal Bovina5ml

Triton 100x	150µl
TBS	45ml

3.11. Reagentes

Anticorpos anti-KMO (NBP1-44263, Novus Biologicals)

Anticorpos anti-GFAP(MAB3402X, Millipore)

Anticorpo anti-NeuN (MAB377X, Millipore)

Anticorpo anti-Iba1 (NB100-1028, Novus Biologicals)

Anticorpo anti-GFAP Citometria (560298, BD)

Kynurenine (Sigma Aldrich)

Ro-618048 (Sigma Aldrich)

3-Hidroxykynurenine (Sigma Aldrich)

TNF- α recombinante (eBioscience)

LPS (eBioscience)

3.1. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 5 animais por grupo. As análises dos resultados foram realizadas pelo método de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), e comparações post-hoc foi utilizado teste de Bonferroni, de acordo com as variáveis e grupos comparados sendo que as diferenças consideradas significativas para valores de $P < 0,05$, foram determinados utilizando GraphPad Software 5.0 (Graph Pad, USA).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Quinurenina sistêmica (i.v.) induz alodinia mecânica dependente da KMO produzida na medula espinal

A quinurenina administrada de modo intravenoso em animais WT demonstrou ser capaz de induzir uma redução do limiar mecânico desses animais no teste de von Frey filamentos, indicando que ela estava sendo capaz de induzir a alodinia (isso é, estímulo que antes não era nocivo passa a ser nocivo), e essa alodinia se mostrou ser dependente da KMO produzida na medula espinhal, pois quando o inibidor de KMO era administrado, intratecal, junto com a quinurenina intravenosa, o limiar mecânico desse grupo de animais não diminuía como observado anteriormente (Figura 1a).

Figura 1 – Quinurenina sistêmica leva ao desenvolvimento da alodinia mecânica dependente da KMO espinal. Foram analisados os limiares mecânicos dos animais C57BL/6 WT tratados com Kyn (i.v.) e Ro 61-8048 (i.t.). (a) Administração de Kyn sistêmica leva ao desenvolvimento de alodimnia mecânica (vermelho) e a administração conjunta do inibidor de KMO na medula, Ro-61-8048, reduz a alodinia mecânica (azul). Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com veículo/veículo. # $P < 0,05$ em comparação com kyn / veículo.

4.2. Indução da alodinia mecânica altera a expressão gênica e proteica de KMO na medula espinal

O modelo de lesão neuropática usado, SNI, foi capaz de levar a indução de alodinia, como mostrado pelo teste de von Frey de filamentos (Figura 2a). E também demonstramos que após a lesão periférica do nervo ciático, ocorreu aumento da expressão gênica e proteica da KMO, no corno ipsilateral da medula espinal (Figura 2b), com o pico no 10º e 14º dia após a lesão, respectivamente.

Figura 2 – SNI leva ao desenvolvimento de alodia mecânica e aumento da expressão de KMO na medula espinal. Foram analisados os limiares mecânicos de animais C57BL/6 SNI e avaliada a expressão temporal de KMO na medula espinal. (a) Modelo de lesão SNI leva ao desenvolvimento de alodimnia mecânica (vermelho) comparado com animais sham (preto) de forma tempo dependente com início no 3º dia após a lesão. (b) Variação temporal da expressão genética e proteica, respectivamente, de KMO na medula após indução do SNI, com pico genético no 10º dia após lesão e a proteica no 14º. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com Sham.

4.3. Alodinia mecânica, após lesão, é dependente da KMO e seu metabólito na medula espinal

Após identificar alterações na expressão da KMO durante a dor neuropática, fomos investigar se a enzima teria papel no surgimento da alodinia mecânica e para isso usamos dois métodos de inibição da KMO: genético e farmacológico. A inibição transcricional da KMO, usando Sh-KMO, mostrou uma redução proteica da enzima (Figura 3b e c) e após o início do tratamento com o Sh houve um aumento do limiar mecânico desses animais em relação ao grupo veículo. O mesmo foi observado nos testes com animais tratados com o inibidor farmacológico da KMO (RO-61-8048), na dose mais alta (Figura 3a). Além disso, quando administramos o metabólito da KMO, 3-HK, intratecal em animais WT (Figura 3d), foi observado uma redução do limiar mecânico, relacionada com o desenvolvimento de alodinia, de forma dose dependente, indicando que possivelmente durante a neuropatia, o desenvolvimento de alodinia seja devido ao aumento de 3-HK na medula desses animais, e que a KMO se faz necessária para o desenvolvimento da dor neuropática.

Figura 3 – KMO da medula espinal está envolvida na manutenção da dor neuropática. Foram analisados os limiares mecânicos dos animais C57BL/6 SNI tratados com Ro 61-8048 (i.t.), SHKMO (i.t.), e de animais C57BL/6 WT tratados com 3-Hk (i.t.), avaliada a expressão proteica de KMO na medula espinal. (a) Administração do inibidor farmacológico, Ro 61-8048, na dose mais alta (300 nmol) reduz a alodinia mecânica, 3 horas após a administração (vermelho) quando comparado com animais os animais Sham (preto). (b c) Administração de Sh-RNA/KMO durante 4 dias reduz a alodinia (preto), aumenta o limiar mecânico, quando comparado com animais SNI tratados com veículo (vermelho), devido a redução da expressão proteica de KMO na medula dos animais SNI. (d) A administração da 3-HK (i.t.) em animais WT levou ao desenvolvimento de alodinia mecânica de forma dose dependente, com pico em 5 horas após administração na maior dose (80 nmol) (verde) comparado com o veículo (preto). Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com Sham / veículo, SNI / veículo e veículo. # $P < 0,05$ em comparação com SNI / veículo.

3.4. Expressão de KMO na medula espinal está restrita aos astrócitos

O próximo passo foi compreender qual célula do sistema nervoso central (medula espinal) estava expressando a KMO. Utilizando marcadores para micróglia, neurônio e astrócitos (IBA-1, NeuN e GFAP, respectivamente) e para KMO na medula após 14 dias da indução do SNI, pico da expressão proteica da enzima, observamos que a KMO não colocalizava com neurônios e micróglia, mas somente com os astrócitos na medula (Figura 4a).

a

Figura 4 – KMO é expressa somente nos astrócitos na medula espinal. Foram analisadas por imunofluorescência as medulas de animais C57BL/6 no 14º dia após a indução do SNI, usando marcadores para astrócitos (GFAP), micrógliia (IBA-1) e neurônios (NeuN) em verdes e KMO em vermelho. (a). Demonstrativo da expressão de KMO nas células da medula, não havendo colocalização da KMO com neurônios e micrógliia (NeuN e IBA-1, respectivamente), somente com células GFAP + (astrócitos).

4.5. TNF em cultura primária de astrócitos aumenta expressão de KMO

Para buscar entender melhor o papel dos astrócitos e a expressão de KMO nessas células, utilizamos cultura primária de astrócitos purificada (Figura 5a) e após foi estimulada com TNF em diferentes tempos. Nos tempos de 6 e 24 horas ocorria o pico da ativação de astrócitos, determinada pelo aumento da expressão genica e proteica de GFAP (Figura 6a). O TNF também aumentou a expressão de KMO na cultura, com pico em 6 horas após estímulo (Figura 6b); em contrapartida o estímulo com LPS na cultura não causou aumento de GFAP e KMO (Figura 6a), mostrando que não há contaminação de micróglia na cultura e que LPS não ativa astrócitos.

Figura 5 – Padronização da cultura primária de astrócitos. (a) Comprovação de purificação de astrócitos, marcados como GFAP, pelo método de citometria de fluxo.

Figura 6 – TNF induz expressão de KMO em cultura primária de astrócito.

Astrócitos foram coletados do cérebro de animais recém-nascidos (1-4 dias) C57BL/6 WT e estimulados com meio, TNF ou LPS. (b) Expressão genética e proteica, respectivamente, de GFAP, marcador de ativação de astrócitos, na cultura estimulada com LPS e TNF, mostrando que em comparação ao meio somente o TNF ativa astrócitos. (c) Expressão genética temporal da KMO em cultura de astrócitos após estímulo com TNF, com pico em 6 horas e expressão proteica 24h após estímulo. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 4 poços por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com controle.

4.7. Ativação de astrócitos é dependente do TNF produzido pela micróglia ativada

Após determinar a capacidade do TNF ativar a cultura primária de astrócitos, o próximo passo foi determinar se a micróglia ativada seria capaz de produzir TNF em cultura, para comprovar o que já existe na literatura de quem durante a neuropatia a micróglia se torna reativa e aumenta a expressão e liberação de TNF na medula espinal. A cultura primária de micróglia foi tratada com LPS durante 1 hora e como vistos na literatura (artigo) a cultura de micróglia ativada aumenta a produção/liberação de TNF no meio (Figura 7a). Após determinar que a micróglia reativa produz TNF, as culturas foram estimuladas com LPS por 30min, lavadas para remover o LPS e 24h depois o meio condicionado de micróglia (MCM) foi coletado e usado para estimular a cultura primária de astrócitos por 24h. E foi observado que assim como o TNF, o MCM é capaz de ativar a cultura de astrócitos, determinado pelo aumento da expressão gênica de GFAP (Figura 7b), e também leva ao aumento de KMO na cultura primária de astrócitos (Figura 7c).

Figura 7 – MCM induz expressão de KMO em cultura primária de astrócito.

Astrócitos foram coletados do cérebro de animais recém-nascidos (1-4 dias) C57BL/6 WT e estimulados com meio, MCM ou TNF. (a) Dosagem de TNF no meio de cultura de micróglia após estímulo de 24h com LPS. (b) Expressão genética temporal de GFAP, marcador de ativação de astrócitos, na cultura estimulada com MCM, mostrando que em comparação ao meio somente o MCM ativa astrócitos. (c) Expressão genética temporal da KMO em cultura de astrócitos após estímulo com MCM, com pico em horas e expressão proteica 24h após estímulo com MCM e TNF, mostrando que ambos aumentam a expressão de KMO em astrócitos. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 4 poços por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com controle.

4.7. Animais nocaute para receptor do tipo 1 de TNF apresentam redução da alodinia mecânica e da expressão de KMO

Os experimentos anteriores mostraram *in vitro* a capacidade do TNF ativar os astrócitos e levar ao aumento da expressão de KMO nessas células. Para compreender se essa via dependente de TNF teria papel importante na expressão de KMO durante a dor neuropática, foi induzido o modelo em animais nocautes para o receptor de TNF do tipo 1 (por ter um papel maior de neurotoxicidade), e nossos resultados indicam que os animais nocautes para TNF apresentam uma redução da alodinia mecânica, a partir do 10º dia após a lesão quando comparados com animais WT operados (Figura 8a). Os animais nocautes apresentam redução da expressão de KMO no corno dorsal ipsilateral da medula no 14º dia após lesão, pico da expressão de KMO após a lesão periférica (Figura 8b).

Figura 8 – TNFR1 necessário para manutenção da alodinia e expressão de KMO na medula espinal. Animais C57BL/6 e animais deficientes para TNFR1 foram submetidos ao modelo de SNI e avaliados os limiares mecânicos expressão proteica de KMO. (a) Animais deficientes para TNFR1 apresentam uma redução da alodinia mecânica a partir do 10º dia após a lesão (azul) comparados com os WT / SNI (vermelho). (b) Animais deficientes para TNFR1, 14º dia após SNI, não tem uma elevação na expressão proteica de KMO comparado com os WT/SNI. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com WT/SNI.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

É bem descrito que alterações na via metabólica das quinureninas está relacionada com diversas doenças que acometem o sistema nervoso, como Parkinson, Alzheimer, Huntington (O'Connor et al., 2009; Zwillig et al., 2011). Contudo a participação das Kyn na dor neuropática não está bem descrita. Trabalhos mais recentes começaram a associar o papel das quinureninas no desenvolvimento da dor neuropática (Zhou et al., 2015; Rojewska et al., 2018). Nosso grupo também demonstrou que a lesão de nervo (SNI) leva ao aumento de kyn na circulação sistêmica, devido ao aumento da expressão da enzima IDO-1 nas células dendríticas (Souza et al., 2018 – dados não publicados).

Observamos que o aumento de Kyn em animais sem lesão de nervo é capaz de levar ao surgimento de alodinia mecânica dependente da KMO presente na medula espinal. A alteração da via das kyn na dor neuropática induzida pelo modelo de SNI já havia sido demonstrada por Zhou et al. (2015) onde foi demonstrado que após a lesão por SNI ocorria aumento de IDO-1, enzima responsável pelo metabolismo de triptofano e que dá início a via metabólica das Kyn. Esse aumento também foi demonstrado pelo nosso grupo (Souza et al., 2018 – dados não publicados) e ambos demonstraram que animais deficientes para IDO-1 não desenvolviam a alodinia mecânica, relacionada com o desenvolvimento da dor crônica. Contudo por qual mecanismo o aumento de IDO-1 levava ao desenvolvimento da dor neuropática não foi discutido por Zhou et al. (2015).

Contudo posteriormente foi descrito que após lesão de nervo periférico, desencadeava desregulação da via das kyn no SNC, demonstrado pelo aumento da expressão de KMO (Laumet et al., 2017) onde eles discutem que o aumento de kyn

periférica consegue entrar no SNC e lá ser metabolizada pela KMO. O mesmo foi observado pelo nosso grupo, onde demonstramos por mRNA e expressão protéica o aumento de KMO na medula espinal após a indução de SNI, com pico no 10º e 14º dia após a lesão; esse aumento de KMO está relacionado com o metabolismo da kyn sistêmica, já que a inibição da KMO no SNC leva à redução da alodinia mecânica, como demonstramos em nossos resultados usando dois tipos de tratamentos para demonstrar. Primeiramente usamos a inibição enzimática com o inibidor farmacológico da KMO (RO-618048), já usado na literatura para inibir a atuação da KMO (Rodgers, et al., 2009, Rojewska et al., 2016), e observamos que a inibição da KMO, leva a uma redução da alodinia mecânica com apenas uma dose do inibidor; outro mecanismo usado para demonstrar o papel da KMO no desenvolvimento da dor neuropática foi a inibição transcrição do mRNA de KMO com a administração de SH-KMO, corroborando os nossos dados com a inibição farmacológica da KMO e também dados da literatura onde a inibição da KMO foi feita utilizando outro inibidor (UF 648), contudo também foi observado redução da alodinia mecânica no modelo de lesão nervosa por (Rojewska et al., 2018).

As alterações nos limiares nociceptivos causados pela alterações nas vias da Kyn no SNC se dá pois o metabolito (3-Hk) gerado pelo metabolismo da Kyn pela KMO é neurotóxico, o que faz com que o aumento desse metabólito ou a injeção dele em animais não neuropáticos, como demonstramos, leva a alterações na excitabilidade neuronal e até morte neuronal, fazendo com que se tenha uma facilitação da dor devido ao aumento do estresse oxidativo causado nos neurônios, pelo aumento de ROS gerado pelo aumento de 3-Hk (Okuda et al., 1998).

Atualmente já ficou claro que o aumento de Kyn principalmente no SNC está intimamente relacionado com a manutenção da dor neuropática, porém há uma

discrepância em qual região do SNC e qual tipo celular é responsável pela produção das Kyn. Laumet et al. (2017) demonstrou o aumento da KMO somente no cérebro dos animais doentes, enquanto nós observamos esse aumento no corno dorsal da medula espinal, que está associada a alterações durante a lesão do nervo ciático, aumento também observado por Rojewska et al. (2018). Além disso, Laumet et al. (2017) e Rojewska et al. (2018) observam a expressão da KMO em neurônios e micróglia, respectivamente, indo contra o observado pelo nosso grupo, onde esse aumento de KMO é observado somente nos astrócitos.

A diferença na célula que expressa KMO observada por Rojewaska et al. (2018) pode ser devido a metodologia utilizada, já que como observamos nos resultados nossos é que o astrócito aumenta a expressão de KMO após ser ativado por TNF- α , que pode ser produzido pela micróglia durante a dor neuropática (Swada et al., 1989; Zheng et al., 2011; Liu et al., 2017), sendo assim quando ele depleta a micróglia com hidrocloreto de minociclina, não se tem uma produção de TNF- α por essa célula, o que não leva a ativação de astrócitos e por esse motivo à redução da produção de KMO, sendo assim o observado por Rojewaska et al. (2018) pode ser um resultado indireto, e não porque a micróglia produza ou tenha aumento de KMO. Além disso já se tem trabalhos que descrevem a expressão dos metabólitos das kyn nos astrócitos em outras doenças que acometem o SNC (Guillemin et al., 2000), corroborado pelos nossos dados de imunofluorescência e de cultura primária de astrócitos purificados, onde quando ativados com TNF- α há um aumento da expressão de KMO, demonstrado tanto por expressão de mRNA quanto proteica.

A escolha de estimular a cultura de astrócitos com TNF- α se deu pelo fato de ter sido demonstrado que essa citocina é responsável pela ativação e reatividade astrócitaria, mesmo que outras, como IL-1 β , sejam capazes de levar a esse efeito

quando associadas ao TNF- α , foi demonstrado que o TNF- α sozinho é suficiente para o astrócito se tornar reativo e neurotóxico (Wachtel et al., 2001; Liddelow et al., 2017). E nossos dados demonstram o mesmo, quando levado em consideração a marcação de reatividade astrocitária pelo aumento da expressão de GFAP.

O aumento de TNF- α durante a dor neuropática já foi demonstrado em diferentes modelos e no SNC é associado à ativação de micróglia via ativação de receptores de ATP (Inoue, 2002), contudo em nosso trabalho utilizamos a estimulação por LPS já que também é capaz de levar uma ativação de macrófagos/microglias e a produção de citocinas pró inflamatórias, como TNF- α (Li et al., 2004). E o que observamos é que 24h após estímulo a micróglia produz TNF- α e libera no meio. E que o MCM quando colocado na cultura de astrócitos por 24h, como já utilizado em outros trabalhos para levar a ativação de astrócitos, faz com que se tenha um aumento da expressão de GFAP, o que nos demonstra que as substâncias produzidas pela micróglia ativada são capazes de ativar o astrócitos. Como o MCM possui outras citocinas além do TNF- α , a uma ativação astrocitária mais intensa pode ser relacionada a isso, como já demonstrado por (REFERENCIAR).

A modulação do TNF- α durante processos inflamatórios e, como já descrito, na dor neuropática se dá pela ativação, predominantemente, do receptor do tipo 1 (TNF-R1), devido ao fato desse receptor estar associado ao desencadeamento de respostas inflamatórias, apoptóticas e efeitos citotóxicos (Waage et al., 1992; Leo et al., 2015). No contexto da modulação das células da glia durante a dor neuropática, já é bem estabelecido que os astrócitos expressam o TNF-R1 e que a ativação via esse receptor leva a produção de citocinas pró-inflamatória e à reatividade astrocitária (Gao, Zhang e Ji, 2010).

Nesse sentido, fomos avaliar o desenvolvimento da alodinia mecânica em animais deficientes para esse receptor, e o que vimos é que os animais não têm um desenvolvimento tão severo com os animais WT, o que já foi descrito anteriormente (REFERENCIAR). Com tudo, o que observamos de novo é que, os animais deficientes para TNF-R1 não possuem uma expressão tão elevada de KMO na medula espinal 14 dias após a lesão, pico de expressão observado na medula dos animais WT. Essa redução de KMO pode estar relacionada com uma menor ativação dos astrócitos que não apresentam o receptor, sendo assim o TNF- α produzido pela micróglia após a lesão não tem efeito sobre essas células, levando à uma redução da metabolização da kyn e, conseqüentemente, uma menor produção de 3-Hk. Porém a redução da alodinia mecânica pode não estar somente relacionada com a redução de ativação dos astrócitos e de KMO, devido ao fato do TNF- α ser importante em outras etapas iniciais da dor neuropática e na migração de células do sistema imune para o local da lesão (Liefner et al., 2000; De Logu et al., 2017).

Vale ressaltar então que mesmo o papel da sinalização TNF- α / TNF-R1 não sendo totalmente nos astrócitos; os nossos dados por cultura indicam que essa ativação é fundamental na alteração de expressão da KMO nessa célula e que quando não se tem TNF-R1 há uma redução no aumento da KMO, o que determina um papel direto nessa fase de manutenção da dor. Além disso, o papel da KMP na manutenção da dor neuropática vem se mostrando um novo alvo terapêutico, nossos dados demonstram que os metabólitos da KMP estão intimamente relacionados com a alodinia mecânica, corroborando os dados da literatura (Zhou et al., 2015; Rojewska et al., 2016; Rojewska et al., 2018) e a relação da desregulação dessa via com alterações nas funções neuronais (Okuda et al., 1998; Laumet et al., 2017; Lovelace et al., 2017).

Por fim, todos os resultados do presente trabalho agregam novas informações acerca de um possível alvo real para o tratamento da dor neuropática via inibição da via da KMO no SNC.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, após a lesão do nervo periférico, há um aumento da expressão de KMO por astrócitos na medula espinal desempenhando um papel crítico na manutenção da dor neuropática, através do metabolismo da kyn em 3-Hk. Concomitantemente ao aumento de kyn periférica após a lesão do nervo, há a ativação dos astrócitos da medula espinal via interação do $\text{TNF-}\alpha$ / TNF-R1 , levando ao aumento da expressão de KMO.

Em conclusão, estes dados revelam uma ligação crítica entre a lesão do nervo periférico, KMP e células gliais da medula espinal (astrócitos) na manutenção da dor neuropática via a ativação de receptores TNFR1 .

Anagrama 2 – Esquema ilustrativo da via de manutenção da dor neuropática dependente da KMO produzida pelos astrócitos ativados através do TNF-R1 .

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Ball HJ et al. Tryptophan- catabolizing enzymes - party of three. **Front Immunol.** 2014, 5: 485.
- Bourquin, AF et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. **Pain.** 2006, 122(14): 11-14.
- Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of Neuropathic Pain. **Neuron.** 2006, 52(1): 77–92.
- Chen M, Reed RR, Lane AP. Acute Inflammation Regulates Neuroregeneration through the NF- κ B pathway in olfactory epithelium. **PNAS.** 2017; 114(30) 8089-94.
- Chiang C-Y, Sessle BJ, Dostrovsky JO. Role of Astrocytes in Pain. **Neurochem Res** 2012, 37:2419–2431.
- Chiarugi A et al. Comparison of the neurochemical and behavioral effects resulting from the inhibition of kynurenine hydroxylase and/or kynureninase. **J Neurochem.** 1995, 65: 1176-1183.
- Cruz VPD, Carrillo-mora P, Santamaría, A. Quinolinic Acid , an Endogenous Molecule Combining Excitotoxicity , Oxidative Stress and Other Toxic Mechanisms. **International Journal of Tryptophan Research.** 2012,5: 1-8.
- De Logu, F et al. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. **Nat Commun.** 2017, 8: 1887.
- Fu ES et al. Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. **Pain** 2010 Mar;148(3):509-18.
- Gao, YJ, Zhang, L and Ji, RR. Spinal injection of TNF- α -activated astrocytes produces persistent pain symptom mechanical allodynia by releasing monocyte chemoattractant protein-1. **Glia.** 2010, 58: 1871–1880. doi: 10.1002/glia.21056.

Goncharov, NV, Jenkins, RO, Radilov, AS. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. **J. Appl. Toxicol.** 26, 148–161 (2006).

Guillemin, GJ et al. Characterisation of kynurenine pathway metabolism in human astrocytes and implications in neuropathogenesis. **Redox Report.** 2000, 5: 108-111, DOI: 10.1179/135100000101535375.

Hassel B, Paulsen RE, Johnson A, Fonnum F (1992) Selective inhibition of glial cell metabolism by fluorocitrate. **Brain Res** 249:120–124.

IASP, International Association for the Study of Pain. **Classification of Chronic Pain**, 2 Ed., IASP Task Force on Taxonomy, IASP Press, Seattle, 1994.

Inoue, K. Microglial activation by purines and pyrimidines. **Glial.** 2002, 40:156-62. doi:10.1002/glia.10150.

Jennifer AH, Lisa MB. Psychological Aspects of Neuropathic Pain. **Clin J Pain**, v. 16, p. S101–S5, June 2000.

Ji RR, et al. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. **Neuron Glia Biol.** 2006 Nov;2(4):259-69.

Kawasaki Y, et al. Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. **J Neurosci** 2008, 28(20): 5189-94.

Kretz-Remy C, et al. Inhibition of I κ B- α Phosphorylation and Degradation and Subsequent NF- κ B Activation by Glutathione Peroxidase Overexpression. **The J of Cell Bio** 1996, 133(5) 1083-93.

Kuner R, Flor H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nat Rev Neurosci.** 2016 Dec 15;18(1):20-30.

- Lapin, IP. Stimulant and convulsive effect of kynurenine injected into brain ventricles in mice. **J Neural Transm.** 1978, 42(1):37-43.
- Laumet, G et al. Upregulation of neuronal kynurenine 3-monooxygenase mediates depression-like behavior in a mouse model of neuropathic pain. **Brain Behav Immun.** 2017, 66: 94-102. doi:10.1016/j.bbi.2017.07.008.
- Ledeboer A et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain** 2005, 115:71–83.
- Leo, M. et al. Modulation of Voltage-Gated Sodium Channels by Activation of Tumor Necrosis Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Small DRG Neurons of Rats. **Mediators of Inflammation.** 2015. doi: 10.1155/2015/124942.
- Li, Y et al. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. **J Neurosci.** 2004, 24: 9623-9631.
- Liddelow SA et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature.** 2017 Jan 26;541(7638):481-487.
- Liefner, M et al. The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. **J Neuroimmunol.** 2000, 108: 147-152.
- Liu Y et al. TNF- α Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury, **The Journal of Neuroscience.** 2017, 37: 871–881. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2017.
- Lovelace MD et al. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. **Neuropharmacology.** 2017, 112: 373-388.

Meller ST et al. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology** 1994, 33:1471–1478.

Mika J et al. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol.** 2007 Apr 10;560(2-3):142-9.

Nam Y et al. Reversible Induction of Pain Hypersensitivity following Optogenetic Stimulation of Spinal Astrocytes. **Cell Rep.** 2016 Dec 13;17(11):3049-3061.

O'Connor AB, Dworkin RH. Treatment of Neuropathic Pain: An Overview of Recent Guidelines. **Am J Med**, v. 122, n. 10A, Oct. 2009.

Okuda et al. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. **Neurobiology.** 1996, 93: 12553-8.

Okuda et al. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. **Journal of Neurochemistry.** 1998, 70: 299-307.

Raghavendra, V, Tanga, F, DeLeo, JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2003, 306:624–30.

Rodgers, J et al. Kynurenine pathway inhibition reduces central nervous system inflammation in a model of human African trypanosomiasis. **Brain.** 2009, 132: 1259-1267. doi:10.1093/brain/awp074.

Rojewska, E et al. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. **Neuropharmacology.** 2016, 102: 80-91.

Rojewska, E et al. Pharmacological Inhibition of Enzymes of the Kynurenine Pathway, Significantly Diminishes Neuropathic Pain in a Rat Model. **Frontiers in Pharmacology**. 2018, 9: 1-13.

Romero-Sandoval A et al. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. **Brain Res** 2008, 1219:116–126.

Sawada, M. et al. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. **Brain Research**. 1989, 491: 394–397. doi: 10.1016/0006-8993(89)90078-4.

Scholz, J, Woolf, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat. Neurosci**. 2007 Nov;10(11):1361-8.

Schwarcz R et al. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nat Rev Neurosci**. 2012, 13: 465- 477.

Schwarz MJ et al. Increased 3-Hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer 's disease patients from controls. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**. 2013, 263: 345-352.

Silva RL et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization. **Neurobiology of Disease**. 2017.

Smith BH, Torrance N. Epidemiology of Neuropathic Pain and Its Impact on Quality of Life. **Curr Pain Headache Rep**, v. 16, p. 191–8, 2012.

Smith JR, Jamie JF, Guillemin, GJ. Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. **Drug Discov Today**. 2016, 21: 315-324.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**. 119, 7–35 (2010).

Souza et al. Kynurenine metabolic pathway links periphery to central nervous system in the maintenance of neuropathic pain. 2018. Dados não publicados.

- Stone TW, Perkins MN. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at aminoacid receptor in CNS. **European Journal of Pharmacology**. 1981, 72, 411-412.
- Sung, CS et al. Minocycline and fluorocitrate suppress spinal nociceptive signaling in intrathecal IL-1b-induced thermal hyperalgesic rats. **Glia**. 2012, 60, 2004–17.
- Takikawa O et al. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J Biol Chem**. 1986, 261: 3648-3653.
- Tanga, FY, Raghavendra V, DeLeo, J.A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem. Int**. 2004, 45: 397–407.
- Tavares RG et al. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. **Neurochemistry International**. 2002, 40, 621-27.
- Tawfik VL et al. Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. **Brain Behav. Immun**. 2007, 21, 238–46.
- Tiwari V, Guan Y, Raja SN. Modulating the delicate glial-neuronal interactions in neuropathic pain: promises and potential caveats. **Neurosci Biobehav Rev**. 2014, 45:19-27.
- Vazquez S et al. Characterisation of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. **Free Radical Research**. 2009, 32: 11-23.
- Waage, a et al. P55 and P75 Tumor Necrosis Factor Receptors in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. **Blood**. 1992, 80: 2577–2583.
- Wachtel, M. et al. Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-κB

activation. **Journal of Neurochemistry**. 2001, 78: 155–162. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00399.x.

Wang Q et al. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation. **Front Biosci**. 2015, 20: 1116-1143.

Watkins, LR, Maier, S.F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat. Rev. Drug Discov**. 2003, 2:973–85.

Wen Y-R et al. Role of Microglia in Neuropathic Pain, Postoperative Pain, and Morphine Tolerance. **J Form Med Assoc** 2011, 110(8): 487-494.

Xu, J. T. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. **Pain**. 2006, 123: 306–321. doi: 10.1016/j.pain.2006.03.011.

Xu Y et al. Anti-nociceptive roles of the glia-specific metabolic inhibitor fluorocitrate in paclitaxel-evoked neuropathic pain. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai). 2016 Oct;48(10): 902-908.

Zhang J et al. Tramadol and propentofylline coadministration exerted synergistic effects on rat spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. **PLoS One**. 2013 Aug 29;8(8): 72943.

Zhang L et al. TNF- α Contributes to Spinal Cord Synaptic Plasticity and Inflammatory Pain: Distinct Role of TNF Receptor Subtype 1 and 2. **Pain** 2011, 152(2): 419-427.

Zheng, W. et al. Glial TNF α in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats. **Molecular Pain**. 2011, 7: 40. doi: 10.1186/1744-8069-7-40.

Zhou, W et al. Peripheral indoleamine 2,3-dioxygenase1 is required for comorbid depression-like behavior but does not contribute to neuropathic pain in mice. **Brain Behav Immun**. 2015, 46: 147-153. doi:10.1016/j.bbi.2015.01.013.

Zwilling D et al. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. **Cell**. 2011, 145: 863-874.

8. ANEXOS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Papel do tnfr1 nos astrócitos na fisiopatologia da dor crônica experimental*”, registrado com o número **120/2018**, 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 30 de julho de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 158 camundongos C57Bl/6 machos pesando 20g e 40 camundongos C57Bl/6 machos pesando 02g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 152 camundongos TNFR KO machos pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 40 camundongos GFAP/GFP machos pesando 02g e 42 camundongos GFAP/GFP machos pesando 20g oriundos do Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/07/2018 a 15/08/2019.

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

We certify that the Protocol *nº 120/2018*, entitled “*The role of tnfr1 in astrotics in the physiopathology of experimental chronic 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 07/30/2018. 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 158 male C57Bl/6 mice weighing 20g and 40 male C57Bl/6 mice weighing 02g from the Central Animal House of Ribeirao Preto Medical School, 152 male TNFR KO mice weighing 20g from the Breeding Center of Special Mice of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, 40 male GFAP/GFP mice weighing 02g and 42 male GFAP/GFP mice weighing 20g from the Department of Experimental Surgery of Ribeirao Preto Medical School. This certificate is valid until 08/15/2019.

Ribeirão Preto, 30 de julho de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP