

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

**EFEITO DA SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO, COMO MODELO DE DOR
NEUROPÁTICA, SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
DEFESAS ANTIOXIDANTES NA MEDULA ESPINAL DE RATOS**

TESE DE DOUTORADO

RENATA PADILHA GUEDES

Porto Alegre, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DA SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO, COMO MODELO DE DOR
NEUROPÁTICA, SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
DEFESAS ANTIOXIDANTES NA MEDULA ESPINAL DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

RENATA PADILHA GUEDES

Orientadora: Dra. Wania Aparecida Partata

Co-orientadora: Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Porto Alegre, 2007

"A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar."

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Wania Aparecida Partata por todo o ensinamento ao longo do período de mestrado e doutorado. Agradeço pela incrível disponibilidade em ajudar durante todas as etapas deste trabalho, e também por sempre demonstrar um grande senso ético e imenso profissionalismo. Certamente levarei esses exemplos como um modelo a ser seguido no decorrer da minha trajetória profissional.

À Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro pela valiosa orientação, especialmente na técnica de Western blot. Agradeço ainda pelas críticas, sempre relevantes, e pelo entusiasmo, características que foram bastante importantes naqueles momentos de desânimo. As conversas sobre a carreira docente e científica também foram muito preciosas durante esse período de convivência.

À Profa. Dra. Adriane Belló-Klein por disponibilizar o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para a execução de boa parte das técnicas deste trabalho e pelas sugestões durante a redação dos artigos científicos.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pelo auxílio na realização das técnicas. Agradeço especialmente ao Alex pela grande parceria no desenvolvimento dos experimentos, na discussão dos resultados e também, é claro, pelas inusitadas trilhas sonoras durante nossas horas de trabalho.

À Daiane e à Helena pela grande disponibilidade em ajudar e pelo bom humor, fundamental para aqueles “agradáveis” momentos na sala escura nos verões. Agradeço por serem colegas especiais que se tornaram amigas muito queridas.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada. Desde o início deste trabalho, alguns já foram embora, novos colegas surgiram, e muitos deixaram boas recordações dos momentos especiais que passamos e também pelas contribuições diretas ou indiretas a este trabalho. Obrigada a todos vocês. Agradeço especialmente à Lidiane por todo o auxílio nos experimentos, pela amizade e ainda pelas muitas risadas e desabafos. Ao Luciano pelo grande companheirismo e pelos incontáveis socorros durante os experimentos, realização das análises estatísticas, revisão dos textos, e, principalmente, por se tornar, já há um bom tempo, essa pessoa fundamental na minha vida.

Agradeço também a todos os amigos e aos familiares pela compreensão por todos as muitas renúncias, devido às atividades do doutorado, aos encontros, viagens, conversas, passeios, etc. Certamente iremos recuperar esses momentos. Em breve!

Aos professores dos PPGs Neurociências e Fisiologia, os quais foram fundamentais para a minha formação.

A todos aqueles que acreditam na pesquisa científica como meio de desenvolvimento do nosso país, apesar das inúmeras dificuldades encontradas para sua execução.

Desejo a todos meus sinceros agradecimentos!

ÍNDICE

RELAÇÃO DAS FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
Dor e Nocicepção.....	1
Espécies Ativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes.....	9
Estresse Oxidativo, Estresse Nitrosativo e Processamento Nociceptivo.....	12
Vias de Sinalização Intracelular e Dor.....	17
OBJETIVOS.....	21
Objetivo Geral.....	21
Objetivos Específicos.....	21
RESULTADOS.....	23
Artigo 1: Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord.....	24
Artigo 2: Sciatic nerve transection changes antioxidant activity and nNOS expression in spinal cord.....	31
Artigo 3: Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain.....	47
RESUMO DOS RESULTADOS.....	72
DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÕES.....	89
PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

RELAÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Representação da via espinotalâmica, a principal via ascendente que conduz a informação nociceptiva.....	2
Figura 2: Sensibilização central em um neurônio espinal.	6
Figura 3: Diagrama esquemático ilustrando a produção de NO em resposta à ativação dos aferentes nociceptivos.....	8
Figura 4: O papel da Akt na regulação da sobrevivência celular pela fosforilação de múltiplos substratos envolvidos na regulação da apoptose.	19

LISTA DE ABREVIATURAS

CGRP:	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CREB:	proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
CuZnSOD:	Cobre-zinco superóxido dismutase
EAN:	espécies ativas de nitrogênio
EAO:	espécies ativas de oxigênio
eNOS:	NOS endotelial
ERK:	proteína cinase regulada por sinais extracelulares
GABA:	ácido gama-aminobutírico
GPx:	glutathione peroxidase
GR:	glutathione reductase
GSH:	glutathione
GSK-3:	glicogênio sintase cinase 3
GSSG:	dissulfeto de glutathione
GST:	glutathione-S-transferase
HNE:	4-hidroxinonenal
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
iNOS:	NOS induzível
MAPKs:	proteínas cinases ativadas por mitógenos
MnSOD:	manganês superóxido dismutase
mTOR:	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NADPH:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato, forma reduzida
NGF:	fator de crescimento nervoso
NMDA:	N-metil-D-aspartato
nNOS:	NOS neuronal
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintase
NO _x :	metabólitos do óxido nítrico
NO ₂ ⁻ :	nitritos
NO ₃ ⁻ :	nitratos
O ₂ :	oxigênio
O ₂ ^{•-} :	ânion superóxido
OH [•] :	radical hidroxil
ONOO ⁻ :	peroxinitrito
PDK1:	cinases dependentes de fosfoinositídeo-1
PDK2:	cinases dependentes de fosfoinositídeo-2
PIP3:	fosfatidilinositol-trifosfato
PI3K:	fosfatidilinositol-3-cinase
SNC:	sistema nervoso central
SOD:	superóxido dismutase
TBARS:	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TrkA:	receptores tirosina cinase A

RESUMO

A dor neuropática ocorre como resultado de uma lesão ao sistema nervoso. Clinicamente, sua causa está relacionada, na maioria dos casos, ao comprometimento dos nervos periféricos, por isso a utilização de modelos animais de lesão nervosa periférica é amplamente aceita para o seu estudo. A medula espinal representa o centro de processamento primário da informação nociceptiva e a fisiopatologia da dor neuropática envolve principalmente o mecanismo de sensibilização central. Esse fenômeno é caracterizado pelo aumento na resposta das células do corno dorsal espinal aos estímulos aferentes. Diversas moléculas estão envolvidas nesse mecanismo e, recentemente, as espécies ativas do oxigênio (EAO) têm sido sugeridas como possíveis mediadores da dor neuropática. Para verificar essa relação, o presente estudo avaliou os efeitos temporais da secção do nervo ciático sobre marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo e de defesas antioxidantes na medula espinal lombossacral de ratos, bem como a ativação da Akt. Os animais foram divididos nos grupos denervado (secção do nervo ciático), sham (o nervo foi exposto, porém, não seccionado) e controle (sem nenhum procedimento cirúrgico). Inicialmente os animais foram testados quanto à hiperalgesia térmica através do teste da placa quente. Foi demonstrado que 3 dias após a lesão, os animais sham e denervados apresentaram-se hiperalgésicos, mas aos 7 dias apenas os denervados ainda exibiam esta resposta. Aos 15 dias após a lesão, a hiperalgesia já havia sido revertida em todos os grupos estudados. As defesas antioxidantes enzimáticas foram avaliadas pela medida da atividade e da expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase. A atividade da catalase reduziu aos 3 e 7 dias após a cirurgia nos animais sham e denervados, e a atividade da SOD diminuiu apenas nos animais denervados no período de 7 dias após a lesão. A expressão dessas enzimas, medida por Western blot, não apresentou variações. Para a determinação de lipoperoxidação foi realizada a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a qual não apresentou diferenças entre os grupos estudados. Esses resultados iniciais sugerem que o procedimento cirúrgico, por estimular os aferentes nociceptivos dos tecidos relacinados, é suficiente para diminuir a atividade antioxidante enzimática da medula espinal, porém, essas alterações são mais expressivas nos animais submetidos à axotomia. Após, foi realizado o estudo de outras enzimas antioxidantes, a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase (GST), e também do principal antioxidante não-enzimático, a glutathione (GSH). A atividade da GST na medula não foi alterada pela lesão nervosa, e a atividade da GPx aumentou 3 dias após a cirurgia nos grupos sham e denervado, juntamente com a redução do conteúdo de glutathione. A queda da glutathione deve ser atribuída à maior atividade da GPx, que a utiliza como substrato na redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água. Nessa etapa, foi determinada ainda a expressão da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a medida dos metabólitos do óxido nítrico (NOx). A expressão da nNOS mostrou-se aumentada 7 dias após a lesão nos animais denervados. A formação de NOx foi maior nos períodos de 1, 7 e 15 dias após a axotomia. Esses resultados sustentam o envolvimento do óxido nítrico na dor neuropática. Na última parte deste trabalho foi realizada a medida da concentração do H_2O_2 na medula espinal, que apresentou aumento nos animais sham e denervados 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. Também foi avaliada, por Western blot, a expressão dos adutos de Michael formados pelo 4-hidroxinonenal (HNE) e da Akt total e fosforilada. Aos 7 dias após a lesão nervosa houve um aumento na expressão da Akt total e dos adutos de Michael formados pelo HNE. A Akt

fosforilada apresentou um aumento na sua expressão 1, 3 e 7 dias após a axotomia. Como o HNE é um produto da lipoperoxidação, pode-se afirmar que a lesão nervosa estimula este processo na medula espinal. A ativação da Akt, entretanto, pode ser um indicativo de proteção para as células nervosas, pois esta proteína participa de cascatas de sinalização relacionadas à sobrevivência celular. A partir do presente trabalho pode-se concluir que a estimulação nociceptiva induzida pela cirurgia causa alterações em sistemas antioxidantes como a catalase, a GSH e a GPx, bem como na produção de H₂O₂ na medula espinal, o que não é específico da lesão neuropática. Contudo, a dor neuropática está relacionada com a redução da atividade da SOD e o aumento na produção de HNE e de NO. Assim, após a lesão nervosa ocorre formação de EAO, as quais podem atuar como sinalizadores na modulação do processamento nociceptivo na medula espinal e, talvez, interferir em mecanismos neuroprotetores, como, por exemplo, pela ativação da Akt.

ABSTRACT

Neuropathic pain occurs as result of nervous system injury. Clinically, in almost all cases, its etiology is related to impairment of peripheral nerves. Thus, animal models of peripheral nerve injury are widely accepted to neuropathic pain studies. The spinal cord is the center of primary processing of the nociceptive information and the pathophysiology of the neuropathic pain involves mainly a central sensitization mechanism. This phenomenon is characterized by an increased response of spinal dorsal horn cells to afferent stimulus. Many molecules are involved in this mechanism and, recently, reactive oxygen species (ROS) have been suggested as putative mediators of neuropathic pain. In order to verify this relationship, the present study evaluated the temporal effects of sciatic nerve transection on oxidative and nitrosative stress markers, antioxidant defenses and Akt activation in the lumbosacral spinal cord of rats. Animals were divided in three groups: naïve, sham and sciatic nerve transection (SNT). Initially, hot plate test was performed to evaluate hyperalgesia. It was demonstrate hyperalgesia 3 days after injury in sham and SNT groups. At 7 days, only SNT animals exhibited this response and 15 days after injury the hyperalgesia was reverted in all groups. The enzymatic antioxidant defenses were evaluated by means of superoxide dismutase (SOD) and catalase activities and expression. The catalase activity was decreased at 3 and 7 days after surgery in sham and SNT group, and SOD activity was reduced only in SNT rats at 7 days after injury. No changes were observed in SOD and catalase expression, measured by Western blot. In order to evaluate lipid peroxidation (LPO), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were analyzed, and no differences among the groups were shown. These results demonstrated that the injury modifies antioxidant enzymatic activity in spinal cord. Afterwards, other antioxidant enzymes, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) and the main non-enzymatic antioxidant, glutathione (GSH), also were studied. GST activity was not changed after nerve injury. There was an increase in GPx activity and a decrease in GSH content 3 days after surgery in both sham and SNT groups. The decrease in GSH may be attributed to the increase in GPx activity, since GSH is necessary to reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) to water catalyzed by GPx. The expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and the determination of nitric oxide metabolites (NOx) also were conducted. nNOS expression increased 7 days after SNT. NOx production was higher at 1, 7 and 15 days after axotomy. These results emphasize the involvement of nitric oxide in neuropathic pain. In the last part of this study, the measurement of H_2O_2 in spinal cord was conducted, showing an increase in sham and SNT animals at 1, 7 and 15 days after surgery. It was also evaluated, by Western blot, the 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-Michael adducts and the total and phospho-Akt. At 7 days, there was an increase in total-Akt expression and HNE-Michael adducts. Phospho-Akt expression increased 1, 3 and 7 days after axotomy. HNE is a lipid peroxidation product, thus, may be suggested that nerve injury stimulates this process in spinal cord. However, the Akt activation may be a means of protection to nerve cells, since this protein participate of signal cascades related to cell survival. In summary, the results of present study show that the peripheral nerve injury interferes in the systems related to oxidative stress, besides activate cell survival mechanisms. In conclusion, nociceptive stimulation induced by surgery causes changes in antioxidants systems such as catalase, GSH and GPx, as well in H_2O_2 production in spinal cord, which is not specific to neuropathic injury. However, neuropathic pain is related with SOD activity

decrease and HNE and NO production increase. Thus, after nerve injury occur ROS formation which can act as signaling molecules in nociceptive processing modulation in spinal cord and, maybe, interferes in neuroprotection mechanisms, such as Akt activation.

INTRODUÇÃO

Dor e Nocicepção

A dor é uma experiência sensorial desagradável de caráter subjetivo. A nocicepção, por outro lado, compreende a transmissão e o processamento da informação dolorosa. Assim, a estimulação nociva detectada pelos receptores periféricos é codificada como uma mensagem nociceptiva, a qual é progressivamente transmitida e processada em centros nervosos superiores. Entretanto, a subjetividade da sensação dolorosa está vinculada com o aspecto comportamental. Isso ocorre porque a informação nociceptiva atinge não apenas regiões do sistema somatossensorial, mas também o sistema límbico (Millan, 1999; Byers & Bonica, 2001).

Os receptores envolvidos na detecção do estímulo doloroso são chamados de nociceptores. Esses receptores são terminações nervosas livres de alto limiar, sendo ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos intensos. As fibras nervosas que transmitem a mensagem nociceptiva ao sistema nervoso central (SNC) são fibras mielinizadas de pequeno calibre (fibras A delta) e fibras não-mielinizadas (fibras C). Os corpos celulares desses neurônios localizam-se nos gânglios das raízes dorsais, que são conjuntos de neurônios sensoriais situados póstero-lateralmente à medula espinal. Essa organização anatômica refere-se à informação nociceptiva proveniente da pele e dos músculos do tronco e dos membros. As fibras desses neurônios projetam-se a partir da periferia do corpo em direção ao corno dorsal da medula espinal. Portanto, a medula espinal representa o centro de processamento primário da informação nociceptiva. A percepção da

informação dolorosa ocorre quando esta alcança o córtex somatossensorial. Porém, antes de atingir as áreas corticais, a informação sensorial nociceptiva é projetada para o tálamo. Essa via, proveniente da medula espinal, que ascende pelo sistema nervoso até o tálamo, é chamada de via espinotalâmica (Figura 1), e representa a principal via relacionada à condução e transmissão da informação dolorosa (Millan, 1999; Costigan et al., 2006).

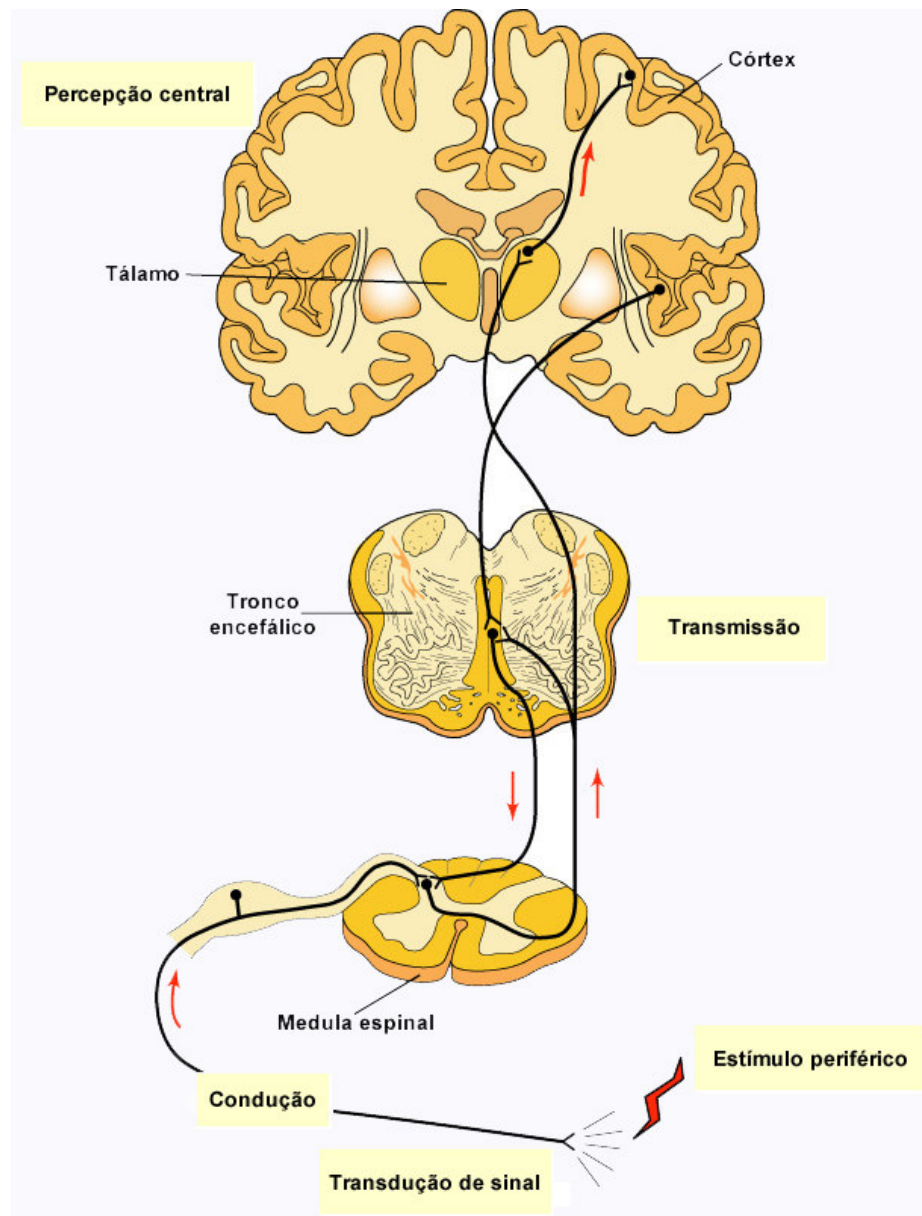


Figura 1. Representação da via espinotalâmica, a principal via ascendente que conduz a informação nociceptiva (Costigan et al., 2006).

A estimulação nociva ao tecido intacto causa uma dor considerada fisiológica devido ao seu caráter protetor, a qual ativa o reflexo de retirada e impede lesão adicional. A dor patológica é gerada quando o tecido é inflamado ou sofre uma lesão. Nesse caso, ocorrem os mecanismos de sensibilização periférica e central. Esses mecanismos envolvem a liberação de mediadores químicos no local da lesão e nas regiões do SNC relacionadas, o que intensifica a transmissão nociceptiva. A partir da sensibilização podem surgir alterações sensoriais características da dor patológica que são observadas através da existência de hiperalgesia e alodínia. A hiperalgesia é definida como um aumento da sensibilidade aos estímulos potencialmente nocivos, enquanto que a alodínia representa uma resposta dolorosa a estímulos considerados inócuos (Millan, 1999)

A compreensão dos mecanismos envolvidos na nocicepção torna possível o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o alívio da dor. Por isso, esse tema é foco de estudo de diversos pesquisadores. Porém, apesar do grande número de publicações e do grande conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos relacionados à nocicepção, ainda existem muitas questões sem resposta, especialmente em relação ao tratamento de casos clínicos de dor crônica (Cruccu, 2007; Vanotti et al., 2007; Wu et al., 2007).

O objetivo principal da pesquisa científica certamente é proporcionar melhora na qualidade de vida dos indivíduos. Porém, nem sempre a aplicação de estudos em seres humanos é a abordagem mais adequada. Por isso, modelos animais são amplamente utilizados nos estudos sobre a nocicepção. Embora não possuam capacidade de comunicação verbal, quando em contato com estímulos nocivos, os animais exibem respostas motoras similares aos humanos. Tais respostas permitem inferir sobre a existência de dor (Dubner, 1983; Kavaliers, 1988). A hiperalgesia e a alodínia são exemplos dessas respostas, ou seja, são alterações sensoriais observadas após a indução de dor em várias

condições experimentais, e representam ativação das vias nociceptivas (Millan, 1999; Schaible & Richter, 2004).

Entre as diversas abordagens experimentais para o estudo da nocicepção, podem ser citadas a lesão nervosa periférica e a indução de trauma tecidual ou processos inflamatórios locais. A primeira pode causar dor neuropática severa (Sommer & Myers, 1995; Zimmermann, 2001). A dor neuropática, por sua vez, é definida como a dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso (Merskey & Bogduk, 1994). Assim, os modelos nos quais os animais são submetidos a situações que comprovadamente resultam em dor neuropática são utilizados para o estudo dos mecanismos e da fisiopatologia da nocicepção. Os modelos animais de dor neuropática mais empregados são a transecção nervosa completa ou parcial e ainda a lesão por constrição crônica. Nos primeiros, a secção é realizada em todos os fascículos nervosos ou em parte deles, já no segundo, o nervo é comprimido, porém não seccionado (Zimmermann, 2001).

Está demonstrado que a secção do nervo ciático resulta em alterações neuroquímicas e neuroanatômicas importantes nos neurônios sensoriais primários, bem como em seus territórios de projeção central (Zimmermann, 2001; Campbell & Meyer, 2006). Os mecanismos periféricos de dor neuropática envolvem o disparo de descargas ectópicas pelas fibras nervosas lesadas. Essa atividade elétrica alterada ocorre não apenas nas fibras que conduzem a informação nociceptiva, as fibras C e A delta, mas também nas fibras do tipo A beta, que em situações fisiológicas conduzem informações referentes à sensibilidade mecânica inócua. As hipóteses que justificam essas descargas ectópicas após lesão nervosa incluem: a alteração na expressão de canais iônicos nas fibras nervosas danificadas, e também nos corpos celulares no gânglio da raiz dorsal; e ainda, a liberação

de mediadores inflamatórios no local da lesão, tais como bradicinina e a serotonina, os quais ativam e/ou sensibilizam os neurônios aferentes primários (Zimmermann, 2001; Schaible & Richter, 2004).

Assim, a transmissão da informação nociceptiva é gerada pela alteração na excitabilidade dos terminais sensoriais. Porém, ao longo do tempo, outras regiões do neurônio sensorial primário, e mesmo células pós-sinápticas do corno dorsal, ou de ordem superior, podem contribuir para a fisiopatologia da dor neuropática. Essas alterações no SNC ocorrem devido ao fenômeno de sensibilização central e estão envolvidas nos estados anormais de dor, subseqüentes à lesão nervosa, que são característicos da dor neuropática, como a hiperalgesia e a alodínia (Woolf, 1983; Millan, 1999; Zimmermann, 2001).

De uma forma geral, os eventos modulatórios da transmissão nociceptiva, e as alterações geradas pela sensibilização central, ocorrem primariamente no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico e, secundariamente, em centros talâmicos e estruturas corticolímbicas. Entretanto, sob certas condições patológicas como lesão nervosa periférica ou dano ao SNC, a dor pode ser produzida por centros mais superiores, independentemente das terminações nervosas sensoriais periféricas (Millan, 1999; Zimmermann, 2001).

A sensibilização central ocorre devido ao aumento na resposta das células do corno dorsal espinal aos estímulos aferentes. Esse fenômeno envolve os neurônios que recebem as aferências da região lesada e também de áreas intactas adjacentes, ou seja, ocorre um aumento dos campos receptivos espinais (Figura 2). A sensibilização dos neurônios que recebem aferências da região afetada origina a hiperalgesia primária, enquanto que a maior sensibilidade nas áreas íntegras adjacentes é chamada de hiperalgesia secundária (Schaible & Richter, 2004).

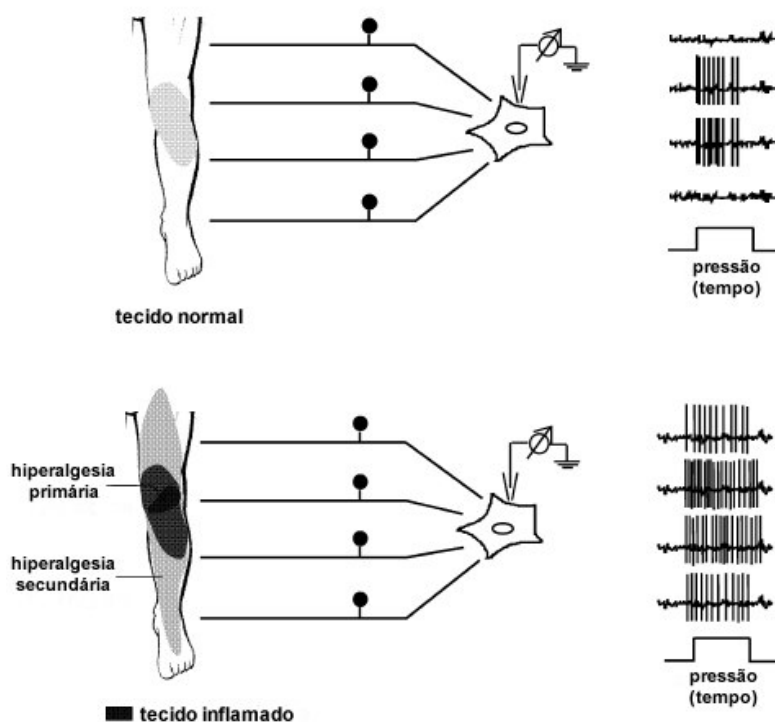


Figura 2: Sensibilização central em um neurônio espinal. No tecido normal (acima), os potenciais de ação do neurônio sensorial (mostrados à direita) são ativados apenas pela pressão sobre seu campo receptivo (área sombreada), mas não pela pressão sobre a região adjacente. Durante a inflamação, a estimulação do campo receptivo (abaixo) da área inflamada provoca uma resposta mais forte. Essa resposta também é causada pela estimulação sobre a área adjacente, criando uma zona de hiperálgia secundária (Schaible & Richter, 2004).

Diversos neurotransmissores participam do processamento nociceptivo. Dentre essa grande diversidade de moléculas, glutamato e substância P exercem efeitos importantes na iniciação dos mecanismos de sensibilização central. Quando estimulados, os neurônios aferentes primários nociceptivos liberam esses neurotransmissores no corno dorsal espinal, os quais ocasionam efeitos excitatórios nos neurônios de segunda ordem da via nociceptiva (Byers & Bonica, 2001).

O glutamato liga-se a diversos tipos de receptores pós-sinápticos, porém muitos estudos demonstram que a ativação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) é

particularmente importante na sinalização nociceptiva (Haley et al., 1990;Coderre & Melzack, 1991; Woolf & Thompson, 1991; Ultenius et al., 2006). O receptor NMDA é um canal iônico que permite a passagem do íon cálcio, porém, em seu estado de inativação, o canal é bloqueado pelo íon magnésio. Para a ativação do receptor NMDA, além da presença de algum agonista, como o glutamato, é necessária uma corrente despolarizante no neurônio. Essa despolarização remove o íon magnésio que bloqueia o canal, promovendo influxo de cálcio e conseqüentemente uma despolarização mais intensa da célula pós-sináptica. O potencial excitatório pós-sináptico gerado pela ligação da substância P aos seus receptores nos neurônios nociceptivos do corno dorsal espinal é fundamental para o desbloqueio do receptor NMDA (Urban et al., 1994). Assim, substância P e glutamato apresentam efeitos sinérgicos na transmissão nociceptiva no corno dorsal.

Além disso, o influxo de cálcio resultante da ativação do receptor NMDA promove a ativação da óxido nítrico sintase (NOS), enzima importante na formação de óxido nítrico (NO). O NO é um gás que também interfere na neurotransmissão e conseqüentemente em muitos processos no SNC, dentre eles a nocicepção (Meller et al., 1992; Levy & Zochodne, 2004). O NO produzido em resposta à ativação dos receptores NMDA atua como um mensageiro retrógrado, pois pode difundir-se para os neurônios pré-sinápticos do corno dorsal, intensificando a liberação de neurotransmissores pelos terminais dos aferentes primários (Figura 3). Esses eventos representam um dos mecanismos de sensibilização central, que resultam em alodinia e hiperalgesia (Meller & Gebhart, 1993; Aimar et al., 1998; Vetter et al., 2001; Xu et al., 2007).

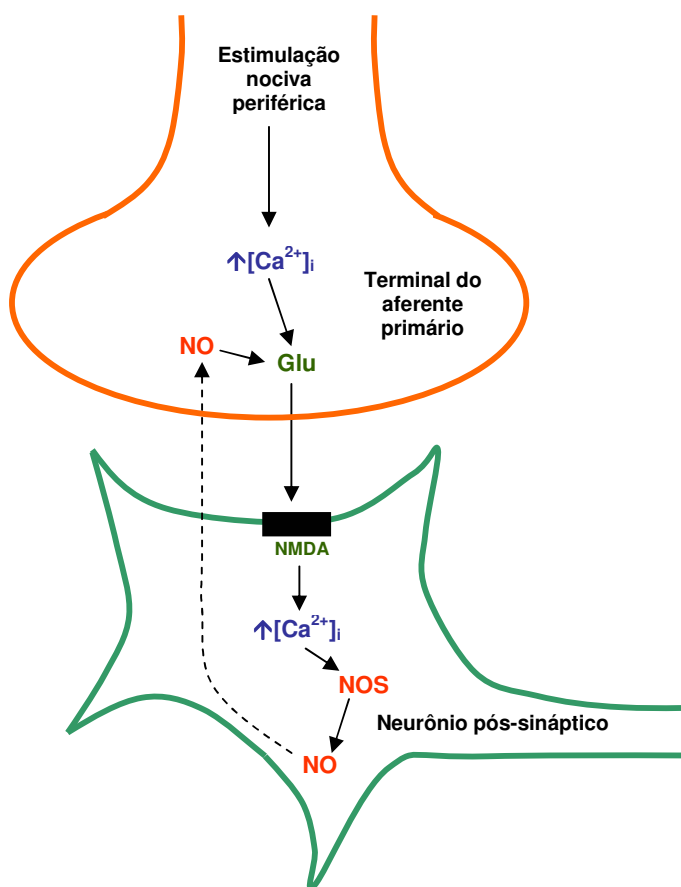


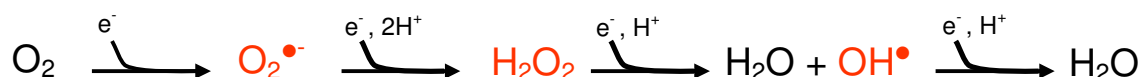
Figura 3: Diagrama esquemático ilustrando a produção de NO em resposta à ativação dos aferentes nociceptivos. O NO produzido nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal da medula espinal atua como mensageiro retrógrado nos aferentes primários, o que intensifica a liberação de glutamato.

Além dos circuitos neuronais, a ativação glial também parece estar envolvida nos mecanismos nociceptivos (Watkins et al., 2001). As células gliais, assim como os neurônios, apresentam receptores para substância P e glutamato, ou seja, também são ativadas em resposta à estimulação dos aferentes primários. Essa ativação glial determina a liberação de várias substâncias neuroativas que intensificam a sinalização nociceptiva, tais como interleucinas, fatores de crescimento, espécies ativas de oxigênio, prostaglandinas, NO e até mesmo aminoácidos excitatórios (Watkins & Maier, 2000; Scholz & Woolf, 2007). Além disso, após lesão nervosa periférica, ocorre ativação de cascatas de sinalização

intracelular em astrócitos e microglia na medula espinal. Essas cascatas envolvem proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), e a ativação dessas vias de sinalização nas células gliais está correlacionada com a hiperalgesia (Ji et al., 2006). Assim, o aumento da sensibilidade dolorosa, característico das neuropatias, e que é a expressão do fenômeno de sensibilização central na medula espinal, resulta de circuitos neuronais complexos e também da interação entre neurônios e células gliais.

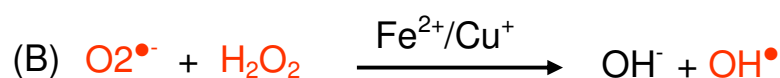
Espécies Ativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes

Os radicais livres são espécies químicas que contêm elétrons desemparelhados em sua configuração eletrônica, o que os torna altamente reativos e lesivos aos constituintes celulares. Essas moléculas podem ser formadas durante a atividade celular normal. A presença de oxigênio (O_2) é fundamental para o metabolismo energético celular da maioria dos organismos. Porém, sua estrutura eletrônica com dois elétrons desemparelhados, favorece a formação de intermediários metabólicos, as chamadas espécies ativas de oxigênio (EAO). Essas moléculas são potentes oxidantes e, assim, são responsáveis pela toxicidade do O_2 . O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são as EAO formadas durante a redução do oxigênio à água (Fridovich, 1998; Gabbita et al., 2000). A reação 1 mostra a formação dessas EAO.



Reação 1: Geração das EAO a partir da redução monovalente do O_2 à água. Durante esse processo o O_2 recebe um elétron por vez.

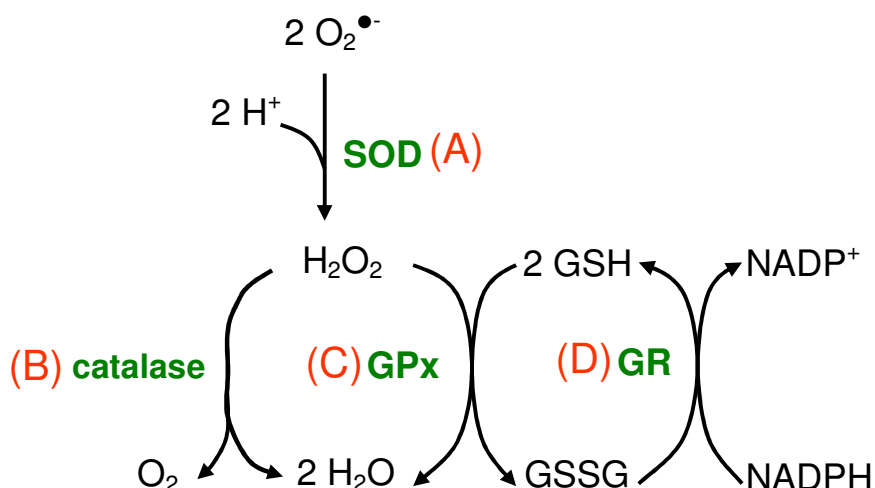
Os radicais livres podem reagir com qualquer molécula biológica, abstraindo elétrons e gerando novos radicais livres. O radical hidroxil é a EAO com maior citotoxicidade, pois inicia as reações em cadeia que formam lipoperóxidos e radicais orgânicos, os quais são prejudiciais à atividade celular normal. O H_2O_2 não é um radical, por não possuir elétrons desemparelhados, mas é um agente oxidante, pois na presença de metais de transição essa EAO determina a formação do radical hidroxil, o que é representado pela reação de Fenton (reação 2A). O ânion superóxido, juntamente com o H_2O_2 , participa da formação do radical hidroxil através da reação de Haber-Weiss (reação 2B) (Fridovich, 1998).



Reação 2: (A) Reação de Fenton: a formação de OH^\bullet pela reação do H_2O_2 com o Fe^{2+} . (B) Reação de Haber-Weiss: o OH^\bullet é formado a partir de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 .

As EAO são amplamente citadas como moléculas envolvidas em diversos processos fisiológicos (Finkel & Holbrook, 2000), bem como na gênese de várias doenças devido aos danos ocasionados aos constituintes celulares (Cosentino & Katusic, 1995; Lerouet et al., 2002; Boll et al., 2003). Fisiologicamente deve haver um equilíbrio entre a produção de radicais livres e a atividade de sistemas de defesa antioxidante. Esses sistemas envolvem substâncias que combatem a toxicidade das EAO, as quais podem ser chamadas de *scavengers*. Existem componentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. Dentre os enzimáticos podem ser citadas a superóxido

dismutase (SOD), que dismuta o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (reação 3A), e a catalase e a glutaciona peroxidase (GPx), que reduzem o H_2O_2 à H_2O (reação 3B e 3C) (Fridovich, 1998; Valko et al., 2007).



Reação 3: (A) Formação de H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD). (B) Redução do H_2O_2 em H_2O pela catalase. (C) Redução do H_2O_2 à H_2O pela glutaciona peroxidase (GPx), o que resulta na formação de dissulfeto de glutaciona (GSSG) a partir da glutaciona reduzida (GSH). (D) Regeneração da GSSG em GSH pela glutaciona redutase (GR).

Um importante antioxidante não-enzimático presente nos tecidos é o tripeptídeo glutaciona (GSH). Além de sua ação direta sobre a detoxificação de EAO, a GSH também atua como substrato para outros antioxidantes enzimáticos, como por exemplo, para a GPx (reação 3C). Nessa reação, a GPx catalisa a redução do H_2O_2 através da oxidação da GSH, formando o dissulfeto de glutaciona (GSSG). Por isso, a razão GSH/GSSG é considerada um bom indicador de estresse oxidativo. A enzima glutaciona redutase (GR) participa da redução da GSSG a GSH (reação 3D) usando o NADPH como agente redutor (Valko et al., 2007). Outra enzima importante no combate ao estresse oxidativo é a glutaciona-S-transferase (GST) que participa da detoxificação de agentes eletrofílicos. Alguns

antioxidantes não-enzimáticos podem ser exemplificados pelo ácido ascórbico, vitamina E e flavonóides (Yu, 1994; Finkel & Holbrook, 2000).

Além das EAO, outros radicais livres também podem interferir nos processos fisiológicos celulares, como é o caso das espécies ativas de nitrogênio (EAN). O NO, além de participar da transmissão sináptica no SNC, apresenta efeitos citotóxicos, pois pode combinar-se com o ânion superóxido formando o peroxinitrito (ONOO^-), uma EAN altamente reativa que pode danificar diversos constituintes celulares (Radi et al., 2002).

Estresse Oxidativo, Estresse Nitrosativo e Processamento Nociceptivo

O estresse oxidativo ou o estresse nitrosativo ocorrem quando são evidenciados os efeitos nocivos das EAO e EAN, respectivamente, ou seja, quando as defesas apresentam-se reduzidas ou a produção dessas moléculas tóxicas torna-se demasiadamente aumentada. Nesses casos, ocorre dano a macromoléculas, tais como proteínas, DNA e lipídios (Fridovich, 1998; Valko et al., 2007).

O sistema nervoso apresenta características que o tornam particularmente suscetível ao estresse oxidativo. As altas concentrações de ferro em algumas regiões e o grande consumo de oxigênio são algumas dessas características. Além disso, o tecido nervoso é constituído de uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e, dessa forma, é alvo considerável da lipoperoxidação mediada por radicais livres. A lipoperoxidação consiste em reações em cadeia nas quais as moléculas orgânicas perdem um átomo de hidrogênio e um grupamento químico, alterando sua estrutura bioquímica (Warner et al., 2004; Dugan & Kim-Han, 2006). A própria lipoperoxidação já representa um mecanismo

direto de dano aos constituintes celulares, e seus produtos ainda podem comprometer a função de outros tipos de moléculas. Por exemplo, o 4-hidroxinonenal (HNE) é um aldeído citotóxico proveniente da lipoperoxidação. Esse aldeído pode reagir com o DNA e proteínas, prejudicando as funções dessas biomoléculas (Uchida, 2003). As repercussões da ação dos radicais livres incluem: ruptura da fita dupla e dano às bases nitrogenadas do DNA, provocando processos mutagênicos e carcinogênicos; alteração da fluidez e conseqüente ruptura das membranas celulares; e modificações pós-traducionais de proteínas, comprometendo suas funções fisiológicas (Valko et al., 2007).

As EAO e EAN também interferem no processamento da informação nociceptiva. A prevalência da dor neuropática, e de outras formas de dor crônica, é maior em indivíduos idosos, o que sugere que os processos fisiológicos do envelhecimento aumentam a sensibilidade dos neurônios sensoriais aos estímulos nocivos (Gagliese & Melzack, 1997). Além disso, a produção de radicais livres aumenta na senescência. A partir dessa relação, começou a ser especulado o papel do estresse oxidativo, e/ou nitrosativo, na modulação da atividade das vias nociceptivas (Tal, 1996; Khalil et al., 1999; Novak et al., 1999; Khalil & Khodr, 2001; Ma et al., 2001; Crisp et al., 2006).

A lesão nervosa periférica ocasiona a produção de mediadores inflamatórios locais, os quais contribuem com os sinais característicos deste tipo de trauma. A resposta inflamatória periférica é intensificada pelo aumento na produção de radicais livres no local da lesão, e este parece ser um dos mecanismos responsáveis pela intensificação da estimulação nociceptiva (Khalil et al., 1999; Khalil & Khodr, 2001). Assim, após lesão nervosa periférica, os oxidantes podem promover hiperalgesia por exacerbar o dano tecidual no local da lesão. Além disso, o tratamento antioxidante diminui a degeneração Walleriana no local da lesão (Wagner et al., 1998; Liu et al., 2000) e a resposta

hiperalgésica (Wagner et al., 1998; Liu et al., 2000, Khalil & Khodr, 2001; Kim et al., 2004; Crisp et al., 2006; Kim et al., 2006; Naik et al., 2006). Entretanto, a participação de mecanismos oxidativos não é limitada à região afetada, já que a injeção intratecal de vitamina E também reduz as alterações sensoriais após lesão nervosa periférica. Outro efeito do tratamento com a vitamina E é a diminuição da fosforilação de uma subunidade do receptor NMDA no corno dorsal espinal, o que sugere o envolvimento de radicais livres na sensibilização central (Kim et al., 2006).

Portanto, muitos estudos apresentam uma correlação entre os radicais livres e as respostas comportamentais encontradas após lesão nervosa. Entretanto, a maior parte desses estudos utilizou tratamento antioxidante sistêmico e avaliou a atividade de radicais livres periféricamente (Wagner et al., 1998; Khalil et al., 1999; Liu et al., 2000; Khalil & Khodr, 2001; Naik et al., 2006). Porém, sabe-se que os mecanismos de hiperalgesia não se limitam à região periférica afetada, mas são determinados, principalmente, por alterações na excitabilidade de células do corno dorsal espinal (Woolf, 1983). Portanto, a partir disso, justifica-se a realização de estudos acerca do papel de radicais livres que envolvam não apenas a periferia, mas também a região espinal relacionada, bem como o gânglio da raiz dorsal correspondente.

Em modelos experimentais de dor, tanto por lesões neuropáticas, como pela injeção de agentes pró-nociceptivos, também foi demonstrado um aumento na produção de EAO nas regiões do SNC relacionadas à transmissão da informação nociceptiva, bem como a reversão dos sinais nociceptivos com o tratamento com antioxidantes (Viggiano et al., 2005; Lee et al., 2007).

Sabe-se que as EAO exercem importantes efeitos sobre a neurotransmissão no SNC. Sah e colaboradores (2002) demonstraram que os receptores gabaérgicos hipocâmpais são

inativados pela presença de EAO, o que provoca um aumento geral na excitabilidade neuronal, podendo acarretar dano celular. Receptores localizados nos neurônios sensoriais relacionados com a transmissão nociceptiva também podem ser modulados pelas condições oxidativas do meio. O receptor glutamatérgico NMDA apresenta um sítio modulatório controlado pelo estado redox da célula, o que interfere diretamente na função do receptor e no surgimento de comportamentos nociceptivos (Laughlin et al., 1998). Além disso, canais de cálcio do tipo T, os quais são ativados por baixa voltagem, são encontrados em neurônios sensoriais, onde medeiam a sensibilidade dolorosa. Alterações do estado redox também exercem efeitos modulatórios sobre a função desses canais, controlando a excitabilidade celular (Todorovic et al., 2001). Assim, o fluxo da informação nociceptiva no SNC pode ser modificado pelo estado redox celular.

Em relação ao NO, sua participação nos mecanismos nociceptivos é bem estabelecida, como comentado anteriormente (Aimar et al., 1998; Cizkova et al., 2002; Filogamo et al., 2002, Levy & Zochodne, 2004). Dessa forma, o aumento da sua síntese decorrente da estimulação nociceptiva predispõe a uma maior formação de peroxinitrito, a principal EAN (Liu et al., 2000). Foi demonstrado que após indução de dor inflamatória ocorre aumento da produção de peroxinitrito na periferia e na região correspondente da medula espinal. A presença do peroxinitrito foi associada à nitração de proteínas, e dentre as proteínas nitradas, foi identificada a SOD. Assim, a nitração e a subsequente inativação da SOD provoca uma maior disponibilidade do ânion superóxido, contribuindo para a formação adicional de peroxinitrito. Esses eventos provocam aumento na excitabilidade dos neurônios de segunda ordem do corno dorsal espinal, o que contribui para a persistência dos sinais nociceptivos (Wang et al., 2004). A partir disso, pode-se afirmar que o estresse nitrosativo também exerce influências importantes sobre o processamento nociceptivo.

Além da ação direta das EAO e EAN, os produtos finais da oxidação também podem interferir na transmissão da dor. Um exemplo é o HNE, composto produzido a partir da lipoperoxidação. O HNE ativa os mesmos nociceptores estimulados por substâncias irritantes, determinando o desenvolvimento de hipersensibilidade. O papel desse aldeído reativo na nocicepção também pode ser enfatizado por seu efeito estimulatório sobre a liberação de neuropeptídeos pró-nociceptivos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (Trevisani et al., 2007).

No entanto, além do papel potencialmente lesivo das EAO e EAN sobre os constituintes celulares, essas moléculas também desempenham funções como sinalizadoras intracelulares. Esse papel dos radicais livres envolve uma visão mais abrangente da importância desses compostos nos processos biológicos. Sua geração, dentro de certos limites, pode ser essencial para a manutenção da homeostase, pois as EAO e EAN podem interferir positivamente em mecanismos de defesa e também na regulação de processos proliferativos (Dröge, 2002).

Em geral, as vias de transdução de sinal são ativadas por sinais extracelulares como hormônios, fatores de crescimento, citocinas ou neurotransmissores, os quais determinam a produção de EAO. Os radicais livres, por sua vez, atuam como sinalizadores intracelulares, ativando fatores de transcrição e, assim, interferindo na expressão gênica. Essa relação entre EAO e cascatas de transdução de sinal pode ser decorrente das alterações no estado redox celular ou da oxidação de proteínas (Dröge, 2002; Valko et al., 2007).

Vias de Sinalização Intracelular e Dor

Nos últimos anos, a participação de cascatas de transdução de sinal na modulação de muitos processos celulares tem sido amplamente estudada. Os mecanismos de transdução de sinal envolvem interações entre proteínas específicas em uma ordem determinada, assim ocorrem cascatas de reações intracelulares, principalmente através da fosforilação e desfosforilação de muitas dessas proteínas. A ativação dessas vias pode determinar sobrevivência ou apoptose da célula (Frebel & Wiese, 2006; Manning & Cantley, 2007).

Quanto à nocicepção, muitas das descobertas recentes sobre sua modulação estão vinculadas à ativação dessas vias (Yang et al., 2004; Hucho & Levine, 2007). A maioria desses estudos demonstra o envolvimento das MAPKs no processamento nociceptivo (Sammons et al., 2000; Ji et al., 2002; Dai et al., 2002; Obata & Noguchi, 2004; Guo et al., 2007). As MAPKs são uma família de moléculas que transduzem uma ampla gama de estímulos extracelulares em diversas respostas intracelulares, por interferir na transcrição de genes e também na modificação pós-traducional de proteínas alvo (Seger & Krebs, 1995). Diversos estudos relatam que a estimulação nociva causa ativação da proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), uma classe de MAPK, em neurônios do corno dorsal espinal (Dai et al., 2002; Guo et al., 2007). Já sua inibição provoca diminuição da hiperalgesia (Ji et al., 2002). A ativação da ERK ocorre poucos minutos após a aplicação do estímulo nocivo, o que pode estar relacionado com as alterações pós-traducionais imediatas, como a fosforilação de receptores e de canais de membrana, que ocorrem em resposta à indução da dor, causando um aumento na excitabilidade neuronal (Ji et al.,

1999). Porém, a ERK também parece estar envolvida em alterações transcricionais, pois sua forma fosforilada foi encontrada no núcleo de neurônios do corno dorsal espinal após a indução de inflamação. Nessa condição, a ERK pode modular a expressão dos genes da prodinorfina (um precursor do opióide endógeno dinorfina) e do receptor neuroquinina-1 (o receptor ao qual a substância P se liga), pois um inibidor da ERK também inibe a expressão desses genes (Ji et al., 2002).

Outra importante proteína de sinalização intracelular é a Akt, também chamada de proteína cinase B. A Akt é uma serina/treonina cinase envolvida em diversas vias de transdução de sinal, participando de muitos efeitos biológicos que induzem a sobrevivência celular. A Akt é ativada por vários estímulos, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios (Kim & Chung, 2002; Manning & Cantley, 2007).

A ativação da Akt é um processo que envolve várias etapas e proteínas adicionais. A ativação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) por fatores de crescimento resulta em um aumento do PIP3 (fosfatidilinositol-trifosfato), que leva à translocação da Akt para a membrana causando uma modificação conformacional que permite que as cinases dependentes de fosfoinosítídeos-1 e 2 (PDK1 e PDK2) fosforilem os resíduos Ser-473 e Thr-308, ativando totalmente a Akt. A forma desfosforilada da Akt é praticamente inativa, sendo que a fosforilação de ambos os resíduos resulta em um aumento de mais de 1000 vezes na atividade da proteína (Alessi & Cohen, 1998; Chan & Tschlis, 2001).

A Akt é responsável pela fosforilação de vários substratos citosólicos e nucleares que regulam o metabolismo e o crescimento celular. Durante a sinalização da insulina, a Akt fosforila a GSK-3 (glicogênio sintase cinase 3), fosfofrutocinase-2 e mTOR (*mammalian target of rapamycin*) para induzir glicogênese e síntese protéica, enquanto a

fosforilação de proteínas que regulam a apoptose como Bad e caspase-9, promove proliferação e sobrevivência (Figura 4) (Datta et al., 1999).

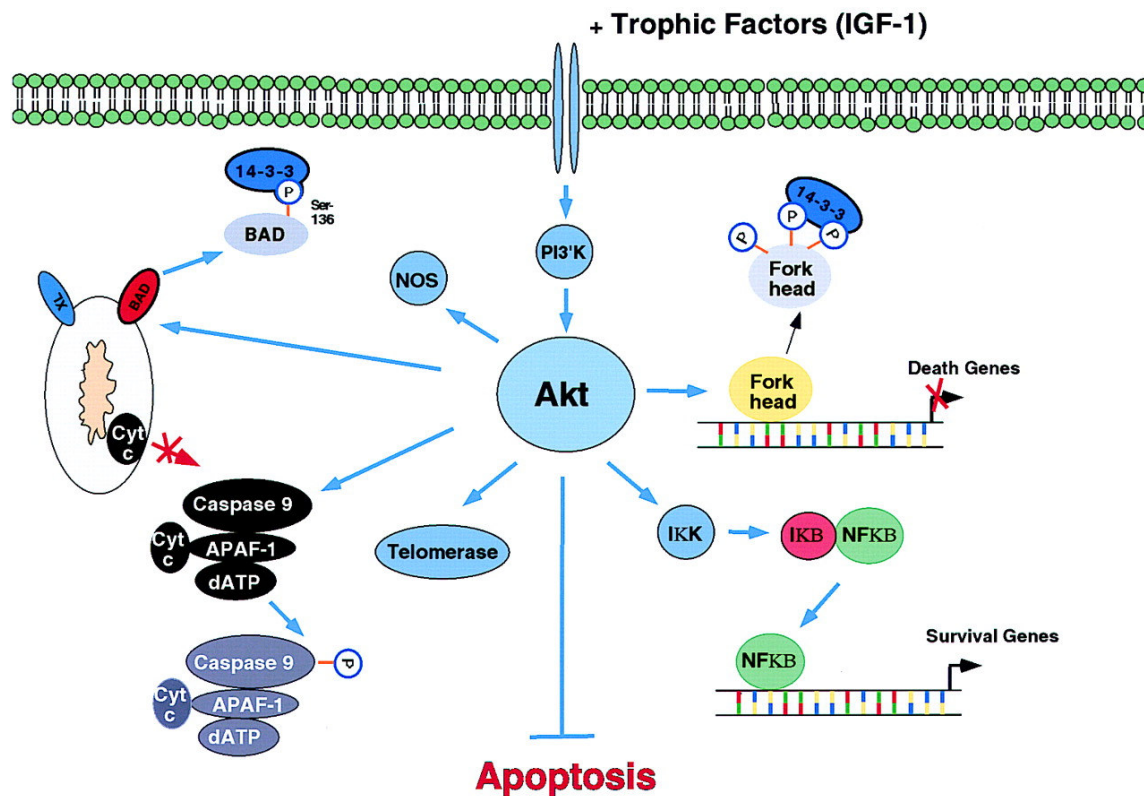


Figura 4: O papel da Akt na regulação da sobrevivência celular pela fosforilação de múltiplos substratos envolvidos na regulação da apoptose. A Akt regula a atividade transcricional dos membros da família *Forkhead* e NF-κB através da fosforilação e inativação da caspase-9 e Bad. Além disso, outros alvos da Akt, incluindo telomerase e NOS podem exercer importantes papéis na sobrevivência celular (Datta et al., 1999).

Além do papel bem estabelecido da Akt sobre a inibição da apoptose, estudos recentes demonstram seu envolvimento em eventos relacionados com plasticidade sináptica (Lei et al., 2007; Peineau et al., 2007; Tohda et al., 2007). Wang e colaboradores (2003) observaram que a Akt aumenta o número de receptores gabaérgicos em neurônios, o que amplifica a ação do GABA no sistema nervoso. Esse achado pode sugerir o papel da Akt no processamento nociceptivo, já que o GABA é um importante neurotransmissor relacionado

à transmissão da informação dolorosa. Além disso, após lesão nervosa periférica e injeção de capsaicina ocorre ativação da via da Akt no corno dorsal espinal e em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (Sun et al., 2007; Xu et al., 2007). Um dos prováveis mecanismos de ativação da Akt, e de outras moléculas de sinalização intracelular, em decorrência de estimulação nociva, é pela ativação dos receptores tirosina cinase A (TrkA) especialmente pelo fator de crescimento nervoso, o NGF (Bonnington & McNaughton, 2003; Malik-Hall et al., 2005). A ligação do NGF ao receptor TrkA causa a ativação da PI3K, que por sua vez fosforila a Akt, o que está relacionado com a hiperalgesia (Malik-Hall et al., 2005).

Entretanto, os sinais exatos que podem ativar a Akt durante a transmissão nociceptiva não são conhecidos. Em neurônios corticais foi demonstrado que o aumento nas EAO pode inibir a via PI3K/Akt, o que aumenta a suscetibilidade à morte celular (Taylor et al., 2005). Além disso, tratamento antioxidante evita o dano neuronal induzido pelo H₂O₂ através da modulação de vias de sinalização, especialmente da via da Akt (Vauzour et al., 2007). Assim, parece existir uma interrelação entre EAO e ativação da Akt. Apesar de não existirem estudos que demonstrem claramente essa relação, é possível que o processamento da informação nociceptiva esteja vinculado a essas vias. A compreensão desses aspectos é fundamental para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas que minimizem os padrões patológicos de sensibilidade resultantes de lesão nervosa ou inflamatória. Esses padrões estão associados aos estados de dor crônica, os quais encontram grande dificuldade no manejo terapêutico. Como as vias de sinalização apresentam muitas etapas, isso fornece possibilidade da geração de estratégias farmacológicas mais diversificadas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos temporais da secção do nervo ciático, um modelo de dor neuropática, sobre marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, de defesas antioxidantes e da ativação da Akt na medula espinal lombossacral de ratos.

Objetivos Específicos

- Estabelecer se a secção do nervo ciático provoca hiperalgesia térmica nos ratos submetidos à secção do nervo ciático através da aplicação do teste da placa quente.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase, GPx e GST, e o conteúdo de glutatona.
- Determinar, através de Western blot, a expressão das enzimas antioxidantes SOD e catalase; da NOS neuronal (nNOS); de proteínas modificadas pelo HNE; e da Akt em sua forma total e fosforilada.
- Realizar a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinação de lipoperoxidação.

- Detectar a produção de metabólitos do NO (NO_x), através da medida de nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻).
- Medir a concentração de H₂O₂ na medula espinal lombossacral de ratos machos adultos 1, 3, 7 e 15 dias após a secção do nervo ciático.

RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram divididos em três artigos científicos, os quais compõem a seção de resultados desta tese.

Artigo 1: Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord

(Neurochemical Research 31:603-609, 2006)

processes and the concentration of these compounds is controlled by the antioxidant system that involves numerous non-enzymatic molecules and enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase. Cells express two SOD isoforms, a cytoplasmic CuZnSOD and a mitochondrial MnSOD, and both isoforms convert superoxide, formed from the molecular oxygen, to hydrogen peroxide. Catalase is located in peroxisomes and converts hydrogen peroxide into water. When the ROS production is greater than the antioxidant system activity there is oxidative stress and cellular damage may occur [9, 10].

Oxidative stress has been implicated in several pathologies, including central nervous system (CNS) disorders. In the spinal cord, amyotrophic lateral sclerosis, a neurodegenerative disease affecting motor neurons, is associated with a mutation in the gene encoding CuZnSOD [11]. In spinal cord injury alterations in the antioxidant system have been detected [12], and the inflammatory process is related to oxidative stress at spinal cord [8]. Some works describe changes in antioxidant system after axotomy [13–15]. Peripheral nerve transection increases MnSOD in adult [13] but not in neonatal rats, which show decreased CuZnSOD [15]. However, the direct relationship among ROS, axotomy and neuropathic pain has not been studied. Therefore, the current study was designed to show the probable association between hyperalgesia evoked by neuropathic pain and alterations in activity and expression of antioxidant enzymes SOD and catalase, both involved in primary defense against oxidative damage.

Experimental procedure

Animals

Experiments were conducted in adult male Wistar rats weighing 200–250 g. All animal procedures were approved by the Ethics Committee of the Instituto de Ciências Básicas da Saúde of the Federal University of Rio Grande do Sul. Under anaesthesia (ketamine 80 mg/Kg and xylazine 2 mg/Kg) and sterile conditions, the right sciatic nerve was exposed and transected at mid thigh level. In order to expose the sciatic nerve in sham rats all surgical procedures involved in the experimental group were used except transection. For further comparisons a naïve group was included in which the animals did not undergo surgical manipulation. Groups of five animals were sacrificed after 0, 3, 7 and 15 days.

Hot plate test

Thermal hyperalgesia was measured by placing the rats on a hot plate maintained at 50°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). The withdrawal

latency was considered when the animal jumped or licked a hindpaw, independently of side. A cutoff time of 30s was employed to prevent tissue injury. The hot plate test was performed on different days using different animals. For each period (3, 7 and 15 days after injury) different naïve rats were tested.

Preparation of tissue samples

Rats were killed by decapitation and their lumbosacral spinal cords were promptly dissected out. The tissues were immediately cooled in ice and homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1mmol/l PMSF. The homogenates were centrifuged at 800 x g for 20 min to discard nuclei and cell debris and the supernatant fraction obtained was frozen at -70°C for further measurements.

Antioxidant enzyme activities

Catalase activity was determined by following the decrease in absorption at 240 nm in a reaction medium containing 50 mmol/l phosphate buffer (pH 7.2) and 10 mmol/l hydrogen peroxide (H_2O_2) [16] and expressed as pmol of H_2O_2 reduced per minute per mg protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as U/mg protein, was based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol [17]. The SOD activity was determined by measuring the velocity of oxidized pyrogallol formation at 420 nm for 2 min. The reaction medium contained tris buffer (50 mmol/l, pH = 8.2), pyrogallol (24 mmol/l) and catalase (30 mmol/l).

Lipid peroxidation measurement

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement was used to evaluate lipid peroxidation (LPO). For this assay, trichloroacetic acid (10%) was added to the homogenate to precipitate proteins and to acidify the sample [18]. This mixture was then centrifuged (3 min, 1000 g). The protein-free sample was extracted and thiobarbituric acid (0.67%) was added to the reaction medium. The samples and standards were placed in a water bath (100°C, 15 min). Malondialdehyde (MDA), an intermediate product of lipoperoxidation, was determined by the absorbance at 535 nm and the results are reported as nmol/mg protein.

Western blot

Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (12%) was carried out using a miniprotein system (Bio-Rad, Hercules, CA) with full range rainbow (Amersham). Protein (16 μg) was loaded in each lane with loading buffer containing 0.375mol/l Tris (pH 6.8), 50%

glycerol, 10% SDS, 0.5 mol/l mercaptoethanol, and 0.002% bromophenol blue. Samples were heated at 100°C for 2 min prior to gel loading. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham) using an electrophoretic transfer system at 110V for 1 h. The membranes were then washed with TTBS (20 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5; 150 mmol/l NaCl; 0.05% Tween-20, pH 7.4) and 8% nonfat dry milk for 1 h. The membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in TTBS plus BSA. Rabbit polyclonal antibodies for CuZnSOD (1:1000, Chemicon International) and for catalase (1:1000, Chemicon International) were used as primary antibodies. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with secondary antibody (1:1000, anti-rabbit IgG peroxidase conjugated; Santa Cruz), washed with TBS (20 mmol/l Tris-HCl; 150 mM NaCl, pH 7.5) and revealed by chemiluminescence followed by apposition of the membranes to autoradiographic films. These films were analyzed using the Molecular Dynamics Image Quant software version 3.22 (computing densitometer model 300 A). The results were expressed as mean % of pixels. The correction of the amount of protein per lane transfer was made by Ponceau's method [19].

Protein measurement

Protein was measured by the method of Bradford [20], using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Enzyme activities, TBARS and Western blot results were compared by one-way ANOVA followed by Student Newman Keuls post hoc multiple comparison test. The differences in latency measured in hot plate test were analyzed by Kruskal–Wallis nonparametric test followed by post hoc Dunn's method. Differences were considered statistically significant when the *P* value was <0.05. All statistical analysis was carried out with Sigma Stat 2.0 software.

Results

Thermal hyperalgesia

Three days after sciatic nerve transection (SNT) the animals showed thermal hyperalgesia as demonstrated by the hot plate test (Fig. 1A). At day 3 postoperatively, withdrawal latency was significantly decreased in SNT animals as compared to naïve ones but was similar as compared to sham-operated animals. At day 7 postoperatively there was a

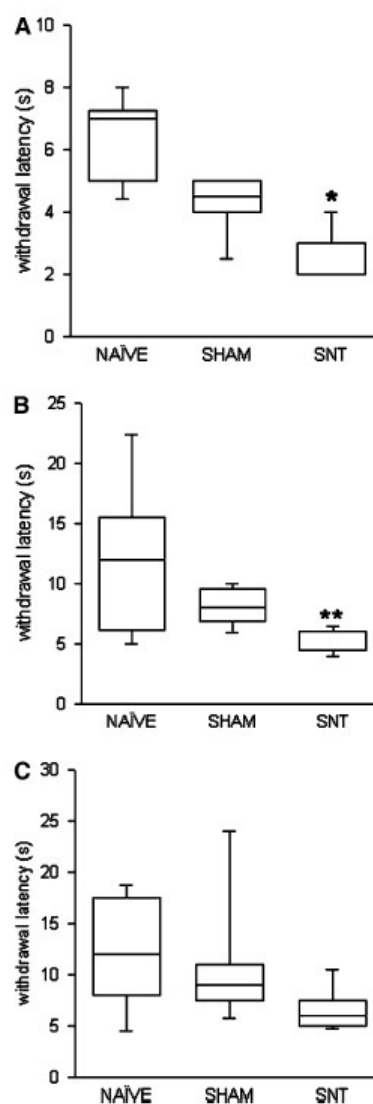


Fig. 1 Thermal hyperalgesia measured by withdrawal latency (in seconds) in naïve, sham-operated and SNT rats at 3 (A), 7 (B) and 15 (C) days after surgery. Data are expressed as medians and errors are expressed as interquartile range 25–75% ($n = 5$ for each group). One asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) between SNT and naïve animals, and two asterisks represent significant difference ($p < 0.05$) between SNT and naïve and between SNT and sham-operated animals

significant decrease in SNT animals as compared to both naïve and sham animals (Fig. 1B). Fifteen days after surgery there was no significant difference across the groups (Fig. 1C).

Antioxidant enzyme activities and Western blot

There was no significant difference in SOD and catalase content as determined by the Western blot analysis

(Fig. 2). The comparisons were made between naïve, sham-operated and SNT rats at the various postsurgical times. Representative western blots are shown in the top of histograms on Fig. 2. However, a significant difference in enzyme activities was detected (Fig. 3). Three days after surgery, SNT and sham-operated animals showed a reduction of around 30% in the catalase activity as compared to the naïve group. There was no significant difference between sham-operated and SNT groups, demonstrating that catalase activity is affected not only by neuropathic pain but also by surgical manipulation. Seven days after surgery the reduction in the catalase activity in the sham-operated and SNT groups as compared to naïve animals was more pronounced (approximately 40%). Finally, fifteen days after surgery catalase activity was still reduced in sham-operated and SNT rats, but these differences were not significant ($P>0.05$). SOD activity showed a reduction of around 30% but only seven days after SNT, demonstrating a specific effect related to axotomy.

TBARS measurement

There was not a significant difference in spinal cord LPO between naïve, sham-operated and SNT rats at any postsurgical time, as evaluated by TBARS. These results suggest that neuropathic pain induction does not cause lipid peroxidation changes in the spinal cord. The TBARS results are demonstrated as nmol/mg protein in Fig. 4.

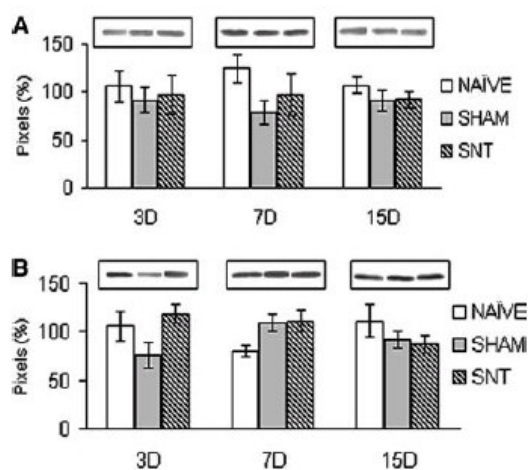


Fig. 2 Western blot analysis for catalase (A) and CuZnSOD (B) in spinal cord homogenates of naïve, sham-operated and SNT groups 3 (3D), 7 (7D) and 15 (15D) days after surgery. There was not any significant difference in these enzymes expression across all groups ($p>0.05$). Comparisons were drawn between the groups at the same postsurgical point in time. Representative Western blots are shown in the top of histograms. The results are expressed as percentages of pixels mean \pm SEM ($n = 5$ for each group)

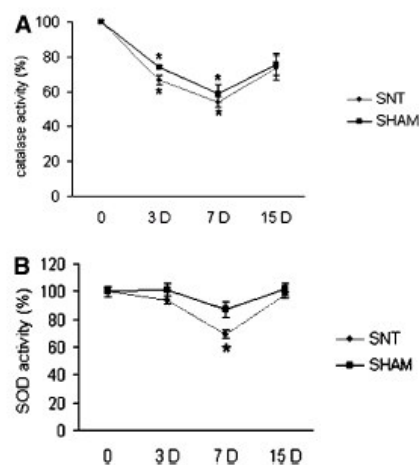


Fig. 3 Antioxidant activity of catalase (A) and SOD (B) in spinal cord homogenates in sham-operated and SNT rats 3, 7 and 15 days after surgery (0 = naïve rats). Data are expressed as percentage of naïve group. Asterisks indicate significant difference ($p<0.05$) between naïve (100%) and sham or SNT. About 100% of catalase activity corresponds to 43 pmol/mg of protein, and 100% of SOD activity corresponds to 71.75 USOD/mg of protein. Bars represent SEM ($n = 5$ for each group)

Discussion

The main finding in the present study was the reduction in SOD activity in the spinal cord at seven days after sciatic nerve transection. Moreover, catalase activity was also decreased at three and seven days, but this result was not specific to injury, since in sham animals the activity of this enzyme also decreased. Thus, catalase activity appears to be very susceptible to afferent stimulation. However, Western blot results showed that peripheral nerve injury do not alter the expression of these enzymes in the spinal cord.

Although the sham-operated group was not submitted to nerve transection, it suffered a slight injury due to skin

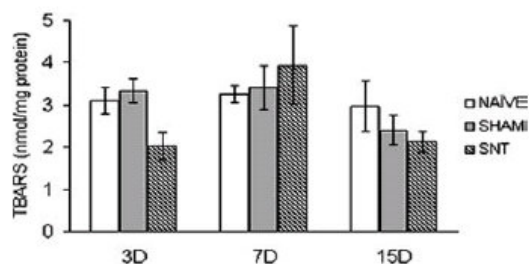


Fig. 4 Lipid peroxidation measured by thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in spinal cord homogenates of naïve, sham-operated and SNT groups 3, 7 and 15 days after surgery. There was not any significant difference between the groups ($p>0.05$). The comparisons were made between the groups at the same postsurgical time. TBARS values are expressed as nmol/mg of protein. Data represent the means \pm SEM ($n = 5$ for each group)

cutting and connective tissue lesion, which also cause an increase in spinal cord sensory inputs as evidenced by higher sensitization detected by hot plate test three days after injury. At seven days the withdrawal latency of sham rats was similar to the naïve group. This result suggests that in the sham group the sensibility had already returned to basal levels. On the other hand, SNT rats showed hyperalgesia in this period. Withdrawal latency at fifteen days in SNT suggests reversion of hyperalgesia, but we do not believe that the total reversion of symptoms occurs within 2 weeks. However, using the hot plate test we did not find a significant statistical difference at this period in time. This could be a limitation of this test. One example of limitation of the hot plate test is that it is impossible to establish which side supports less weight. It is likely that the rats support less weight on the injured side, but this cannot be measured with the test employed. Despite these limitations, this method is widely used in pain studies. Therefore, the variation in the latency period shown in Fig. 1 may be due to application of the test on different days since the sensibility of animals may change.

The changes in catalase activity occurred mainly at the same times at which hyperalgesia was detected. This may suggest some connection between catalase activity and the development of hyperalgesia. In this case there is an apparent role of antioxidant protection in normal sensibility, since the reduced catalase activity is associated with sensory behavioral abnormality. Three days after axotomy the decrease in catalase activity may be related to a higher conversion of hydrogen peroxide to hydroxyl radical, a very cytotoxic ROS. However, astrocytes in the central nervous system have a high antioxidant content, especially glutathione [21], and glutathione efflux has been observed to occur following acute exposure to nitric oxide (NO). Thus, astrocytes have the ability to provide neurons with glutathione or their precursors, conferring protection against neuronal oxidant damage by elevated neuronal antioxidant levels [22]. Therefore, it may be suggested that astrocytes provide neuroprotection to the central nervous system, and peripheral nerve injury probably does not cause a strong enough stimulus to deplete the antioxidant reserves in the spinal cord, and thus LPO increase was not observed.

Changes in spinal cord SOD activity were more limited and specific to SNT. A significant decrease in SOD activity was detected only on day 7 after axotomy, and at this time the concomitant reduction in catalase activity may be explained by the low hydrogen peroxide content, since the low SOD activity reduces the superoxide conversion to hydrogen peroxide and consequently causes superoxide accumulation.

Superoxide is a highly reactive free radical and may react with nitric oxide leading to the formation of a highly

toxic oxidant: peroxynitrite. Many studies have demonstrated that peripheral nerve injury causes up-regulation in both expression and activity of nitric oxide synthase (NOS), the enzyme involved in NO synthesis, in the spinal cord and dorsal root ganglia [23–25]. Zhang et al. [23] showed more marked NOS up-regulation seven days after injury. Therefore, during the same period of higher NO production there is a reduction in SOD activity and probably a higher concentration of peroxynitrite. The same events have been described in inflammatory pain: nociceptive inputs cause NMDA glutamate receptor activation and Ca^{++} influx in dorsal horn cells, leading to NOS activation; peroxynitrite formation causes nitration of proteins including MnSOD, which is inactivated and superoxide concentration becomes elevated maintaining hyperalgesia [8]. In neuropathic pain the same mechanisms may be occurring, since there is up-regulation in NOS [23–25] and SOD activity is reduced, as evidenced by the present study.

On the other hand, alteration in CuZnSOD protein content following SNT was not detected by Western blot, but previous studies have described an increase in MnSOD expression in the spinal cord after axotomy [13] and in the facial nucleus after facial nerve transection [26]. However, Yu [14] found a decrease in CuZnSOD immunoreactivity in the hypoglossal nucleus and spinal cord after injury to the hypoglossal and sciatic nerves, respectively, and this pattern occurred at the same time as an increase in NOS immunoreactivity in the same regions, demonstrating a close correlation between SOD and NO. In neonatal rats, sciatic nerve transection also causes a decrease in CuZnSOD in the lumbar spinal cord evidenced by Western blot [15]. Although the results of different studies are contradictory, it is likely that inactivated MnSOD has a more important role in hyperalgesia subsequent to peripheral nerve injury than the cytosolic isoform CuZnSOD does, since previous studies have demonstrated that the mitochondrial SOD has a neuroprotective effect against NO toxicity *in vitro*, and CuZnSOD does not present this effect [27].

However, antioxidant activity reduction is almost always accompanied by oxidative stress evidenced by damage to lipids, proteins and/or DNA. In the central nervous system damage to lipids is a very common event caused by oxidative stress due to the large amounts of polyunsaturated fatty acids. In this study, however, no alteration in lipid peroxidation was detected post axotomy as measured by the TBARS assay. In this situation other antioxidant defenses may protect lipids, and damage to other cellular constituents may be occurring. Neuropathic pain is related to an overexpression of many neurotransmitters, peptides and a large number of proteins [3], thus, in this case, the oxidative stress may involve proteins. Studies on damage to proteins and non-enzymatic antioxidant levels in the

spinal cord after peripheral nerve lesion are currently being conducted in our laboratory.

The involvement of reactive oxygen and nitrogen species in neuropathic pain is accepted, as antioxidant injection exerts an analgesic effect [7, 28]. Nevertheless, the site of action of these compounds is not well-established. Intrathecal and systemic administration show similar effects, and therefore the spinal cord seems to be a major site of antioxidant action [7]. Possibly reactive oxygen and nitrogen species activate second messengers related to central sensitization, a mechanism involving hyperalgesia perpetuation based on neurochemical adaptations in the spinal cord.

Recently it was demonstrated that trigeminal transmission of facial pain is modulated by ROS such as superoxide and hydrogen peroxide, because treatments with *N*-acetylcysteine (an antioxidant) and 2-methoxyestradiol (an inhibitor of SOD) in the trigeminal nucleus after formalin injection in the upper lip modifies the behavior of facial grooming, suggesting the role of ROS in the mechanisms of synaptic plasticity underlying tonic pain. The authors describe an increase in hydrogen peroxide production measured by microdialysis, and therefore hydrogen peroxide may be an important modulator of pain transmission [29].

However, the participation of ROS in pain transmission may not really be related to cellular damage, as evidenced by the present study, where no increase in lipid peroxidation in spinal cord post SNT was detected. Hydrogen peroxide affects intracellular activity of signaling molecules such as kinase and phosphatase proteins [30] or may act directly on neurotransmitter receptors and alter ligand-receptor interactions [31]. Loss of inhibitory input was detected in thalamocortical circuitry after hydrogen peroxide application generating seizure activity [32]. Maybe in neuropathic pain, ROS like hydrogen peroxide act as second messenger modulating neurotransmitter systems associated with nociceptive processing. Thus it may be suggested that the role of ROS in this situation is not related to cellular damage to lipids, but these molecules can be acting as second messengers that maintain hyperalgesia through activation of pain-related neurotransmitters.

In conclusion, oxygen and nitrogen species may take part in neuropathic pain processing as evidenced by the present study by SOD activity reduction seven days after nerve transection. However, the precise mechanisms that involve oxidative stress in pain transmission have not yet been well-established. Hence, further research on these topics is crucial due to the possibility of developing new strategies to pain treatment.

Acknowledgements This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Sommer C, Myers RR (1995) Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol* 90:478–485
- Zimmermann M (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23–37
- Millan JM (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1–164
- Byers MR, Bonica JJ (2001) Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman R, Turk DC (eds), *Bonica's management of pain*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 26–72
- Rydh-Rinder M, Holmberg K, Elfvin LG, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T (1996) Effects of peripheral axotomy on neuropeptides and nitric oxide synthase in dorsal root ganglia and spinal cord of the guinea pig: an immunohistochemical study. *Brain Res* 707:180–188
- Ma W, Bisby MA (1998) Partial and complete sciatic nerve injuries induce similar increases of neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide immunoreactivities in primary sensory neurons and their central projections. *Neuroscience* 86:1217–1234
- Kim HK, Park SK, Zhou JL, Taghialatela G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM (2004) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111:116–124
- Wang Z-Q, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini DA (2004) Newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309:869–878
- Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139–162
- Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203–1209
- Liochev SI, Fridovich I (2003) Mutant Cu,Zn superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: evaluation of oxidative hypotheses. *Free Radic Biol Med* 34:1383–1389
- Lee YS, Sindhu RK, Lin CY, Ehdai A, Lin VW, Vaziri ND (2004) Effects of nerve graft on nitric oxide synthase, NAD(P)H oxidase, and antioxidant enzymes in chronic spinal cord injury. *Free Radic Biol Med* 36:330–339
- Rosenfeld J, Cook S, James R (1997) Expression of superoxide dismutase following axotomy. *Exp Neurol* 147:37–47
- Yu WH (2002) Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with CuZn-superoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy. *Ann. N Y Acad Sci* 962:111–121
- Rogério F, Teixeira SA, de Rezende AC, de Sa RC, Queiroz L, De Nucci G, Muscara MN, Langone F (2005) Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment. *Brain Res Dev Brain Res* 154:217–225
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121–126
- Marklund SL (1985). Pyrogallol autooxidation. In: Greenwald RA (eds) *Handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press, Boca Raton, pp 243–247
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 52:302–309
- Klein D, Kern RM, Sokol RZ (1995) A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 36:59–66

20. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
21. Heales S, Lam A, Duncan A, Land J, (2004) Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res* 29:513–519
22. Gegg M, Beltran B, Salas-Pino S, Bolanos JP, Clark JB, Moncada S, Heales SJR (2003) Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem* 86:228–237
23. Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Bredt D, Synder SH, Hokfelt T (1993) Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335:563–575
24. Vizzard MA, Erdman SL, de Groat WC (1995) Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. *J Neurosci* 15:4033–4045
25. Cizkova D, Lukacova N, Marsala M, Marsala J (2002) Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Res Bull* 58:161–171
26. Yoneda T, Inagaki S, Hayashi Y, Nombra T, Takagi H (1992) Differential regulation of manganese and copper/zinc superoxide dismutases by the facial nerve transection. *Brain Res* 582:342–345
27. Gonzalez-Zulueta M, Ensz L, Mukhina G, Lebovitz R, Zwacka R, Engelhardt J, Oberley L, Dawson V, Dawson T (1998) Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 18:2040–2055
28. Khalil Z, Liu T, Helme RD (1999) Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain* 79:31–37
29. Viggiano A, Monda M, Viggiano A, Viggiano D, Viggiano E, Chiefari M, Aurilio C, De Luca B (2005) Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. *Brain Res* 1050:72–78
30. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J (2000) Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 53: PE1
31. Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD (2002) Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem* 80:383–391
32. Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Carlen PL (1998) Changes in membrane and synaptic properties of thalamocortical circuitry caused by hydrogen peroxide. *J Neurophysiol* 80:1317–1326

**Artigo 2: Sciatic nerve transection changes antioxidant activity and nNOS expression
in spinal cord**

(a ser submetido para Neuroscience Letters)

Sciatic nerve transection changes antioxidant activity and nNOS expression in spinal cord

Renata P. Guedes, Alex S. R. Araújo, Maria Helena Jacob, Adriane Belló-Klein, Maria Flávia M. Ribeiro, Wania A. Partata

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Address reprint requests to: Wania Partata, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3316 3305; Fax: +55 51 3316 3166; E-mail address: reguedes@yahoo.com.br.

Running title: Antioxidant activity and nNOS in axotomy

ABSTRACT

Oxidative and nitrosative stress have been suggested to be related to neuropathic pain, but the exact role of these molecules in pain conditions are still unknown. This study was developed to clarify some mechanisms of these aspects. Sciatic nerve transection (SNT) was employed to induce neuropathic pain in rats. It were determined glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) activities, glutathione (GSH) content, nitric oxide metabolites (NOx) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) protein expression in lumbosacral spinal cord. All of these analyses were performed in SNT and sham groups 1, 3, 7 and 15 days after surgery. There was an increase in GPx activity and a decrease in GSH content 3 days after surgery in both sham and SNT groups. nNOS expression was upregulated 7 days post SNT. NOx were detected 1 day after surgery in sham and SNT groups, but at 7 and 15 days, the increase was specific to SNT animals. These results support the participation of reactive nitrogen and oxygen species in pain physiology.

Key Words: glutathione, sciatic nerve transection, oxidative stress, nitrosative stress

Pain transmission is determined by neurochemical changes in the central nervous system, mainly in spinal cord (Woolf, 1983; Zimmermann, 2001). In the last years, studies considering reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems in nociceptive processing have emerged (Kim et al., 2004; Guedes et al., 2006; Gao et al., 2007). Antioxidant systems are crucial to provide defenses against oxidative cell damage. Glutathione (GSH) is one of the most abundant non-enzymatic antioxidants in all tissues. Their cell protective actions occur by different pathways including a role as substrate of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) (Valko et al., 2007). In pain studies, it was demonstrated a decrease in glutathione content (Naik et al., 2006) and an increase in the activities of GPx and glutathione reductase (GR) in sciatic nerve after chronic constriction injury, a model of neuropathic pain (Costa et al., 2007). However, there are no study that correlates glutathione content in spinal cord and neuropathic pain.

In addition, nitrosative stress, characterized by overproduction of reactive nitrogen species (RNS), is also referred to participate in pain modulation. Nitric oxide (NO) is a diffusible molecule that contains one unpaired electron and thus is a RNS. It is involved in a lot of physiological processes in central nervous system. In nociceptive transmission, NO is a mediator usually referred as pro-nociceptive (Levy and Zochodne, 2004; Xu et al., 2007). This effect possibly occurs by release of glutamate in spinal cord dorsal horn which activates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and NO production. NO produced in response to nociceptive stimulation acts as a retrograde messenger that enhances presynaptic activity, intensifying the pain signal (Meller and Gebhart, 1993; Yamamoto and Shimoyama, 1995). However, analgesic effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors are controversial. While some studies show that NOS inhibitors decrease hyperalgesia

(Salter et al., 1996; Osborne and Coderre, 1999), others demonstrate that these compounds have no effect in pain behaviors after injury (Luo et al., 1999).

Thus, due the existence of a correlation among antioxidants, ROS, RNS and pain, the aim of the present study was to establish the involvement of glutathione antioxidant system and NO in lumbosacral spinal cord in neuropathic pain using sciatic nerve transection (SNT) as experimental model.

Under intraperitoneal anaesthesia (ketamine 80 mg/kg and xylazine 2 mg/kg) and sterile conditions, the right sciatic nerve of male Wistar rats weighing 200-250 g, was exposed and transected at mid thigh level. In sham-operated animals, the right sciatic nerve was exposed but not transected. For further comparisons, a naïve group was included in which the animals do not undergo surgical manipulation. Groups of five animals were sacrificed 1, 3, 7 and 15 days after surgery. All animal procedures were approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

After animals decapitation, lumbosacral spinal cords were immediately cooled in liquid nitrogen and processed to the determination of glutathione (GSH) content, as previously described (Araujo et al., 2007). The results were expressed as nmol/mg protein.

In order to determinate GPx and GST activities and NO metabolites (NOx), rats were killed by decapitation and their lumbosacral spinal cords were promptly dissected out. The tissues were immediately cooled in ice and homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1mmol/l PMSF. The homogenates were centrifuged at 1000 x g for 20 minutes to discard nuclei and cell debris and the supernatant fraction obtained was frozen at -70°C for further measurements.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm as described by Flohé and Gunzler (1984). GPx results were expressed

as nmol of peroxide/hydroperoxide reduced/min/mg protein. Glutathione-S transferase (GST) activity, expressed as nmol/mg protein, was measured by the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm (Mannervik and Gluthenberg, 1981).

To NO_x measurement, nitrites (NO₂⁻) were determined using the Griess reagent, in which a chromophore with a strong absorbance at 540 nm is formed by reaction of nitrite with a mixture of naphthyl-ethylenediamine (0.1%) and sulphanilamide (1%). Nitrates (NO₃⁻) were determined as total nitrites (initial nitrite plus nitrite reduced from nitrate) after its reduction using nitrate reductase from *Aspergillus* species in the presence of NADPH. A standard curve was established with a set of serial dilutions (10⁻⁸ –10⁻³ mol/L) of sodium nitrite. Results were expressed as mmol/L of nitrates plus nitrites (Granger et al., 1999).

Western blot were performed as described elsewhere (Guedes et al., 2006). Rabbit anti-universal NOS (Sigma) was used as primary antibody. The results were expressed as % of pixels mean.

Protein was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

One way ANOVA followed by Student Newman Keuls post hoc multiple comparison test were used for statistical analysis (SPSS 13.0 software). The comparisons were made among naïve, sham and SNT for each time point. Differences were considered statistically significant when the *P* value <0.05.

The lumbosacral spinal cord GSH content decreased about 50% three days after surgery (*P*<0.001) (Figure 1A). This decrease was similar in both sham and SNT animals showing that changes in GSH content were not specific to neuropathic pain. No differences in GSH content were found in the other periods analyzed. GPx activity (Figure 1B) shows a marked increase (76% in sham and 110% in SNT animals) at the same time point of GSH

change, three days after injury ($P<0.01$), as compared to naïve group. Increase in GPx activity also occurred in both sham and SNT groups. This opposite result probably is due to the higher rate of consumption of GSH when GPx activity increases. In the other hand, GST activity does not show significant differences among the groups (data not show).

It was observed a significant rise ($P<0.05$) in the expression of nNOS (Figure 2) in spinal cord seven days after SNT in relation to naïve and sham animals. The production of the NOx was higher one day post surgery both in sham (35%) and SNT (39%) ($P<0.01$) as compared to the naïve group. Seven and fifteen days after injury the increase was specific to SNT ($P<0.01$), and NOx production in sham has already returned to naïve level. At seven days, the increase of NOx in SNT group by 36% and at fifteen days by 43% (Figure 3).

The present study demonstrates a depletion in GSH levels and an increase in GPx activity suggesting that, after peripheral axotomy, there is an augmentation in ROS production in spinal cord. In this situation, the antioxidant system is mobilized to avoid tissue damage generated by ROS. However, GPx activity and GSH content results were not specific to SNT since sham group exhibited similar response. In sham surgery also occurs afferent nociceptive stimulation by incision and soft tissue manipulation. Although manipulation is slight, it seems enough to activate systems related to oxidative stress. This fact demonstrates the high sensibility of these systems to peripheral nociceptive stimulation.

GST plays a role in the detoxification of toxic compounds such as by-products of lipid peroxidation (Xie et al., 1998). Our study demonstrates that GST activity does not change in spinal cord after SNT. This may occur probably because this injury does not generate lipid peroxidation, as demonstrated previously (Guedes et al., 2006). However, in

despite of lack of lipid peroxidation, oxidative stress may occur in this situation. It has been shown that nociceptive stimulation generates an increase in glucose uptake in the spinal cord, evidenced by the rise in metabolic activity in this tissue during pain transmission (Porro et al., 1991; Schadrack et al., 1999). Whether antioxidant defenses are decreased, this increase in functional activity predispose to higher ROS production, and consequently to oxidative stress. At three days post injury the increase in GPx activity may be crucial to protect nervous tissue against ROS. In the other time points analyzed, other antioxidant agents may be activated since activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase is decreased in spinal cord after SNT (Guedes et al., 2006).

Despite several studies about neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and neuropathic pain, its role in spinal cord is unclear. The role of NO in neuropathic pain generally is attributed to its modulation of the release of pain-related neurotransmitters, intensifying central sensitization (Aimar et al., 1998; Vetter et al., 2001). In addition, increase of NO production might leads to peroxynitrite (ONOO^-) formation by its reaction with superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Peroxynitrite is a harmful oxidant agent that increases its production in the injured nerve. Antioxidant therapy using peroxynitrite scavengers or SOD mimetics (to decrease superoxide levels) reduces hyperalgesia in experimental pain models (Liu et al., 2000). Thus, an involvement of NO in pain mechanisms is evident.

In our study, it was demonstrated a rise in neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) expression seven days after SNT. Some studies do not found changes in nNOS expression in spinal cord after spinal nerve ligation (Luo et al., 1999; Guan et al., 2007). However, these results may be due to the methodology employed which use contralateral side of injury as control to compare nNOS expression. Therefore, may be reasonable do suppose that peripheral injury can lead to bilateral response in spinal cord segments that

receive nociceptive stimulus as reported in previous studies (Rydh-Rinder et al., 1996; Infante et al., 2007). At the present study, we evaluated the whole lumbosacral spinal cord. So, the increase in NO production in spinal cord post peripheral injury is confirmed by rise in NO metabolites production.

The involvement of NO metabolites formation in pain conditions was already demonstrated by NO_x increased levels in spinal cord dorsal horn measured with microdialysis after formalin injection (Vetter et al., 2001). In the present study, it was shown an increase in NO_x one day after injury, both in sham and SNT groups. This suggests that surgical manipulation activates pathways in spinal cord that can generate RNS. However, this increase in NO_x production, unspecific to neuropathic pain, seems to be rapidly reverted. At three days after SNT, NO_x do not differ in relation to sham or naïve. This could be attributed to absence of modification in nNOS expression as evidenced by our western blot analysis in this time point post injury. At seven days after SNT, the increased NO_x reflects only the neuropathic injury. This result is correlated with nNOS expression. At this point, NO elevated may interfere directly in pain processing, modulating neurotransmitters release, synaptic plasticity and activation of signaling pathways (Vetter, 2001; Bryan, 2006; Calabrese et al., 2007) to establishment of pathological status.

In summary, this study supports the participation of RNS in pain physiology. In addition, we demonstrated the activation of an antioxidant system after SNT in spinal cord. Thus, it's relevant to consider the action of these molecules to the development of new drugs to alleviate pain. In the other hand, is reasonable to propose that ROS and RNS may act in pain mechanisms by modulation of synaptic transmission or signaling pathways that determinate cell survival or apoptosis. However, the precise relationship of ROS and RNS in pain conditions is unknown and further studies are necessary to clarify it.

REFERENCES

- P. Aimar, L. Pasti, G. Carmignoto, A. Merighi, Nitric oxide-producing islet cells modulate the release of sensory neuropeptides in the rat substantia gelatinosa, *J. Neurosci.* 18 (1998) 10375-10388.
- A.S. Araujo, A.T. Enzweiler, P. Schenkel, T.R. Fernandes, M.F. Ribeiro, W.A. Partata, S. Llesuy, A. Belló-Klein, Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine, *Mol. Cell. Biochem.* 303 (2007) 89-95.
- M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- N.S. Bryan, Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 691-701.
- V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, A.M. Stella, Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity, *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 766-775.
- B. Costa, A.E. Trovato, F. Comelli, G. Giagnoni, M. Colleoni, The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain, *Eur. J. Pharmacol.* 556 (2007) 75-83.
- L. Flohé, W.A. Günzler, Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 114-121.
- X. Gao, H.K. Kim, J.M. Chung, K. Chung, Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 131 (2007) 262-271.
- D.L. Granger, N.M. Anstey, W.C. Miller, J.B. Weinberg, Measuring nitric oxide production in human clinical studies, *Methods Enzymol.* 301 (1999) 49-61.
- Y. Guan, M. Yaster, S.N. Raja, Y.X. Tao, Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice, *Mol. Pain* 3 (2007) 29.
- R.P. Guedes, L.D. Bosco, C.M. Teixeira, A.S. Araujo, S. Llesuy, A. Bello-Klein, M.F. Ribeiro, W.A. Partata, Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochem. Res.* 31 (2006) 603-639.
- C. Infante, M. Díaz, A. Hernández, L. Constandil, T. Pelissier, Expression of nitric oxide synthase isoforms in the dorsal horn of monoarthritic rats: effects of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists, *Arthritis Res Ther.* 9 (2007) R53.

H.K. Kim, S.K. Park, J.L. Zhou, G. Tagliabatella, K. Chung, R.E. Coggeshall, J.M. Chung, Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111 (2004) 116-124.

D. Levy, D.W. Zochodne, NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Pract.* 4 (2004) 11-18.

T. Liu, K.R. Knight, D.J. Tracey, Hyperalgesia due to nerve injury-role of peroxynitrite, *Neuroscience* 97 (2000) 125-131.

Z.D. Luo, S.R. Chaplan, B.P. Scott, D. Cizkova, N.A. Calcutt, T.L. Yaksh, Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J. Neurosci.* 19 (1999) 9201-9208.

B. Mannervik, C. Guthenberg, Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol.* 77 (1981) 231-235.

S.T. Meller, G.F. Gebhart, Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52 (1993) 127-136.

A.K. Naik, S.K. Tandan, S.P. Dudhgaonkar, S.H. Jadhav, M. Kataria, V.R. Prakash, D. Kumar, Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur. J. Pain* 10 (2006) 573-579.

M.G. Osborne, T.J. Coderre. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 126 (1999) 1840-1846.

C.A. Porro, M. Cavazzuti, A. Galetti, L. Sassatelli, Functional activity mapping of the rat brainstem during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience* 41 (1991) 667-680.

M. Rydh-Rinder, K. Holmberg, L.G. Elfvin, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hokfelt, Effects of peripheral axotomy on neuropeptides and nitric oxide synthase in dorsal root ganglia and spinal cord of the guinea pig: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 707 (1996) 180-188.

M. Salter, P.J. Strijbos, S. Neale, C. Duffy, R.L. Follenfant, J. Garthwaite, The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. *Neuroscience* 73 (1996) 649-655.

J. Schadrack, F.L. Neto, A. Ableitner, J.M. Castro-Lopes, F. Willoch, P. Bartenstein, W. Zieglgänsberger, T.R. Tölle, Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience*, 94 (1999) 595-605.

M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39 (2007) 44-84.

G. Vetter, G. Geisslinger, I. Tegeder, Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain* 92 (2001) 213-218.

C. Xie, M.A. Lovell, W.R. Markesbery, Glutathione transferase protects neuronal cultures against four hydroxynonenal toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 25 (1998) 979-988.

L. Xu, T. Mabuchi, T. Katano, S. Matsumura, E. Okuda-Ashitaka, K. Sakimura, M. Mishina, S. Ito, Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide* 17 (2007) 18-24.

T. Yamamoto, N. Shimoyama, Role of nitric oxide in the development of thermal hyperesthesia induced by sciatic nerve constriction injury in the rat. *Anesthesiology* 82 (1995) 1266-1273.

C.J. Woolf, Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity, *Nature* 306 (1983) 686-688.

M. Zimmermann, Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429 (2001) 23-37.

Legends to Figures:

Figure 1. Glutathione content (A) and GPx activity (B) in lumbosacral spinal cord of naïve, sham and SNT groups 1 D, 3 D, 7 D and 15 D. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ (one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test) comparing naïve versus sham and naïve versus SNT at 3 D. Glutathione content is expressed as nmol/mg of protein. GPx activity is expressed as nmol/min/mg of protein. Data represent mean \pm SEM ($n = 5$ for each group). SNT, sciatic nerve transection; 1, 3, 7 and 15 D, day(s) after surgery.

Figure 2. Western blot analysis for nNOS in lumbosacral spinal cord of naïve, sham and SNT groups 3 D and 7 D. (A) Representative western blots showing expression of nNOS. (B) Mean \pm SEM values percentages of pixels optical density of nNOS (expressed in arbitrary units). * $P < 0.05$ (one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test) comparing naïve versus SNT and sham versus SNT at 7 D ($n = 5$ for each group). OD, optical density; SNT, sciatic nerve transection; 1, 3, 7 and 15 D, day(s) after surgery.

Figure 3. NO_x production in lumbosacral spinal cord of naïve, sham and SNT groups 1 D, 3 D, 7 D and 15 D. * $P < 0.001$ comparing naïve versus sham and naïve versus SNT at 1 day; ** $P < 0.01$ comparing naïve versus SNT and sham versus SNT at 7 and 15 days (one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test). NO_x production are expressed as nmol/mg of protein. ($n = 5$ for each group). SNT, sciatic nerve transection; 1, 3, 7 and 15 D, day(s) after surgery.

Figure 1

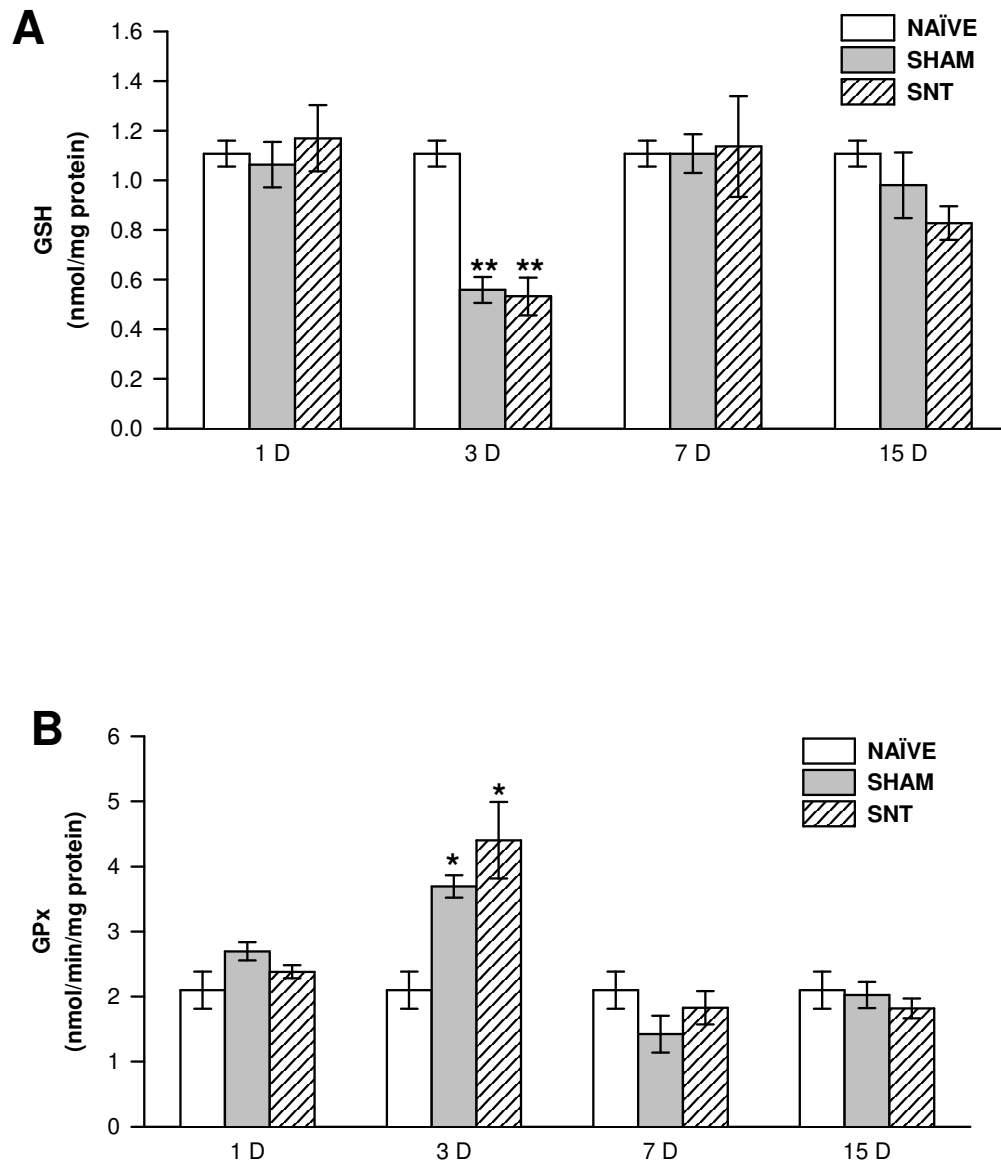


Figure 2

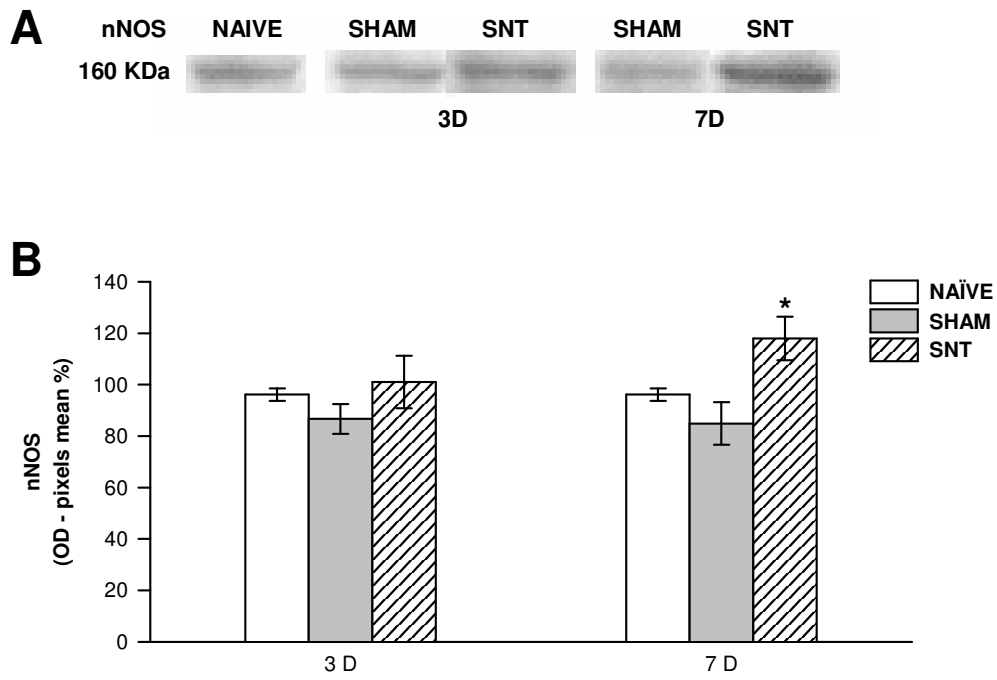
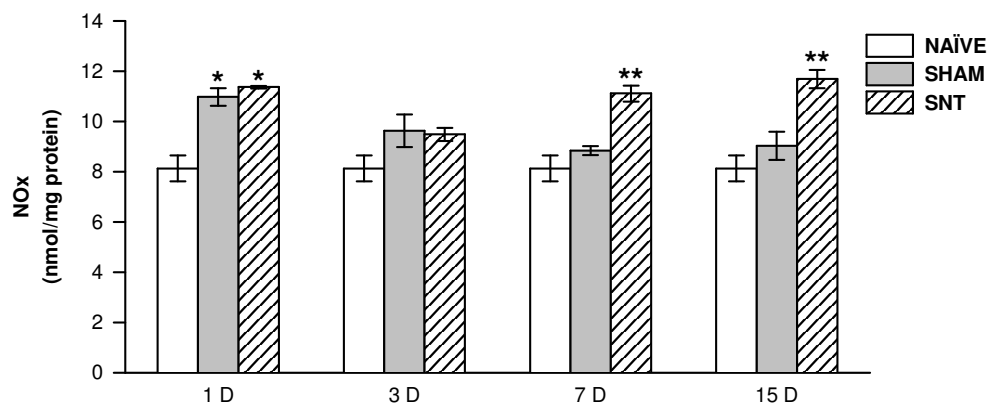


Figure 3



**Artigo 3: Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway
in neuropathic pain**

(submetido para Cellular and Molecular Neurobiology)

Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain

Renata P. Guedes^{1,2}, Alex S. R. Araújo¹, Daiane Janner¹, Adriane Belló-Klein¹, Maria Flávia M. Ribeiro¹, Wania A. Partata^{1,3}

Running title: Reactive oxygen species and Akt in neuropathic pain.

¹ Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

² E-mail address: reguedes@yahoo.com.br.

³ To whom correspondence should be addressed at Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3316 3305; Fax: +55 51 3316 3166.

SUMMARY

Neuropathic pain occurs as a result of peripheral or central nervous system injury. Its pathophysiology involves mainly a central sensitization mechanism that may be correlated to many molecules acting in regions involved in pain processing, such as the spinal cord. It has been demonstrated that reactive oxygen species (ROS) and signaling molecules, such as the serine/threonine protein kinase Akt, are involved in neuropathic pain mechanisms. Thus, the aim of this study was to provide evidence of this relationship. Sciatic nerve transection (SNT) was used to induce neuropathic pain in rats. Western blot analysis of Akt and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-Michael adducts, and measurement of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the lumbosacral spinal cord were performed. The main findings were found seven days after SNT, when there was an increase in HNE-Michael adducts formation, total and p-Akt expression and H_2O_2 concentration. However, one and 15 days after SNT, H_2O_2 concentration was raised in both sham (animals that were submitted to surgery without nerve injury) and SNT groups, showing the high sensibility of this ROS to nociceptive afferent stimuli, not only to neuropathic pain. p-Akt also increased in sham and SNT groups one day post injury, but at 3 and 7 days the increase occurred exclusively in SNT animals. Thus, there is crosstalk between intracellular signaling pathways and ROS, and these molecules can act as protective agents in acute pain situations or play a role in the development of chronic pain states.

Key words: neuropathic pain, spinal cord, sciatic nerve transection, 4-hydroxy-2-nonenal, Akt, hydrogen peroxide.

INTRODUCTION

Neuropathic pain can arise as a result of many diseases and involves different etiologies, such as diabetic neuropathy, postherpetic neuralgia, trigeminal neuralgia and many other conditions that cause functional abnormalities or direct injury in the peripheral or central nervous system (Finnerup *et al.*, 2007). The underlying neuropathic pain mechanisms are related to peripheral and central sensitization. They originate from the release of inflammatory mediators around peripheral damaged tissue and ectopic discharges from the injured nerve leading to a hyperexcitable state in spinal dorsal horn neurons (Millan, 1999). Central sensitization is the main contributor to the development of neuropathic pain. The related symptoms are the aberrant responses encountered in animal models and by patients, as the pain threshold decreased, perceived by pain evoked when there is mechanical or thermal light stimuli (Shim *et al.*, 2005; Chizh *et al.*, 2007).

It has been reported that several mediators and neurotransmitters participate in central sensitization (Woolf and Salter, 2000). Reactive oxygen species (ROS) seems to be involved in this concern, since it was shown that neuropathic pain reduces antioxidant activity in the spinal cord (Guedes *et al.*, 2006). In addition, systemic or intrathecal injections of antioxidants relieve allodynia (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). Thus, increasing evidence suggests a role for oxidative stress in neuropathic pain and in many neurological diseases, but the precise mechanisms that underlie pain and oxidative stress are still unclear. Increased production of ROS leads to marked changes in cell structure and function, as lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage. Some markers are useful to detect increased ROS, such as lipid peroxidation products. 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) is a highly cytotoxic aldehyde generated from oxidation of polyunsaturated fatty

acids. Thus, HNE analysis could provide an indication of lipid peroxidation, but also for proteins oxidation since it reacts with the amino acids cysteine, histidine and lysine forming Michael adducts (Uchida, 2003). Several functions have been ascribed to HNE in the nervous system including neurotoxic and neurotrophic effects (Farooqui and Horrocks, 2006). Recently it was demonstrated that HNE may enhance nociceptor excitability and consequent pain hypersensitivity in response to tissue injury (Trevisani *et al.*, 2007). Besides HNE, hydrogen peroxide (H_2O_2) is a stable ROS that can be easily measured providing evidence of oxidative stress occurrence. The cell activity constantly produces superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) from molecular oxygen. This anion can be toxic if it reacts with other molecules such as nitric oxide (NO), but antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) converts the superoxide anion to H_2O_2 . The damaging potential of H_2O_2 consists in its ability to yield hydroxyl radical ($\bullet OH$) by the iron catalyzed Fenton and Haber-Weiss reactions. Thus, the increased H_2O_2 concentration may be harmful to cells. Moreover, H_2O_2 is a diffusible ROS contributing to the development of pathological pain states not only by generating dangerous ROS but also by modulating synaptic plasticity. This ROS play a role in releasing intracellular stored calcium and interfering in synaptic activity at dorsal horn interneurons (Takahashi *et al.*, 2007).

Relationships among molecules related to neural processing are very intricate, and neurotransmission is also modulated by several signal transduction events that crosstalk with ROS, especially H_2O_2 . An important signaling pathway in the nervous system involves Akt. Akt is a serine/threonine protein kinase often referred to as a survival and growth cell promoter (Manning and Cantley, 2007). Its activation occurs as a result of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) stimulation by neurotrophin, cytokines and other cellular stimuli. It has been well established that the nerve growth factor (NGF) enhances

the sensation of pain (Lewin *et al.*, 1994; Bonnington and McNaughton, 2003). Thus, NGF might activate Akt in response to nociceptive stimulus. In cortical neurons it was observed that increased ROS can down-regulate the PI3K/Akt pathway enhancing neuron susceptibility to cell death (Taylor *et al.*, 2005). Antioxidant treatment prevents neuronal injury induced by H₂O₂ by modulating cell signaling pathways, and these effects are more important in PI3K/Akt than in MAPK (mitogen-activated protein kinase) transduction cascades (Vauzour *et al.*, 2007).

In despite of studies that correlate ROS generation and signaling pathway activation in the nervous system, no results on this issue are found in pain conditions. Accordingly, this study proposes to do this correlation by Western blot analysis of Akt and HNE-Michael adducts, and measurement of H₂O₂ in spinal cord of rats submitted to sciatic nerve transection, a useful neuropathic pain experimental model.

MATERIALS AND METHODS

Animals:

Experiments were conducted in adult male Wistar rats weighing 200-250 g. All animal procedures were approved by the Ethics Committee at the Federal University of Rio Grande do Sul. Under anesthesia (ketamine 80 mg/kg and xylazine 2 mg/kg) and sterile conditions, the right sciatic nerve was exposed and transected at mid thigh level. In sham-operated animals, the right sciatic nerve was exposed but not transected. For further comparisons a naïve group was included in which the animals do not undergo surgical manipulation. Groups of five animals were sacrificed 1, 3, 7 and 15 days after surgery.

Preparation of Tissue Samples:

Rats were killed by decapitation and their lumbosacral spinal cords were quickly dissected out. The tissues were immediately cooled in liquid nitrogen and processed to determine hydrogen peroxide. The Western blot samples were homogenized in lysis buffer containing protease inhibitors and detergents [20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P40, 200 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin (25 μ g/mL), pH 7.4]. The homogenates were centrifuged at 800 x g for 20 minutes to discard nuclei and cell debris and the supernatant fraction obtained was frozen at -70°C for further measurements.

Determination of hydrogen peroxide

The assay was based on horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red by hydrogen peroxide, leading to the formation of a compound that absorbs at 610 nm. Slices of fresh tissue from lumbosacral spinal cord were incubated for 30 min. at 37°C in phosphate buffer 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L and dextrose 5 mmol/L). The supernatants were transferred to tubes with phenol red 0.28 mmol/L and 8.5 U/mL HRPO. After 5 min incubation, NaOH 1 mol/L was added and it was read at 610 nm. The results were expressed in nmoles H₂O₂/g tissue (Pick and Keisari, 1980).

Western Blot:

Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (12%) was carried out using a miniprotein system (Bio-Rad). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (rainbow full range Amersham). Protein (50 μ g) was loaded in each lane with loading buffer containing

0.375mol/L Tris (pH 6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 0.5 mol/L mercaptoethanol, and 0.002% bromophenol blue. Samples were heated at 100°C for 2 min prior to gel loading. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham) using an electrophoretic transfer system at 110V for 1 h. The membranes were then washed with TTBS (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 150 mmol/L NaCl; 0.05% Tween-20, pH 7.4) and 8% nonfat dry milk for 1h. The membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in TTBS plus 2.5% BSA. Rabbit anti-HNE-Michael adducts (1:1000, Calbiochem), rabbit anti-total Akt polyclonal antibody and rabbit anti-phospho-Akt ser657 (Santa Cruz Biotechnology) were used as primary antibodies. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 2h at room temperature with secondary antibody (1:5000, anti-rabbit IgG peroxidase conjugated; Santa Cruz), washed with TBS (20 mmol/L Tris-HCl; 150mM NaCl, pH 7.5) and revealed by chemiluminescence followed by apposition of the membranes to autoradiographic films. These films were analyzed with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham). The results were expressed as % of pixels mean. The amount of protein per lane transfer was corrected by the Ponceau method (Klein *et al.*, 1995).

Protein Measurement:

Protein was measured by the Bradford method (1976), using bovine serum albumin as standard.

Statistical Analysis:

The results were compared by one way ANOVA followed by Student Newman Keuls post hoc multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when the P value <0.05 . All statistical analyses were carried out with SPSS 13.0 software.

RESULTS

Hydrogen peroxide

There was a significant increase in H_2O_2 concentration in lumbosacral spinal cord one day after surgery ($P < 0.05$). This raise was found in both groups: those that had undergone sciatic transection and sham surgery, indicating that H_2O_2 concentration is not affected only by neuropathic pain, but also by surgical manipulation (Fig. 1). Three days after surgery H_2O_2 concentration was similar to that of the naïve group. Seven and fifteen days after surgery, the H_2O_2 concentration values were lower than 1 day groups, but higher than the naïve one ($P < 0.05$). At these time points, results also do not differ between sham and SNT groups. These results demonstrate a dramatic increase in H_2O_2 concentration in lumbosacral spinal cord during an acute period of injury and a large sensibility in H_2O_2 formation, since sham animals also exhibited increased H_2O_2 levels.

4-hydroxy-2-nonenal (HNE)

A few bands reacted with anti-HNE indicating HNE-protein adduct formation (Fig. 2). We chose the 75 KDa band to quantify the optical density, since it showed reaction in all samples and may provide a better parameter to compare the changes in the formation of Michael adducts due to lipid peroxidation among all samples analyzed. The results

demonstrate a significant ($P < 0.05$) increase in lumbosacral spinal cord HNE-protein adduct formation 7 days after SNT as compared to naïve and sham animals. This result indicates an elevation in lipid peroxidation products, such as HNE, that may bind to cellular proteins, in response to neuropathic pain induction.

p-Akt and total-Akt

Sciatic nerve transection causes a significant ($P < 0.05$) raise in p-Akt expression (Fig. 3). The employed antibody recognizes phosphorylation on serine 657 residue. This increase was significant 1, 3 and 7 days after surgery, demonstrating that injury may affect and activate intracellular transduction pathways in earlier stages of neuropathic pain. One day post surgery sham animals also exhibit an increase in p-Akt expression in relation to the naïve group, as illustrated by Figure 4B. However, it was not significant statistically ($P > 0.05$). Moreover, sham does not differ from SNT at this point in time. This result may be explained by activation of pain pathways by skin and muscle lesion a few hours after surgery due to surgical manipulation, and it leads to Akt pathway activation. At 3 and 7 days post injury, sham animals returned to naïve p-Akt expression levels. At 15 days post surgery, both sham and SNT groups decrease p-Akt expression, becoming similar to the naïve group.

Western blot analysis revealed that neuropathic pain leads to a striking raise in total-Akt (Fig. 4). Thus, not only does Akt phosphorylation increase, but there is also a rise in expression levels of Akt protein in response to nerve injury. This may help to provide a higher source to phosphorylation by transduction cascade activation following peripheral nerve damage, amplifying the nociceptive signal. The increase was found 7 days post sciatic nerve transection ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The present study demonstrated that painful stimulation to peripheral afferents via sciatic nerve axotomy causes activation of Akt, a serine/threonine protein kinase, and also increases production of ROS evidenced by H_2O_2 . Moreover, cell damage is occurring, as supported by HNE, a marker of lipid peroxidation, in the lumbosacral spinal cord, the region where nociceptive information arrives in the central nervous system.

The reduction of O_2 to H_2O generates dangerously reactive intermediates, such as H_2O_2 . Elevation in production of these intermediates and decrease in antioxidant defenses, are responsible for the toxicity of O_2 , producing oxidative damage (Fridovich, 1998). ROS-mediated neuronal injury is a final common pathway for a number of brain disease processes (Sas *et al.*, 2007). In pain studies, injection of formalin into the upper lip of rats causes an increase in H_2O_2 level in the spinal trigeminal nucleus. Treatment with 2-methoxyoestradiol (2-ME), a SOD inhibitor, and *N*-acetylcysteine (NAC), a ROS scavenger, reduces nociceptive behavioral response (Viggiano *et al.*, 2005). Decline in SOD by 2-ME leads to a decrease in the production of H_2O_2 , which may be related to decrease in nociceptive signals demonstrated by behavioral tests. Accordingly, H_2O_2 seems to be a major molecule in pain transmission. Furthermore, H_2O_2 increases the activity of substantia gelatinosa neurons in the dorsal horn via mobilization of calcium stores. These effects cause an increase in inhibitory current frequency of these neurons, hence H_2O_2 acts in synaptic plasticity of sensory neurons in spinal cord interfering in nociceptive processing. However, the effects of H_2O_2 on the GABAergic inhibitory synapses are not well understood and the inhibition may occur on the inhibitory interneurons generating enhanced overall excitation (Takahashi *et al.*, 2007).

In the present study the increase in H_2O_2 concentration in the spinal cord was more pronounced one day after surgery in both sham and SNT groups. This result can be explained since in sham animals lesions occur in the skin and slightly in adjacent connective tissue to expose the sciatic nerve, stimulating cutaneous afferents. However, three days after surgery there was a decrease in H_2O_2 concentration, but we cannot state that cells are being protected in this period because there is reduction in catalase activity as demonstrated in our previous work (Guedes *et al.*, 2006). Catalase converts H_2O_2 to H_2O , thus, with decreased catalase, H_2O_2 produced may have been converted to more toxic molecules, as hydroxyl radical, since there was a reduction in enzymatic antioxidant defense. Fifteen days after surgery, the H_2O_2 concentration was increased in relation to naïve animals, but antioxidant enzyme activities were near to basal levels, and this could at least in part protect the cells from oxidative damage. Therefore, changes encountered 7 days after SNT seem to be more dangerous to spinal cord cells. At this point in time, there was a remarkable decrease in catalase activity, and this may lead to greater toxicity. In addition, increased H_2O_2 production occurs in spite of decreased activity of SOD (Guedes *et al.*, 2006), an enzyme that produces H_2O_2 . This response was specific to the SNT group, in other words, generated exclusively by neuropathic pain. Sham animals also demonstrate increased H_2O_2 seven days after surgery, but in this time, SOD activity is near to basal levels showing that there is greater stimulation of H_2O_2 production post-axotomy.

Increased activity of sensory afferents generates greater oxygen expenditure, and if antioxidant defenses are low or absent, oxidative stress may occur. In experimental models of neuropathic pain mitochondrial ROS production has been demonstrated in the spinal cord (Park *et al.*, 2006), and injection of ROS scavengers effectively reduces allodynia (Kim *et al.*, 2004). Measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) did

not detect changes in lipid peroxidation post SNT (Guedes *et al.*, 2006), but this result may be due to the limitation of this technique. On the other hand, HNE is a much more reliable index of lipid peroxidation than malonaldehyde (Moore and Roberts, 1998). In the present study, the greater toxicity produced one week after SNT can be evidenced by increase in HNE-Michael adducts formation. Exposure of neurons to HNE causes cytotoxic effects leading to loss of cell viability and even to apoptosis (Malecki *et al.*, 2000). Toxic effects of HNE can be attributed to its ability to disturb calcium homeostasis, since increases in calcium mitochondrial and cytoplasmic levels elicited by HNE were seen in cultured neural cells leading to apoptosis and necrosis (Kruman and Mattson, 1999). The reactivity of HNE also can be observed by its protein adducts, that consequently changes protein conformation and function. The importance of HNE in modifying proteins and impairing the central nervous function may be illustrated by its role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders (Yoritaka *et al.*, 1996; Sayre *et al.*, 1997). The apoptotic process in Alzheimer's disease is linked to oxidative stress-dependent activation of signaling pathways, and HNE and H₂O₂ are directly related to this (Tamagno *et al.*, 2003). On the other hand, HNE, under nontoxic levels, curiously also activates survival mechanisms against cytotoxic effects (Uchida, 2003).

Akt is a downstream target of PI3K, and activation of this intracellular signaling cascade is an important stimulus to avoid neuron apoptosis. This effect is due to phosphorylation and inactivation of Bad, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, that in turn, prevents caspase activation and cell death (Alessi and Cohen, 1998). ROS such as H₂O₂ are stimulants for Akt phosphorylation and this provides a signal to protect cells against oxidative stress (Wang *et al.*, 2000). In this study, SNT animals showed an elevation in phospho-Akt expression in the lumbosacral spinal cord, one, three and seven

days after axotomy, but 15 days after SNT the phospho-Akt expression returned to naïve levels. These changes in phospho-Akt expression are possibly related to increased cell susceptibility to oxidative damage as demonstrated in our work by increase in H₂O₂ concentration and HNE-protein adducts formation. In other studies, the increase in Akt phosphorylation occurs in early stages of pain transmission (Bonnington and McNaughton, 2003) in both peripheral nerve injury (Xu *et al.*, 2007) and pain elicited by capsaicin injection (Pezet *et al.*, 2005). In these studies, inhibition of the PI3K/Akt pathway reduces hyperalgesia, so this intracellular signaling cascade is involved in enhancing the sensation of pain, and perhaps contributing to the development of neuropathic pain.

Moreover, we found an increase in total-Akt seven days after SNT. This finding emphasizes that one week post axotomy is a critical period in which the spinal cord is more exposed to oxidative stress, since in this period there was an increase in H₂O₂ and HNE-Michael adducts formation. Thus, elevation of total-Akt expression may mean a raise in protein synthesis of Akt aiming to protect the cell. The signals that activate Akt in pain transmission are unknown. Growth factors are putative molecules with this action. It is well established that neurotrophins bind to the same tyrosine kinase receptor that activates several signaling pathways, including PI3K/Akt (Malik-Hall *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2006) and growth factors are upregulated in pain conditions (Pezet and McMahon, 2006). However it is likely that there is involvement of ROS as H₂O₂ or even HNE to activate signaling intracellular pathways in nociceptive processing. In brain endothelial cells, superoxide anion and H₂O₂ activated PI3K/Akt pathway and antioxidants inhibited Akt phosphorylation showing that ROS contributed to Akt activation (Schreibelt *et al.*, 2007). In addition, it was demonstrated that protein oxidation is involved in Akt phosphorylation and neuroprotection in neuron culture (Delgado-Esteban *et al.*, 2007). Accordingly, in pain

transmission the role of ROS as second messengers that activate the Akt pathway may also be reasonable, since we show protein adducts formation by HNE and increase in H₂O₂ and in our pain model.

Thus, Akt is related to pain behaviors, but their role in cell survival cannot be ruled out. Besides posttranslational regulation of pro-nociceptive receptors and other pain-related molecules in the dorsal root ganglia and spinal cord dorsal horn, kinase proteins may interfere in gene expression (Woolf and Costigan, 1999). It has been suggested that the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade interferes in gene expression in neuropathic pain by phosphorylating the transcription factor cAMP response element binding protein (CREB). This may be related to increased expression of receptors or neurotransmitters/neuromodulators (Song *et al.*, 2005). Nevertheless, there are no studies that demonstrate linkage between Akt activation and gene expression in pain conditions. However, in spite of the well established role of Akt in cell survival (Manning and Cantley, 2007), and the crosstalk with MAPK cascade in pain conditions (Malik-Hall *et al.*, 2005) we can suggest the hypothesis that this kinase protein may be acting in the spinal cord by posttranslational and transcriptional changes activating or increasing gene expression of molecules that intensify pain transmission. Moreover, this signaling may be favorable because of the protective role of pain, i.e., after injury the increase in nociceptive threshold may prevent further injury.

In conclusion, this study provides evidence concerning the involvement of oxidative stress and Akt in neuropathic pain. The activation of Akt in response to neuropathic pain may be due to a signal originated by second messengers like H₂O₂ and oxidized proteins by HNE and this is an attempt by sensory neurons to stimulate the expression of nociceptive-related genes. Further studies are necessary to establish the precise role of oxidative stress

and intracellular signaling pathways in pain transmission and can help to explain whether these molecules are protective in acute pain situations or may play a role in the development of long-lasting pathological pain states after nerve injury.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERENCES

- Alessi, D.R., and Cohen, P. (1998). Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**(1):55-62.
- Bonnington, J.K., and McNaughton, P.A. (2003). Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J. Physiol.* **551**(Pt 2):433-446.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-54.
- Chao, M.V., Rajagopal, R., and Lee, F.S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci. (Lond.)* **110**(2):167-173.
- Chizh, B.A., Gohring, M., Troster, A., and Quartey, G.K., Schmelz, M., and Koppert, W. (2007). Effects of oral pregabalin and aprepitant on pain and central sensitization in the electrical hyperalgesia model in human volunteers. *Br. J. Anaesth.* **98**(2):246-254.
- Delgado-Esteban, M., Martin-Zanca, D., Andres-Martin, L., Almeida, A., and Bolaños, J.P. (2007). Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway. *J. Neurochem.* **102**(1):194-205.
- Farooqui, A.A., and Horrocks, L.A. (2006). Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist.* **12**(3):245-260.

- Finnerup, N.B., Sindrup, S.H., and Jensen, T.S. (2007). Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **21**(2):129-136.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* **201**(8):1203-1209.
- Guedes, R.P., Bosco, L.D., Teixeira, C.M., Araujo, A.S., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Ribeiro, M.F., Partata, W.A. (2006). Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochem. Res.* **31**(5):603-639.
- Kim, H.K., Park, S.K., Zhou, J.L., Tagliabatella, G., Chung, K., Coggeshall, R.E., and Chung, J.M. (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain.* **111**(1-2):116-124.
- Kim, H.K., Kim, J.H., Gao, X., Zhou, J.L., Lee, I., Chung, K., and Chung, J.M. (2006). Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain.* **122**(1-2):53-62.
- Klein, D., Kern, R.M., and Sokol, R.Z. (1995). A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**(1):59-66.
- Kruman, I.I., and Mattson, M.P. (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* **72**(2):529-540.
- Lewin, G.R., Rueff, A., and Mendell, L.M. (1994). Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.* **6**(12):1903-1912.
- Malecki, A., Garrido, R., Mattson, M.P., Hennig, B., and Toborek, M. (2000). 4-Hydroxynonenal induces oxidative stress and death of cultured spinal cord neurons. *J. Neurochem.* **74**(6):2278-2287.
- Malik-Hall, M., Dina, O.A., and Levine, J.D. (2005). Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.* **21**(12):3387-3394.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* **129**(7):1261-1274.
- Millan, M.J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* **57**(1):1-164.
- Moore, K., Roberts, L.J. 2nd. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* **28**(6):659-671.
- Park, E.S., Gao, X., Chung, J.M., and Chung, K. (2006). Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.* **391**(3):108-111.

- Pezet, S., Spyropoulos, A., Williams, R.J., McMahon, S.B. (2005). Activity-dependent phosphorylation of Akt/PKB in adult DRG neurons. *Eur. J. Neurosci.* **21**(7):1785-1797.
- Pezet, S., and McMahon, S.B. (2006). Neurotrophins: Mediators and Modulators of Pain. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**:507-538.
- Pick, E., and Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* **38**(1-2):161-170.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., and Vecsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* **257**(1-2):221-239.
- Sayre, L.M., Zelasko, D.A., Harris, P.L., Perry, G., Salomon, R.G, and Smith, M.A. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **68**(5):2092-2097.
- Schreibelt, G., Kooij, G., Reijkerkerk, A., van Doorn, R., Gringhuis, S.I., van der Pol, S., Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.O., Piontek, J., Blasig, I.E., Dijkstra, C.D., Ronken, E., and de Vries, H.E. (2007). Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J.* **21**(13):3666-3676.
- Shim, B., Kim, D.W., Kim, B.H., Nam, T.S., Leem, J.W., and Chung, J.M. (2005). Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors in rats with experimental peripheral neuropathy. *Neuroscience.* **132**(1):193-201.
- Song, X.S., Cao, J.L., Xu, Y.B., He, J.H., Zhang, L.C., and Zeng, Y.M. (2005). Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**(7):789-798.
- Takahashi, A., Mikami, M., and Yang, J. (2007). Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP3 receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons. *Eur. J. Neurosci.* **25**(3):705-716.
- Tamagno, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M., and Danni, O. (2003). H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp. Neurol.* **180**(2):144-155.
- Taylor, J.M., Ali, U., Iannello, R.C., Hertzog, P., and Crack, P.J. (2005). Diminished Akt phosphorylation in neurons lacking glutathione peroxidase-1 (Gpx1) leads to increased susceptibility to oxidative stress-induced cell death. *J. Neurochem.* **92**(2):283-293.
- Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D.M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andre, E., Patacchini, R., Cottrell, G.S., Gatti, R., Basbaum, A.I., Bunnett, N.W., Julius, D., and Geppetti, P. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous

- aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(33):13519-13524.
- Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* **42**(4):318-343.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rice-Evans, C., Williams, R.J., and Spencer, J.P. (2007). Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J. Neurochem.* **103**(4):1355-1367.
- Viggiano, A., Monda, M., Viggiano, A., Viggiano, D., Viggiano, E., Chiefari, M., Aurilio, C., and De Luca, B. (2005). Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. *Brain Res.* **1050**(1-2):72-78.
- Wang, X., McCullough, K.D., Franke, T.F., and Holbrook, N.J. (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* **275**(19):14624-14631.
- Woolf, C.J., and Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**(14):7723-7730.
- Woolf, C.J., and Salter, M.W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. **288**(5472):1765-1769.
- Xu, J.T., Tu, H.Y., Xin, W.J., Liu, X.G., Zhang, G.H., and Zhai, C.H. (2007). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp. Neurol.* **206**(2):269-279.
- Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E.R., and Mizuno, Y. (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(7):2696-701.

Legends to Figures:

Fig. 1. Hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration in lumbosacral spinal cord of naïve, sham and SNT groups 1 D, 3 D, 7 D and 15 D. * $P < 0.05$ (one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test) compared to the naïve group. H_2O_2 values are expressed as nmol/mg of tissue. Data represent the means \pm SEM ($n = 5$ for each group). SNT, sciatic nerve transection; 1, 3, 7 and 15 D, day(s) after surgery.

Fig. 2. Western blot analysis for HNE-modified protein. (A) Representative Western blots showing HNE-protein adduct formation in lumbosacral spinal cord homogenates of naïve, sham and SNT groups 1 D, 3 D, 7 D and 15 D detected with anti-HNE antibody. (B) Mean \pm SEM value percentages of pixel optical density of 75 KDa protein positive for anti-HNE antibody (expressed in arbitrary units) in spinal cord homogenates of naïve, sham and SNT groups 1, 3, 7 and 15 days after surgery. * $P < 0.05$ (one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test) in relation to naïve and sham ($n = 5$ for each group). OD, optical density; SNT, sciatic nerve transection; 1, 3, 7 and 15 D, day(s) after surgery.

Fig. 3. Western blot analysis for phospho-Akt (p-Akt). (A) Representative Western blots showing expression of p-Akt (ser657) in lumbosacral spinal cord homogenates of naïve, sham and SNT groups 1 D, 3 D, 7 D and 15 D. (B) Mean \pm SEM value percentages of pixel optical density of p-Akt (expressed in arbitrary units) in spinal cord homogenates of naïve, sham and SNT groups 1, 3, 7 and 15 days after surgery. * indicates $P < 0.05$ between 1D SNT and naïve. ** indicates $P < 0.05$ among 3D SNT compared to 3D sham and naïve, and 7D SNT compared to 7D sham and naïve. The statistical test employed was one way

ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test ($n = 5$ for each group). OD, optical density; SNT, sciatic nerve transection; 1, 3, 7 and 15 D, day(s) after surgery.

Fig. 4. Western blot analysis for total-Akt. (A) Representative western blots showing expression of total-Akt in lumbosacral spinal cord homogenates of naïve, sham and SNT groups 1, 3, 7 and 15 days after surgery. (B) Mean \pm SEM value percentages of pixel optical density of total-Akt (expressed in arbitrary units) in spinal cord homogenates of naïve, sham and SNT groups 1 D, 3 D, 7 D and 15 D after surgery. * indicates $P < 0.05$ in relation to naïve and sham (one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test) ($n = 5$ for each group). OD, optical density; SNT, sciatic nerve transection; 1, 3, 7 and 15 D, day(s) after surgery.

Figure 1

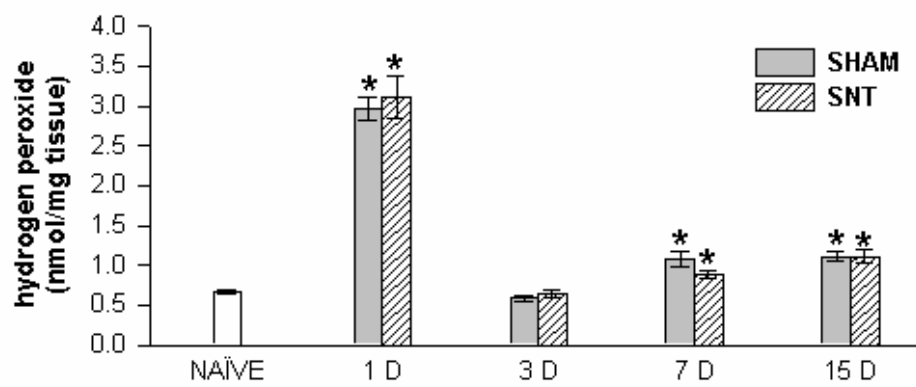


Figure 2

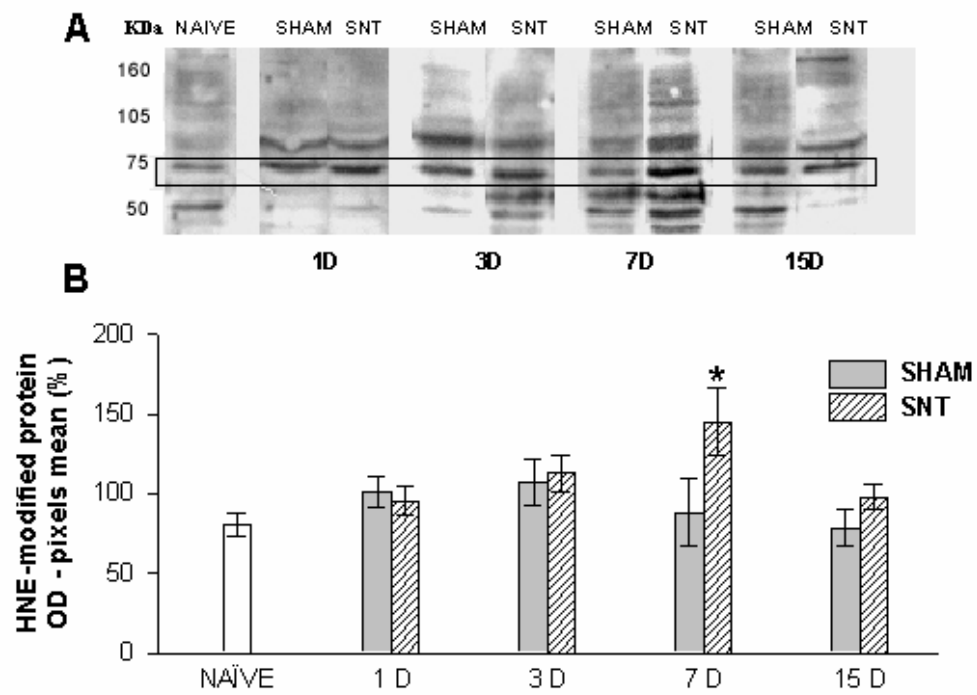


Figure 3

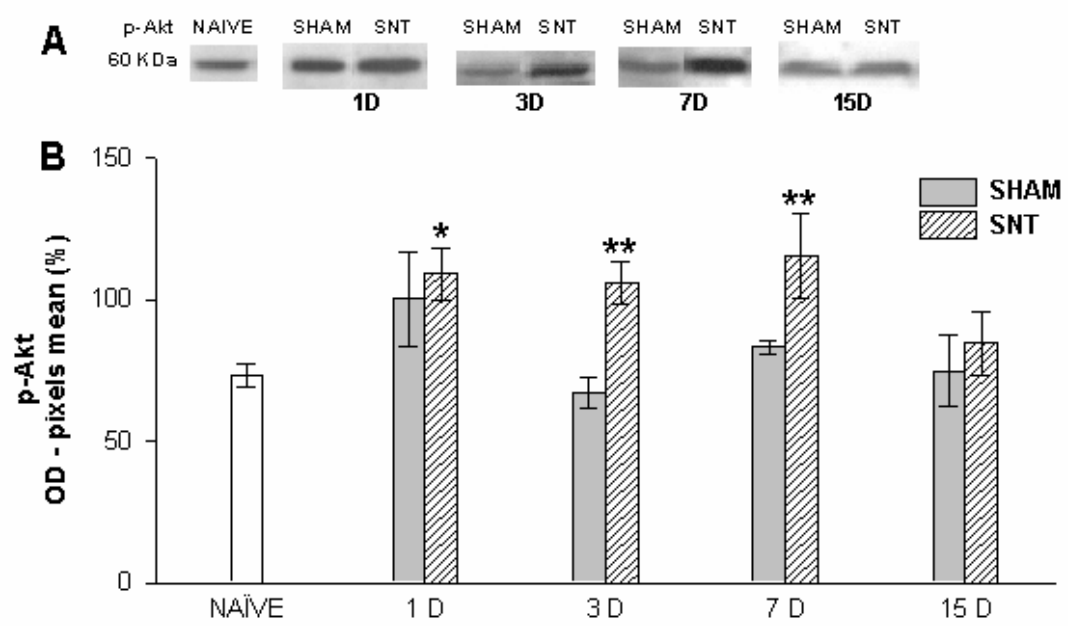
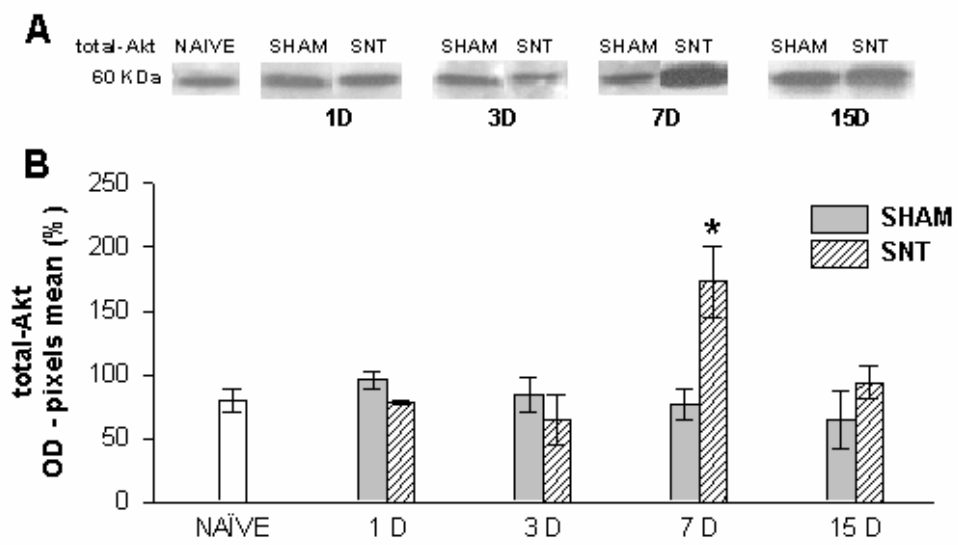


Figure 4



RESUMO DOS RESULTADOS

	1 dia	3 dias	7 dias	15 dias
Hiperálgia térmica		↑ SHAM ↑ SNT	↑ SNT	=
Atividade da SOD		=	↓ SNT	=
Atividade da catalase		↓ SHAM ↓ SNT	↓ SHAM ↓ SNT	=
Expressão da SOD		=	=	=
Expressão da Catalase		=	=	=
Atividade da GPx	=	↑ SHAM ↑ SNT	=	=
Atividade da GST	=	=	=	=
Conteúdo de GSH	=	↓ SHAM ↓ SNT	=	=
TBARS		=	=	=
HNE	=	=	↑ SNT	=
Expressão da nNOS		=	↑ SNT	
NOx	↑ SNT ↑ SHAM	=	↑ SNT	↑ SNT
Concentração de H ₂ O ₂	↑ SHAM ↑ SNT	=	↑ SHAM ↑ SNT	↑ SHAM ↑ SNT
Akt basal	=	=	↑ SNT	=
Akt fosforilada	↑ SNT	↑ SNT	↑ SNT	=

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que a secção do nervo ciático causa alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx, bem como no conteúdo do principal antioxidante não-enzimático celular, a glutathiona, na medula espinal lombossacral dos animais estudados. Essas modificações das defesas antioxidantes foram acompanhadas por elevação na produção de EAO, evidenciada pelo aumento na concentração de H_2O_2 e de proteínas modificadas pelo HNE na medula espinal. Além disso, a lesão nervosa periférica ocasionou aumento na expressão da nNOS e na concentração de seus metabólitos (NOx) na medula espinal, e também a ativação da Akt, uma importante proteína de sinalização intracelular.

O SNC conta com uma grande capacidade antioxidante já que seu consumo de oxigênio é elevado, e por isso o tecido tem uma alta produção basal de EAO. Sendo assim, o encéfalo possui uma concentração significativa de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Dugan & Kim-Ham, 2006). As enzimas SOD, catalase e GPx são importantes defesas antioxidantes primárias. A SOD, envolvida na eliminação do ânion superóxido, pode representar até 1% das proteínas totais do encéfalo. A catalase e a GPx são dois importantes sistemas de eliminação do H_2O_2 . As duas enzimas estão presentes no encéfalo, porém a atividade da GPx é sete vezes maior do que a da catalase (Warner et al., 2004). A catalase é mais abundante em astrócitos do que em neurônios, e na substância branca em relação à cinzenta. Apesar de determinados estímulos, como as neurotrofinas, induzirem a ativação da catalase em neurônios, a atividade dessa enzima é muito menor no encéfalo do que em outros órgãos, como o fígado (Gilgun-Sherki et al., 2002; Dugan &

Kim-Ham, 2006). Os componentes do sistema da GPx (GSH, GR e NADPH) estão presentes em mitocôndrias e no citoplasma celular. Enquanto a catalase está presente principalmente nos peroxissomos, a GPx é encontrada no citosol e acredita-se que esta seja a principal enzima que responde aos aumentos no H₂O₂ (Warner et al., 2004). Apesar das numerosas defesas, o tecido nervoso é vulnerável ao estresse oxidativo em diferentes situações. Essa vulnerabilidade geralmente envolve aumentos na geração de superóxido e NO que podem levar à formação de compostos bastante reativos como o peroxinitrito e o ânion superóxido. Mesmo que a produção de EAO seja constante, a redução na atividade das enzimas antioxidantes gera um desequilíbrio pró-oxidativo. Essa perturbação homeostática é maior ainda quando associada ao aumento na produção de EAO, tornando as células mais expostas à ação lesiva dos radicais livres. Esse quadro é estabelecido em diversas situações patológicas, ou seja, o estresse oxidativo constitui um importante mecanismo na geração e no estabelecimento de doenças (Sas et al., 2007; Valko et al., 2007). A regulação desse processo é multifacetada e pode envolver diversas vias de sinalização celular ou cascatas que podem levar à ativação/inativação de enzimas e até mesmo à morte celular.

A estimulação nociceptiva gera uma maior captação de glicose na medula espinal, ou seja, uma maior atividade funcional no tecido nervoso (Porro et al., 1991; Schadrack et al., 1999). A lesão nervosa periférica, modelo amplamente utilizado para indução de dor neuropática (Sommer & Myers, 1995; Zimmermann, 2001), também produz esse aumento da atividade metabólica no SNC (Price et al., 1991). Isso, por sua vez, predispõe à maior produção de EAO e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo, no caso das defesas antioxidantes não aumentarem sua atividade. No presente estudo foi encontrada uma redução da atividade da SOD 7 dias após a secção do nervo ciático. A catalase também

apresentou queda em sua atividade, porém, esse resultado não pode ser atribuído exclusivamente à lesão neuropática, já que nos animais do grupo sham foi encontrado o mesmo resultado. Essa modificação da atividade da catalase foi observada aos 3 e 7 dias após a cirurgia. Quanto à GPx, o resultado foi inverso, ou seja, ocorreu um aumento da sua atividade 3 dias após a lesão, e assim como para a catalase, essa alteração foi semelhante nos animais denervados e também no grupo sham. Isso demonstra a grande sensibilidade dos sistemas enzimáticos de defesa antioxidante à estimulação nociva periférica, pois os animais do grupo sham também são submetidos a um procedimento cirúrgico. Nessa cirurgia ocorre lesão na pele, e também nos tecidos adjacentes ao nervo ciático, como a musculatura e o tecido conjuntivo associado. Apesar da extensão da lesão dos animais sham ser pequena, existe estimulação dos aferentes nociceptivos que partem das estruturas envolvidas, o que pode ativar as vias nociceptivas, mesmo que de forma mais branda do que na secção nervosa. A redução na atividade da SOD e da catalase demonstra que o período crítico no qual a medula espinal encontra-se mais suscetível ao estresse oxidativo é aos 7 dias após a lesão nervosa periférica. Aos 3 dias, a queda da atividade da catalase pode ser compensada pela maior atividade da GPx, já que ambas as enzimas participam da detoxificação do H_2O_2 , e nesse período, os resultados são semelhantes nos animais denervados e sham.

Outra evidência da estimulação nociceptiva no grupo sham é a presença de hiperalgesia observada nestes animais pelo teste da placa quente. Esse resultado foi observado 3 dias após a cirurgia, o que coincide com o período de tempo no qual a atividade da catalase e da GPx variam nos animais sham e denervados. Porém, aos 7 dias, a resposta de hiperalgesia térmica foi observada apenas nos animais que sofreram a axotomia, o que comprova a confiabilidade do modelo empregado neste estudo, a secção do

nervo ciático, para o estudo da dor neuropática. Assim, 3 dias após a lesão, animais sham e denervados apresentaram-se hiperalgésicos, contudo, uma semana após os procedimentos cirúrgicos, apenas os denervados ainda demonstraram hiperalgesia.

Outra enzima antioxidante estudada foi a GST. Essa enzima está envolvida na conversão de substâncias tóxicas, como os produtos da lipoperoxidação, em compostos hidrofílicos, que podem ser mais facilmente excretados (Xie et al., 1998). No presente trabalho, não foram observadas alterações na atividade da GST na medula espinal após a lesão nervosa periférica. A partir disso, pode ser sugerido que, no modelo experimental empregado, a produção de compostos tóxicos não é intensificada a ponto de aumentar a atividade da GST. Esse aspecto foi evidenciado pelo resultado obtido a partir da medida de TBARS, utilizada para detectar a produção de malondialdeído, um produto da lipoperoxidação (Buege & Aust, 1978). Neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas na formação de malondialdeído entre os grupos estudados. Por outro lado, foi demonstrado aumento na expressão das proteínas modificadas pelo HNE, outro produto da lipoperoxidação, aos 7 dias após a axotomia. A GST catalisa a conjugação do HNE com a glutathione, conferindo proteção contra a toxicidade gerada por este aldeído altamente citotóxico (Petersen & Doorn, 2004). Assim, o aumento na formação do HNE, observado aos 7 dias pode estar ocorrendo devido à GST não aumentar sua atividade, o que torna as células mais suscetíveis aos efeitos nocivos do HNE.

Em um estudo com injeção de zimosan e formalina, substâncias que induzem hiperalgesia, foi demonstrada a ocorrência de dano aos lipídeos na medula espinal. Poucos minutos após a aplicação dessas substâncias houve um aumento na liberação de glicerol no espaço extracelular do corno dorsal espinal. Esse aumento foi observado até 3 horas após a injeção de zimosan e 1 hora após a injeção de formalina (Vetter et al., 2001). O glicerol,

por sua vez, pode ser usado como um marcador da degradação de fosfolipídeos de membrana no SNC (Hillered et al., 1998). Assim, a estimulação nociceptiva produz efetivamente dano a lipídeos, o que pode estar relacionado à geração de estresse oxidativo. Quanto à dor neuropática, não existem estudos que relacionem especificamente essa maior concentração de glicerol extracelular na medula espinal. Porém, o aumento na expressão de proteínas modificadas pelo HNE, evidenciado no presente estudo, pode sustentar a hipótese de lipoperoxidação após a indução de dor neuropática. Nesse caso, contudo, essa é uma resposta mais tardia, pois ocorre apenas 7 dias após a lesão nervosa.

Rokyta e colaboradores (2003) utilizaram um modelo de estimulação dolorosa pela compressão das patas dos animais, diariamente por 10 minutos. Nesse estudo foi demonstrado um aumento da lipoperoxidação no córtex sensório-motor 5 dias após o início da estimulação nociva. Assim, a ativação das vias nociceptivas causa estresse oxidativo em diferentes regiões do SNC envolvidas com a transmissão e o processamento da informação dolorosa.

Estudos em pacientes também apontam redução das defesas antioxidantes e ocorrência de estresse oxidativo na fibromialgia, uma doença caracterizada por dor difusa e persistente (Bagis et al., 2005; Altindag & Celik, 2006). A partir disso, o tratamento com antioxidantes tem sido estudado como estratégia terapêutica para o alívio da dor em situações experimentais. O emprego de tratamento antioxidante reverte a hiperalgesia provocada por dor inflamatória (Khattab, 2006) e neuropática (Liu et al., 2000, Khalil & Khodr, 2001; Kim et al., 2004; Kim et al., 2006). Nesses estudos o tratamento foi realizado após as lesões. Contudo, Crisp e colaboradores (2006) relataram que o efeito analgésico de um *scavenger* de lipoperóxidos foi verificado apenas quando administrado antes da lesão nervosa. Nesse estudo, nos animais que receberam a substância apenas depois da lesão, ou

seja, após o estabelecimento da dor neuropática, evidenciada pela presença de alodínia, o tratamento foi inefetivo em aumentar o limiar nociceptivo. A administração de N-acetilcisteína também apresentou resultados mais efetivos na redução da hiperalgesia quando realizada antes da lesão nervosa (Wagner et al., 1998). Esses resultados conflitantes quanto ao período de tratamento (antes ou depois da lesão), podem ser devido ao emprego de diferentes antioxidantes nos estudos citados. Isso ressalta a importância do conhecimento preciso de quais são as EAO ou os sistemas antioxidantes relacionados às respostas sensoriais alteradas nas situações de dor, e a partir disso ser possível a escolha da abordagem terapêutica mais adequada.

A partir dos resultados do presente estudo pode-se sugerir que, no caso da secção nervosa periférica, as repercussões na medula espinal relacionadas ao estresse oxidativo são mais intensas 7 dias após a lesão. Esse período parece ser crítico na determinação de alterações neuroquímicas na medula espinal, as quais podem implicar em fenômenos relacionados à plasticidade sináptica durante o processamento da dor neuropática. Quanto aos sistemas antioxidantes estudados, a atividade da SOD apresentou uma redução nesse período, exclusivamente nos animais submetidos à axotomia. Contudo, a expressão dessa enzima, determinada por Western blot, não foi alterada. Cabe salientar que neste estudo foi analisada a expressão da CuZnSOD, a isoforma citosólica da enzima. Outros autores observaram que a secção nervosa periférica causa um aumento da expressão da MnSOD, a isoforma mitocondrial da enzima, nas regiões do SNC relacionadas com os nervos comprometidos, enquanto que a CuZnSOD não apresentou alterações (Yoneda et al., 1992; Rosenfeld et al., 1997). Por outro lado, Yu (2002) mostrou a redução da imunorreatividade para CuZnSOD em resposta à avulsão e compressão do nervo ciático. Em ratos neonatos, também foi observada redução da expressão da CuZnSOD após a transecção do nervo

ciático (Rogério et al., 2005). Esses resultados divergentes podem ser atribuídos às diferenças nas metodologias empregadas. Mais recentemente, também foi demonstrado que o local da lesão nervosa, se mais proximal ou mais distal, também influencia nas respostas das células do SNC à axotomia, pois lesões mais distais promoveram um aumento na expressão da MnSOD, enquanto lesões mais proximais provocaram o efeito oposto (Liu et al., 2006).

Além dos estudos sobre dor, a inativação da MnSOD pelo peroxinitrito tem sido descrita em relação a diversas condições patológicas (Macmillan-Crow & Cruthirds, 2001; Salvemini et al., 2006; Bayir et al., 2007). Esse processo envolve uma retroalimentação positiva, pois a inativação da MnSOD predispõe ao acúmulo do ânion superóxido, o que aumenta a formação mitocondrial de peroxinitrito que, por sua vez, pode ativar vias de sinalização que determinam morte celular (Radi, 2004).

De qualquer forma, apesar da expressão da CuZnSOD não apresentar variações, como observado no presente estudo, sua atividade é reduzida em resposta à axotomia e isso pode repercutir na fisiologia celular através do acúmulo do ânion superóxido, já que a SOD catalisa a conversão deste radical livre a H_2O_2 . O ânion superóxido é um radical livre que reage facilmente com o NO, originando peroxinitrito a partir desta reação (Radi et al., 2002). Neste estudo também foi demonstrado que a expressão da nNOS encontra-se aumentada nos animais que sofreram a secção do nervo ciático. A partir disso, pode ser sugerida a formação de peroxinitrito na medula espinal em decorrência da lesão nervosa periférica. Porém, neste trabalho não foi realizada nenhuma técnica que demonstre diretamente a presença do peroxinitrito nas amostras estudadas. Contudo, já foi demonstrado que a lesão nervosa ocasiona um aumento na formação de peroxinitrito no nervo afetado (Liu et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que na medula espinal ocorre

nitração da SOD após a injeção de carragenina, um agente inflamatório. A hiperalgesia e a nitração da SOD foram revertidas pela utilização de um mimético da SOD. O mecanismo proposto para tais eventos é de que o influxo de cálcio provocado pela ativação dos receptores NMDA espinais leva à produção do ânion superóxido, que reage com o NO formando peroxinitrito. Essa molécula, por sua vez, é responsável pela nitração de proteínas, incluindo a SOD, que é inativada pela nitração, o que facilita a formação adicional de ânion superóxido e a persistência da hiperalgesia (Wang et al., 2004). Os mesmos resultados foram descritos em um modelo de hiperalgesia induzida por injeção intratecal de NMDA (Muscoli et al., 2004). Na dor neuropática, a estimulação nociva também causa ativação dos receptores NMDA (Woolf & Thompson, 1991; Ultenius et al., 2006). A partir dos resultados do presente estudo (redução da atividade da SOD, aumento da expressão da nNOS e hiperalgesia térmica 7 dias após a axotomia) é aceitável propor que a secção do nervo ciático também pode gerar maior formação de peroxinitrito na medula espinal, o que pode ser um dos determinantes da hiperalgesia. Além disso, esse parece ser um mecanismo crucial na amplificação do estresse oxidativo após lesões, não apenas periféricas, mas também centrais, pois a inativação da SOD pelo peroxinitrito também foi sugerida no cérebro em resposta à lesão traumática (Bayir et al., 2007).

Apesar da literatura sobre a participação do NO em diversas funções no SNC ser bastante ampla (Callsen-Cencic et al., 1999; Ahern et al., 2002; Radi, 2004; Calabrese et al., 2007; Edwards & Rickard, 2007), seu papel no processamento nociceptivo é incerto. Enquanto muitos estudos apontam o NO como uma molécula pró-nociceptiva (Levy & Zochodne, 2004; Xu et al., 2007) e demonstram que seus inibidores reduzem a hiperalgesia (Salter et al., 1996; Aley et al., 1998; Osborne & Coderre, 1999), outros autores referem que estes compostos não modificam as respostas sensoriais após lesão nervosa (Luo et al.,

1999; Lee et al., 2005). Porém, existe uma grande aceitação sobre o papel do NO na modulação da atividade sináptica (Vetter et al., 2001; Wang et al., 2006; Straub et al., 2007). Em relação à nocicepção, o NO é um importante modulador da liberação de glutamato no corno dorsal espinal em resposta à estimulação nociva, o que contribui para o mecanismo de sensibilização central, caracterizado pela persistência das alterações sensoriais desencadeadas por lesões neuropática ou inflamatória (Meller & Gebhart, 1993; Aimar et al., 1998; Vetter et al., 2001; Xu et al., 2007). O NO é formado a partir de três isoformas de NOS: a nNOS (neuronal) e a eNOS (endotelial) são as duas enzimas constitutivas e dependentes de cálcio, e a iNOS (induzível) que é independente de cálcio. Na medula espinal, foi demonstrado que a lesão nervosa periférica aumenta a expressão da nNOS e da iNOS após lesão nervosa periférica (O'Rielly & Loomis, 2006), e além destas duas isoformas, a iNOS também apresenta sua expressão aumentada em ratos que receberam injeção de um agente inflamatório (Infante et al., 2007). Todavia, alguns autores não encontraram alterações na expressão da nNOS na medula espinal após lesão nervosa periférica (Luo et al., 1999; Guan et al., 2007), contudo, nestes casos, a comparação foi realizada entre as regiões ipsilateral e contralateral à lesão. Porém, outros estudos referem que a lesão nervosa periférica causa respostas bilaterais nos segmentos espinais que recebem a informação nociceptiva (Rydh-Rinder et al., 1996; Infante et al., 2007). No presente estudo, foram realizados homogeneizados de toda a medula espinal lombossacral para analisar a expressão da nNOS. Assim, o resultado obtido reflete a resposta de todo o tecido à lesão periférica.

Neste estudo também foi encontrado um aumento na produção de NOx, evidenciado pela medida de NO_2^- e NO_3^- . No entanto, o padrão temporal da formação desses metabólitos é complexo, pois suas concentrações apresentaram-se elevadas 1, 7 e 15 dias

após a lesão nervosa, mas aos 3 dias, os valores foram semelhantes aos animais controle. No período de 24 horas após a axotomia, a diferença encontrada nos animais denervados foi significativa apenas em relação ao controle, não havendo diferença estatística em relação ao grupo sham. Assim, nesse período de tempo, o efeito da manipulação cirúrgica parece estar contribuindo na formação de NOx. Aos 3 e 7 dias após a lesão nervosa, os resultados de NOx acompanharam a expressão da nNOS demonstrada no presente trabalho: inalterada aos 3 dias e aumentada aos 7 dias nos animais axotomizados. Não foi realizada a medida da expressão da nNOS aos 15 dias, porém neste período, a concentração de NOx ainda permaneceu elevada nos animais denervados. A oxidação do NO e a metabolização do peroxinitrito originam NO_2^- e NO_3^- , assim, a partir da medida desses metabólitos pode-se inferir sobre a produção de NO (Suzuki et al., 2002). Portanto, os resultados do presente trabalho, obtidos a partir da medida desses NOx, sugerem que ocorre um aumento na formação de NO, o qual participa dos mecanismos espinais de dor neuropática.

Outra molécula importante na regulação da dor neuropática é o H_2O_2 , formado a partir da redução do O_2 até H_2O . Uma elevação na concentração de H_2O_2 no núcleo trigeminal foi demonstrada a partir da injeção de formalina no lábio superior de ratos, o que ressalta sua participação no processamento nociceptivo. Nesse mesmo estudo, o tratamento com um inibidor da SOD e N-acetilcisteína reduziu a resposta comportamental nociceptiva (Viggiano et al., 2005). A inibição da SOD pode causar uma redução na produção de H_2O_2 , o que pode estar relacionado com a diminuição dos sinais nociceptivos demonstrados pelos testes comportamentais. A partir disso, o H_2O_2 parece ser importante na transmissão da dor. Ainda, ocorre um aumento na concentração de H_2O_2 em neurônios da substância gelatinosa do corno dorsal espinal através da mobilização de estoques de cálcio. Esses efeitos provocam um aumento nas correntes inibitórias desses neurônios. Assim, o H_2O_2 atua na

plasticidade sináptica de neurônios sensoriais da medula espinal interferindo no processamento nociceptivo. Entretanto, os efeitos do H_2O_2 sobre as sinapses inibitórias GABAérgicas não são bem compreendidos e a inibição pode ocorrer sobre os interneurônios inibitórios gerando um aumento geral na excitação (Takahashi et al., 2007).

No presente estudo, o aumento na concentração de H_2O_2 foi mais pronunciado 1 dia após a cirurgia, de forma similar nos animais sham e denervados. Esse resultado demonstra mais uma vez, que a lesão provocada pela cirurgia já é suficiente para modificar a produção de EAO. Aos 3 dias após a cirurgia houve uma redução na concentração de H_2O_2 concomitante com uma diminuição na atividade da catalase. Por outro lado, nesse período, também ocorreu um aumento na atividade da GPx, o que pode garantir a proteção do tecido por evitar a formação de moléculas mais tóxicas, como o radical hidroxil. Quinze dias depois da cirurgia, houve um aumento na concentração de H_2O_2 em relação aos animais do grupo controle, porém a atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx estava próxima dos níveis basais, o que pode proteger as células, ao menos parcialmente, do dano oxidativo. Contudo, as mudanças encontradas 7 dias após a transecção do nervo ciático parecem ser mais lesivas para as células da medula espinal. Nesse período, a GPx manteve sua atividade semelhante aos animais controle, mas ocorreu uma marcante diminuição na atividade da catalase, o que pode causar grande toxicidade devido ao acúmulo de H_2O_2 . Além disso, ocorreu um aumento na concentração de H_2O_2 apesar da redução da atividade da SOD, a enzima que catalisa a formação de H_2O_2 . Os animais do grupo sham também mostraram um aumento na concentração de H_2O_2 7 dias após a cirurgia. Porém, nesse período, a atividade da SOD apresentou-se próxima do normal nos animais sham, mostrando que a estimulação para a formação de H_2O_2 pode ser maior após a axotomia,

pois a elevação do H_2O_2 nos animais denervados ocorreu juntamente com a redução na atividade da SOD.

O aumento da atividade dos aferentes sensoriais gera maior gasto energético, e se as defesas antioxidantes estão baixas ou ausentes, pode ocorrer estresse oxidativo. Em modelos experimentais de dor neuropática tem sido demonstrada a produção mitocondrial de EAO na medula espinal (Park et al., 2006) e a injeção de *scavengers* é eficiente para reduzir a alodínia (Kim et al., 2004). A medida de TBARS não detectou mudanças na lipoperoxidação após a lesão nervosa, porém, este resultado pode ser uma limitação da técnica. O HNE é um índice muito mais fidedigno de lipoperoxidação do que o malondialdeído (Moore & Roberts, 1998). No presente estudo, a maior toxicidade produzida uma semana após a secção do nervo ciático pode ser evidenciada pelo aumento na formação de proteínas modificadas pelo HNE. A exposição dos neurônios ao HNE causa efeitos citotóxicos levando à perda da viabilidade da célula e até mesmo à apoptose (Malecki et al., 2000). Seus efeitos tóxicos podem ser atribuídos à capacidade do HNE de alterar a homeostase do cálcio, pois, foi observado um aumento nos níveis mitocondriais e citoplasmáticos de cálcio pelo HNE em células em cultura, o que foi correlacionado à apoptose e necrose (Kruman & Mattson, 1999). A reatividade do HNE também pode ser observada pela formação de adutos protéicos pela reação de adição de Michael, esses adutos conseqüentemente mudam a conformação e a função das proteínas. A importância do HNE em modificar proteínas e prejudicar a função do SNC pode ser ilustrada por seu papel na patogênese de doenças neurodegenerativas (Yoritaka et al., 1996; Sayre et al., 1997). O processo apoptótico na doença de Alzheimer está associado com a ativação dependente de estresse oxidativo de vias de sinalização, e o HNE e o H_2O_2 estão diretamente relacionados com estas vias (Tamagno et al., 2003). Por outro lado, o HNE sob

condições não-tóxicas, curiosamente também ativa mecanismos contra efeitos citotóxicos (Uchida, 2003).

No presente estudo, também foi encontrado um aumento na expressão da Akt total 7 dias após a transecção nervosa. Esse achado enfatiza que o período de uma semana após a axotomia representa uma fase crítica na qual a medula espinal está mais exposta ao estresse oxidativo, pois neste momento houve um aumento na concentração de H_2O_2 e na formação de proteínas oxidadas pelo HNE. Assim, a elevação na expressão da Akt total pode significar um aumento na síntese protéica da Akt com o objetivo de proteger as células.

A ativação da Akt geralmente resulta da estimulação da PI3K, e a ativação desta cascata de sinalização é um importante estímulo para evitar a apoptose neuronal. Esse efeito é devido à fosforilação e inativação da Bad, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, que por sua vez, evita a ativação da caspase e a morte celular (Alessi & Cohen, 1998). As EAO, como o H_2O_2 , estimulam a fosforilação da Akt, o que fornece um sinal para proteger as células contra o estresse oxidativo (Wang et al., 2000). Por outro lado, a administração de *scavengers* de radicais livres inibiu a expressão de genes pró-apoptóticos na medula espinal em ratos submetidos à compressão do nervo ciático (Siniscalco et al., 2007). No presente estudo, os animais submetidos à denervação apresentaram um aumento na expressão da fosfo-Akt na medula espinal lombossacral nos períodos de 1, 3 e 7 dias após a axotomia, mas 15 dias após a secção nervosa, a expressão da Akt já havia retornado aos níveis basais. Essas mudanças na expressão da fosfo-Akt possivelmente estão relacionadas a um aumento na suscetibilidade das células ao dano oxidativo como demonstrado neste trabalho por um aumento na concentração de H_2O_2 e formação de proteínas modificadas pelo HNE. Em outros estudos, o aumento da fosforilação da Akt ocorre em estágios precoces da transmissão da dor (Bonnington & McNaughton, 2003) na

lesão nervosa periférica (Xu et al., 2007) e na dor causada por injeção de capsaicina (Pezet et al., 2005). Nesses estudos, a inibição da via PI3K/Akt reduziu a hiperalgesia. Assim, esses resultados demonstram que a cascata de sinalização que envolve a Akt está relacionada ao aumento da sensação de dor, e talvez contribua para o desenvolvimento da dor neuropática.

Os sinais que ativam a Akt na transmissão da dor são desconhecidos. Os fatores de crescimentos provavelmente estão envolvidos nessa ação. É bem estabelecido que as neurotrofinas ligam-se ao mesmo receptor tirosina cinase que ativa diferentes vias de sinalização, incluindo a PI3K/Akt (Malik-Hall et al., 2005; Chao et al., 2006) e os fatores de crescimentos tem sua expressão aumentada nas condições de dor (Pezet & McMahon, 2006). A hipótese da participação de EAO como sinalizadores intracelulares anti-apoptóticos em diferentes tecidos tem sido bastante difundida (Droge, 2002; Finkel, 2003; Das & Maulik, 2004; Valko et al., 2007). Assim, o envolvimento de EAO como o H_2O_2 , ou de produtos da lipoperoxidação como o HNE, na ativação das vias de sinalização intracelular no processamento nociceptivo também é possível. Em células endoteliais cerebrais, o ânion superóxido e o H_2O_2 ativaram a via PI3K/Akt e a administração de antioxidantes inibiram a fosforilação da Akt, mostrando que as EAO contribuem para a ativação desta proteína cinase (Schreibelt et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a oxidação de proteínas está envolvida na fosforilação da Akt e na neuroproteção em neurônios em cultura (Delgado-Esteban et al., 2007). De acordo com isso, na transmissão da informação dolorosa, o papel das EAO como segundos mensageiros que ativam a via da Akt pode ser sugerida, pois foi demonstrado o aumento na concentração de H_2O_2 e a formação de proteínas modificadas pelo HNE no modelo de dor empregado no presente estudo.

Portanto, moléculas como H_2O_2 e o HNE podem ativar a via da Akt com o objetivo de promover a sobrevivência celular, e neste caso, não serem compostos necessariamente lesivos, mas, ao invés disso, atuarem como agentes sinalizadores intracelulares nas células nervosas. A ocorrência de apoptose no corno dorsal espinal em situações de dor neuropática não está totalmente estabelecida na literatura. Alguns autores demonstram a existência de apoptose (Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005), enquanto outros apresentam evidências contrárias a estes eventos de morte celular na medula espinal em resposta à lesão nervosa periférica (Polgár et al., 2004; Polgár et al., 2005). O tipo de lesão realizada parece ser fundamental para o estabelecimento do processo apoptótico, pois foi demonstrado que a secção parcial ou a compressão do nervo ciático determinam apoptose no corno dorsal espinal (Moore et al., 2002), enquanto que a secção completa do nervo ciático não provoca este efeito (Conggshall et al., 2001; Moore et al., 2002). De qualquer forma, a ativação da Akt, demonstrada no presente estudo, pode ser um ponto crucial na sobrevivência neuronal após a axotomia.

Assim, a Akt está relacionada com os comportamentos relacionados à dor, mas seu papel na sobrevivência celular não pode ser descartado. Além da regulação pós-traducional dos receptores pró-nociceptivos e outras moléculas relacionadas à dor no gânglio da raiz dorsal e corno dorsal espinal, as proteínas cinases podem interferir na expressão gênica (Woolf & Costigan, 1999). A cascata da MAPK tem sido sugerida interferir na expressão gênica na dor neuropática por fosforilar o fator de transcrição CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico). Isso pode estar relacionado com um aumento na expressão de receptores ou neurotransmissores e neuromoduladores (Song et al., 2005). Porém, não existem estudos que demonstrem correlação entre a ativação da Akt e a expressão gênica em situações de dor. Entretanto, devido ao papel bem estabelecido da Akt

na sobrevivência celular (Manning & Cantley, 2007), e a interrelação entre a cascata das MAPKs nas condições de dor (Malik-Hall et al., 2005), pode-se supor que a Akt possa estar agindo na medula espinal ativando ou aumentando a expressão gênica de moléculas que intensificam a transmissão da dor. Entretanto, essa sinalização pode ser favorável devido ao caráter protetor da sensação dolorosa, isto é, após uma estimulação nociva, a redução no limiar nociceptivo pode evitar lesão adicional.

CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho pode-se concluir que:

- A atividade de enzimas antioxidantes é modificada em situações de dor. A catalase e a GPx apresentam uma resposta inespecífica à lesão neuropática, pois os animais sham também mostraram alterações na atividade destas enzimas. A SOD, por outro lado, reduziu exclusivamente nos animais denervados, o que confirma o envolvimento dos sistemas relacionados ao estresse oxidativo no processamento da dor neuropática.
- A dor neuropática induz um aumento na lipoperoxidação, evidenciado pela expressão de proteínas modificadas pelo HNE na medula espinal.
- O NO pode ser um dos responsáveis pela formação de radicais livres na medula espinal após a secção do nervo ciático, pois a expressão da nNOS encontra-se aumentada uma semana após a lesão.
- O aumento da expressão da Akt fosforilada, bem como da Akt total, sugere que na dor neuropática são ativados mecanismos de proteção celular, o que pode impedir a apoptose na medula espinal.
- As mudanças relacionadas aos marcadores de estresse oxidativo e sistemas antioxidantes podem exercer um papel na ativação de mecanismos de sinalização intracelular na medula espinal. Essas moléculas parecem ser mais importantes nesse aspecto do que no estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo em resposta à lesão periférica. As alterações observadas possivelmente são integrantes de mecanismos neuroprotetores.

PERSPECTIVAS

Embora os resultados indiquem a participação de EAO em vias de sinalização intracelular após a lesão nervosa periférica, estudos complementares são necessários para esclarecer esta questão. Nesse contexto, os experimentos a serem desenvolvidos por este grupo de pesquisa enfocarão:

- a utilização de outros modelos de dor neuropática, como compressão e secção parcial nervosa periférica;
- a avaliação de outros antioxidantes nas situações de dor neuropática, como por exemplo, o ascorbato;
- a análise de outros componentes das vias de sinalização intracelular da Akt, como PI3K e GSK-3;
- a verificação do envolvimento de moléculas relacionadas à apoptose, como o fator indutor de apoptose em modelos de dor neuropática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahern, G.P.; Klyachko, V.A.; Jackson, M.B. (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.*, **25**(10): 510-517.
- Aimar, P.; Pasti, L.; Carmignoto, G.; Merighi, A. (1998). Nitric oxide-producing islet cells modulate the release of sensory neuropeptides in the rat substantia gelatinosa. *J. Neurosci.*, **18**: 10375-10388.
- Alessi, D.R.; Cohen, P. (1998). Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**(1): 55-62.
- Aley, K.O.; McCarter, G.; Levine, J.D. (1998). Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neurosci.*, **18**(17): 7008-7014.
- Altindag, O.; Celik, H. (2006). Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia. *Redox Rep.*, **11**(3): 131- 135.
- Bagis, S.; Tamer, L.; Sahin, G.; Bilgin, R.; Guler, H.; Ercan, B.; Erdogan, C. (2005). Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatol. Int.*, **25**(3): 188-190.
- Bayir, H.; Kagan, V.E.; Clark, R.S.; Janesko-Feldman, K.; Rafikov, R.; Huang, Z.; Zhang, X.; Vagni, V.; Billiar, T.R.; Kochanek, P.M. (2007). Neuronal NOS-mediated nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in brain after experimental and human brain injury. *J. Neurochem.*, **101**(1): 168-181.
- Boll, M.C.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Montes, S.; Murillo-Bonilla, L.; Rios, C. (2003). Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochem. Res.*, **28**: 699-703.
- Bonnington, J.K.; McNaughton, P.A. (2003). Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J. Physiol.*, **551** (2): 433-446.
- Buege, J.A.; Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **52**: 302-310.
- Byers, M.R.; Bonica, J.J. (2001). Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Chapman, R.; Turk, D.C. (eds). *Bonica's management of pain*, Lippincott Williams & Wilkins, 26-72.
- Calabrese, V.; Mancuso, C.; Calvani, M.; Rizzarelli, E.; Butterfield, D.A.; Stella, A.M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**(10):766-775.

- Callsen-Cencic, P.; Hoheisel, U.; Kaske, A.; Mense, S.; Tenschert S. (1999). The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or downregulated? *Cell Tissue Res.*, **295**(2): 183-194.
- Campbell, J.N.; Meyer, R.A. (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, **52**(1): 77-92.
- Chan, T.O.; Tschlis, P.N. (2001). PDK2: a complex tail in one Akt. *Science STKE*. (66): PE1.
- Chao, M.V.; Rajagopal, R.; Lee, F.S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci. (Lond.)*, **110**(2): 167-173.
- Cizkova, D.; Lukacova, N.; Marsala, M.; Marsala, J. (2002). Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Res. Bull.*, **58**: 161-171.
- Coderre, T.J.; Melzack, R. (1991). Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.*, **131**(1): 71-74.
- Coggeshall, R.E.; Lekan, H.A.; White, F.A.; Woolf, C.J. (2001). A-fiber sensory input induces neuronal cell death in the dorsal horn of the adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, **435**(3): 276-82.
- Cosentino, F.; Katusic, Z.S. (1995). Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*, **91**: 139-144.
- Costigan, M.; Scholz, J.; Samad, T.; Woolf, C.J. (2006). Pain. In: Siegel, G.J.; Albers, R.W.; Brady, S.T.; Price, D.L. (eds). *Basic neurochemistry*, Academic Press, 7^a ed., 928-937.
- Crisp, T.; Minus, T.O.; Coleman, M.L.; Giles, J.R.; Cibula, C.; Finnerty, E.P. (2006). Aging, peripheral nerve injury and nociception: effects of the antioxidant 16-desmethylnitrazepam. *Behav. Brain Res.*, **166**(1): 159-165.
- Cruccu, G. (2007). Treatment of painful neuropathy. *Curr. Opin. Neurol.*, **20**(5):531-535.
- Dai, Y.; Iwata, K.; Fukuoka, T.; Kondo, E.; Tokunaga, A.; Yamanaka, H.; Tachibana, T.; Liu, Y.; Noguchi, K. (2002). Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J. Neurosci.*, **22**(17): 7737-7745.
- Das, D.K; Maulik, N. (2004). Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochemistry (Mosc.)*, **69**(1): 10-17.

- Datta, S.R.; Brunet, A.; Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.*, **13**(22): 2905-2927.
- Delgado-Esteban, M.; Martin-Zanca, D.; Andres-Martin, L.; Almeida, A.; Bolaños, J.P. (2007). Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway. *J. Neurochem.*, **102**(1): 194-205.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, **82**(1): 47-95.
- Dubner, R. (1983). Pain research in animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **75**: 128-132.
- Dugan, L.; Kim-Han, J.S. (2006). Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: Siegel, G.J.; Albers, R.W.; Brady, S.T.; Price, D.L. (eds). *Basic neurochemistry*, Academic Press, 7^a ed., 559-573.
- Edwards, T.M.; Rickard, N.S. (2007). New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **31**(3): 413-425.
- Filogamo, G.; Biasol, S.; Recluta, E.; Vercelli, A. (2002). Increase in the number of NADPH-diaphorase-positive neurons in the lumbar dorsal root ganglia following lipopolysaccharide exposure of the sciatic nerve. *Morphologie*, **86**: 27-30.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**: 239-247.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **15**(2): 247-254.
- Frebel, K.; Wiese, S. (2006). Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**(6): 1287-1290.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, **201**(8): 1203-1209.
- Gabbita, S.P.; Robinson, K.A.; Stewart, C.A.; Floyd, R.A.; Hensley, K. (2000). Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arq. Biochem. Biophys.*, **376**: 1-13.
- Gagliese, L.; Melzack, R. (1997). Chronic pain in elderly people. *Pain*, **70**(1): 3-14.
- Gilgun-Sherki, Y.; Rosenbaum, Z.; Melamed, E.; Offen, D. (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol. Rev.*, **54**(2): 271-284.

- Guan, Y.; Yaster, M.; Raja, S.N.; Tao, Y.X. (2007). Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol. Pain*, **3**: 29.
- Guo, S.W.; Liu, M.G.; Long, Y.L.; Ren, L.Y.; Lu, Z.M.; Yu, H.Y.; Hou, J.F.; Li, H.; Gao, C.Y.; Cui, X.Y.; An, Y.Y.; Li, J.; Zhao, L.F.; Chen, J. (2007). Region- or state-related differences in expression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in naïve and pain-experiencing rats. *BMC Neurosci.*, **8**: 53.
- Haley, J.E.; Sullivan, A.F.; Dickenson, A.H. (1990). Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res.*, **518**(1): 218-26.
- Hillered, L.; Valtysson, J.; Enblad, P.; Persson, L. (1998). Interstitial glycerol as a marker for membrane phospholipid degradation in the acutely injured human brain. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **64** (4): 486-491.
- Hucho, T.; Levine, J.D. (2007). Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*, **55**(3): 365-376.
- Infante, C.; Díaz, M.; Hernández, A.; Constandil, L.; Pelissier, T. (2007). Expression of nitric oxide synthase isoforms in the dorsal horn of monoarthritic rats: effects of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists. *Arthritis Res. Ther.*, **9**(3): R53.
- Ji, R.R.; Baba, H.; Brenner, G.J.; Woolf, C.J. (1999). Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat. Neurosci.*, **2**(12): 1114-1119.
- Ji, R.R.; Befort, K.; Brenner, G.J.; Woolf, C.J. (2002). ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J. Neurosci.*, **22**(2): 478-485.
- Ji, R.R.; Kawasaki, Y.; Zhuang, Z.Y.; Wen, Y.R.; Decosterd, I. (2006). Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol.*, **2**(4): 259-269.
- Kavaliers, M. (1988). Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.*, **21**: 923-931.
- Khalil, Z.; Liu, T.; Helme, R.D. (1999). Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular response and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain*, **79**: 31-37.
- Khalil, Z.; Khodr, B. (2001). A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Rad. Biol. Med.*, **31**: 430-439.

- Khattab, M.M. (2006). TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *Eur. J. Pharmacol.*, **548**(1): 167-173.
- Kim, D.; Chung, J. (2002). Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**(1): 106-115.
- Kim, H.K.; Park, S.K.; Zhou, J.L.; Taglialatela, G.; Chung, K.; Coggeshall, R.E.; Chung, J.M. (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, **111**(1): 116-124.
- Kim, H.K.; Kim, J.H.; Gao, X.; Zhou, J.L.; Lee, I.; Chung, K.; Chung, J.M. (2006). Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain*, **122**(1): 53-62.
- Kruman, I.I.; Mattson, M.P. (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.*, **72**(2): 529-540.
- Laughlin, T.M.; Kitto, K.F.; Wilcox, G.L. (1998). Redox manipulation of NMDA receptors in vivo: alteration of acute pain transmission and dynorphin-induced allodynia. *Pain*, **80**(1): 37-43.
- Lee, D.H.; Singh, J.P.; Lodge, D. (2005). Experiments with nitric oxide synthase inhibitors in spinal nerve ligated rats provide no evidence of a role for nitric oxide in neuropathic mechanical allodynia. *Neurosci. Lett.*, **385**(3): 179-183.
- Lee, I.; Kim, H.K.; Kim, J.H.; Chung, K.; Chung, J.M. (2007). The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain*, **133**(1): 9-17.
- Lei, G.; Xia, Y.; Johnson, K.M. (2007). The role of Akt-GSK-3beta signaling and synaptic strength in phencyclidine-induced neurodegeneration. *Neuropsychopharmacology*, publicação online em 18 de julho. doi: 10.1038/sj.npp.1301511.
- Lerouet, D.; Beray-Berthet, V.; Palmier, B.; Plotkine, M.; Margail, I. (2002). Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.*, **958**: 166-175.
- Levy, D.; Zochodne, D.W. (2004). NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Pract.*, **4**(1): 11-18.
- Liu, T.; Knight, K.R.; Tracey, D.J. (2000). Hyperalgesia due to nerve injury-role of peroxynitrite. *Neuroscience*, **97**(1): 125-131.
- Liu, P.H.; Yang, L.H.; Wang, T.Y.; Wang, Y.J.; Tseng, G.F. (2006). Proximity of lesioning determines response of facial motoneurons to peripheral axotomy. *J. Neurotrauma*, **23**(12): 1857-1873.

- Luo, Z.D.; Chaplan, S.R.; Scott, B.P.; Cizkova, D.; Calcutt, N.A.; Yaksh, T.L. (1999). Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J. Neurosci.*, **19**(21): 9201-9208.
- Ma, W.; Zheng, W.H.; Belanger, S.; Kar, S.; Quirion, R. (2001). Effects of amyloid peptides on cell viability and expression of neuropeptides in cultured rat dorsal root ganglion neurons: a role for free radicals and protein kinase C. *Eur. J. Neurosci.*, **13**: 1125-1135.
- Macmillan-Crow, L.A.; Cruthirds, D.L. (2001). Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.*, **34**(4): 325-336.
- Malecki, A.; Garrido, R.; Mattson, M.P.; Hennig, B.; Toborek, M. (2000). 4-hydroxynonenal induces oxidative stress and death of cultured spinal cord neurons. *J. Neurochem.*, **74**(6): 2278-2287.
- Malik-Hall, M.; Dina, O.A.; Levine, J.D. (2005). Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.*, **21**(12): 3387-3394.
- Manning, B.D.; Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, **129**(7): 1261-1274.
- Meller, S.T.; Pechman, P.S.; Gebhart, G.F.; Maves, T.J. (1992). Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience*, **50**(1): 7-10.
- Meller, S.T.; Gebhart, G.F. (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, **52**(2): 127-136.
- Merskey, H.; Bogduk, N. (1994). Classification of Chronic Pain - Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, Seattle, IASP Press. 2^a ed.
- Millan, J.M. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, **57**: 1-164.
- Moore, K.; Roberts, L.J. 2nd. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.*, **28**(6): 659-671.
- Moore, K.A.; Kohno, T.; Karchewski, L.A.; Scholz, J.; Baba, H.; Woolf, C.J. (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci.*, **22**(15): 6724-6731.
- Muscoli, C.; Mollace, V.; Wheatley, J.; Masini, E.; Ndengele, M.; Wang, Z.Q.; Salvemini, D. (2004). Superoxide-mediated nitration of spinal manganese superoxide dismutase: a novel pathway in N-methyl-D-aspartate-mediated hyperalgesia. *Pain*, **111**(1): 96-103.

- Naik, A.K.; Tandan, S.K.; Dudhgaonkar, S.P.; Jadhav, S.H.; Kataria, M.; Prakash, V.R.; Kumar, D. (2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur. J. Pain.*, **10**(7): 573-579.
- Novak, J.C.; Lovell, J.A.; Stuesse, S.L.; Cruce, W.L.; McBurney, D.L.; Crisp, T. (1999). Aging and neuropathic pain. *Brain Res.*, **833**(2): 308-310.
- Obata, K.; Noguchi, K. (2004). MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.*, **74**(21): 2643-2653.
- O'Rielly, D.D.; Loomis, C.W. (2006). Increased expression of cyclooxygenase and nitric oxide isoforms, and exaggerated sensitivity to prostaglandin E2, in the rat lumbar spinal cord 3 days after L5-L6 spinal nerve ligation. *Anesthesiology*, **104**(2): 328-337.
- Osborne, M.G.; Coderre, T.J. (1999). Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, **126** (8): 1840- 1846.
- Park, E.S.; Gao, X.; Chung, J.M.; Chung, K. (2006). Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.*, **391**(3): 108-111.
- Peineau, S.; Taghibiglou, C.; Bradley, C.; Wong, T.P.; Liu, L.; Lu, J.; Lo, E.; Wu, D.; Saule, E.; Bouschet, T.; Matthews, P.; Isaac, J.T.; Bortolotto, Z.A.; Wang, Y.T.; Collingridge, G.L. (2007). LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron*, **53**(5): 703-717.
- Petersen, D.R.; Doorn, J.A. (2004). Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**(7): 937-945.
- Pezet, S.; McMahon, S.B. (2006). Neurotrophins: mediators and modulators of Pain. *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**: 507-538.
- Pezet, S.; Spyropoulos, A.; Williams, R.J.; McMahon, S.B. (2005). Activity-dependent phosphorylation of Akt/PKB in adult DRG neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **21** (7): 1785-1797.
- Polgár, E.; Gray, S.; Riddell, J.S.; Todd, A.J. (2004). Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain*, **111**(1-2): 144-150.
- Polgár, E.; Hughes, D.I.; Arham, A.Z.; Todd, A.J. (2005). Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J. Neurosci.*, **25**(28): 6658-6666.

- Porro, C.A.; Cavazzuti, M.; Galetti, A.; Sassatelli, L. (1991). Functional activity mapping of the rat brainstem during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience*, **41**(2): 667-680.
- Price, D.D.; Mao, J.R.; Coghill, R.C.; d'Avella, D.; Cicciarello, R.; Fiori, M.G.; Mayer, D.J.; Hayes, R.L. (1991). Regional changes in spinal cord glucose metabolism in a rat model of painful neuropathy. *Brain Res.*, **564**(2): 314-318.
- Radi R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(12): 4003-4008.
- Radi, R.; Cassina, A.; Hodara, R.; Quijano, C.; Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.*, **33**: 1451-1464.
- Rogério, F.; Teixeira, S.A.; de Rezende, A.C.; de Sa, R.C.; Queiroz, L.; De Nucci, G.; Muscara, M.N.; Langone, F. (2005). Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **154**: 217-225.
- Rokyta, R.; Holecek, V.; Pekárkova, I.; Krejcová, J.; Racek, J.; Trefil, L.; Yamamotoová, A. (2003). Free radicals after painful stimulation are influenced by antioxidants and analgesics. *Neuro Endocrinol. Lett.*, **24**(5): 304-309.
- Rosenfeld, J.; Cook, S.; James, R. (1997). Expression of superoxide dismutase following axotomy. *Exp. Neurol.*, **147**: 37-47.
- Rydh-Rinder, M.; Holmberg, K.; Elfvin, L.G.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hokfelt, T. (1996). Effects of peripheral axotomy on neuropeptides and nitric oxide synthase in dorsal root ganglia and spinal cord of the guinea pig: an immunohistochemical study. *Brain Res.*, **707**(2): 180-188.
- Sah, R.; Galeffi, F.; Ahrens, R.; Jordan, G.; Schwartz-Bloom, R.D. (2002). Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J. Neurochem.*, **80** (3): 383-391.
- Salter, M.; Strijbos, P.J.; Neale, S.; Duffy, C.; Follenfant, R.L.; Garthwaite, J. (1996). The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. *Neuroscience*, **73**(3): 649-655.
- Salvemini, D.; Doyle, T.M.; Cuzzocrea, S. (2006). Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**(5): 965-970.
- Sammons, M.J.; Raval, P.; Davey, P.T.; Rogers, D.; Parsons, A.A.; Bingham, S. (2000). Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res.*, **876**(1): 48-54.

- Sas, K.; Robotka, H.; Toldi, J.; Vecsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.*, **257**(1): 221-239.
- Sayre, L.M.; Zelasko, D.A.; Harris, P.L.; Perry, G.; Salomon, R.G.; Smith, M.A. (1997). 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **68**(5): 2092-2097.
- Schadrack, J.; Neto, F.L.; Ableitner, A.; Castro-Lopes, J.M.; Willoch, F.; Bartenstein, P.; Zieglgänsberger, W.; Tölle, T.R. (1999). Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience*, **94**(2): 595-605.
- Schaible, H.G.; Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch. Surg.*, **389**(4): 237-243.
- Scholz, J.; Broom, D.C.; Youn, D.H.; Mills, C.D.; Kohno, T.; Suter, M.R.; Moore, K.A.; Decosterd, I.; Coggeshall, R.E.; Woolf, C.J. (2005). Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J. Neurosci.*, **25**(32): 7317-7323.
- Scholz, J.; Woolf, C.J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.*, **10**(11): 1361-1368.
- Schreibelt, G.; Kooij, G.; Reijkerkerk, A.; van Doorn, R.; Gringhuis, S.I.; van der Pol, S.; Weksler, B.B.; Romero, I.A.; Couraud, P.O.; Piontek, J.; Blasig, I.E.; Dijkstra, C.D.; Ronken, E.; de Vries, H.E. (2007). Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J.*, **21**(13): 3666-3676.
- Seger, R.; Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, **9**(9): 726-735.
- Siniscalco, D.; Fuccio, C.; Giordano, C.; Ferraraccio, F.; Palazzo, E.; Luongo, L.; Rossi, F.; Roth, K.A.; Maione, S.; de Novellis, V. (2007). Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. *Pharmacol. Res.*, **55**(2): 158-166.
- Sommer, C.; Myers, R.R. (1995). Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol.*, **90**: 478-485.
- Song, X.S.; Cao, J.L.; Xu, Y.B.; He, J.H.; Zhang, L.C.; Zeng, Y.M. (2005). Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, **26**(7): 789-798.
- Straub, V.A.; Grant, J.; O'Shea, M.; Benjamin, P.R. (2007). Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide. *J. Neurophysiol.*, **97**(2): 1088-1099.

- Suzuki, M.; Tabuchi, M.; Ikeda, M.; Tomita, T. (2002). Concurrent formation of peroxynitrite with the expression of inducible nitric oxide synthase in the brain during middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats. *Brain Res.*, **951**(1): 113-120.
- Sun, R.; Yan, J.; Willis, W.D. (2007). Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats. *Neuroscience*, **144**(1): 286-294.
- Takahashi, A.; Mikami, M.; Yang, J. (2007). Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP3 receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **25**(3): 705-716.
- Tal, M. (1996). A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neuroreport*, **7**(8): 1382-1384.
- Tamagno, E.; Robino, G.; Obbili, A.; Bardini, P.; Aragno, M.; Parola, M.; Danni, O. (2003). H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp. Neurol.*, **180**(2): 144-155.
- Taylor, J.M.; Ali, U.; Iannello, R.C.; Hertzog, P.; Crack, P.J. (2005). Diminished Akt phosphorylation in neurons lacking glutathione peroxidase-1 (GPx1) leads to increased susceptibility to oxidative stress-induced cell death. *J. Neurochem.*, **92**(2): 283-293.
- Todorovic, S.M.; Jevtovic-Todorovic, V.; Meyenburg, A.; Mennerick, S.; Perez-Reyes, E.; Romano, C.; Olney, J.W.; Zorumski, C.F. (2001). Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron*, **31**(1): 75-85.
- Tohda, C.; Nakanishi, R.; Kadowaki, M. (2007). Learning deficits and agenesis of synapses and myelinated axons in phosphoinositide-3 kinase-deficient mice. *Neurosignals*, **15**(6): 293-306
- Trevisani, M.; Siemens, J.; Materazzi, S.; Bautista, D.M.; Nassini, R.; Campi, B.; Imamachi, N.; Andre, E.; Patacchini, R.; Cottrell, G.S.; Gatti, R.; Basbaum, A.I.; Bunnett, N.W.; Julius, D.; Geppetti, P. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(33): 13519-13524.
- Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.*, **42**(4): 318-343.
- Ulfenius, C.; Linderöth, B.; Meyerson, B.A.; Wallin, J. (2006). Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci. Lett.*, **399**(1): 85-90.
- Urban, L.; Thompson, S.W.N.; Dray, A. (1994). Modulation of spinal excitability: cooperation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci.*, **17**(10): 432-438.

- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **39**(1): 44-84.
- Vanotti, A.; Osio, M.; Mailland, E.; Nascimbene, C.; Capiluppi, E.; Mariani, C. (2007). Overview on pathophysiology and newer approaches to treatment of peripheral neuropathies. *CNS Drugs*, **21**(1): 3-12.
- Vauzour, D.; Vafeiadou, K.; Rice-Evans, C.; Williams, R.J.; Spencer, J.P. (2007). Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J. Neurochem.*, **103**(4): 1355-1367.
- Vetter, G.; Geisslinger, G.; Tegeder, I. (2001). Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E₂ and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain*, **92**: 213-218.
- Viggiano, A.; Monda, M.; Viggiano, A.; Viggiano, D.; Viggiano, E.; Chiefari, M.; Aurilio, C.; De Luca, B. (2005). Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. *Brain Res.*, **1050**(1): 72-78.
- Wagner, R.; Heckman, H.M.; Myers, R.R. (1998). Wallerian degeneration and hyperalgesia after peripheral nerve injury are glutathione-dependent. *Pain*, **77**: 173-179.
- Wang, Q.; Liu, L.; Pei, L.; Ju, W.; Ahmadian, G.; Lu, J.; Wang, Y.; Liu, F.; Wang, Y.T. (2003). Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron*, **38**(6): 915-928.
- Wang, S.; Teschemacher, A.G.; Paton, J.F.; Kasparov, S. (2006). Mechanism of nitric oxide action on inhibitory GABAergic signaling within the nucleus tractus solitarii. *FASEB J.*, **20**(9): 1537-1539.
- Wang, Z.Q.; Porreca, F.; Cuzzocrea, S.; Galen, K.; Lightfoot, R.; Masini, E.; Muscoli, C.; Mollace, V.; Ndengele, M.; Ischiropoulos, H.; Salvemini, D. (2004). A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309** (3): 869-878.
- Wang, X.; McCullough, K.D.; Franke, T.F.; Holbrook, N.J. (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.*, **275**(19): 14624-14631.
- Warner, D.S.; Sheng, H.; Batinić-Haberle, I. (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J. Exp. Biol.*, **207**(18): 3221-3231.
- Watkins, L.R.; Maier, S.F. (2000). The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu. Rev. Psychol.*, **51**: 29-57.
- Watkins, L.R.; Milligan, E.D.; Maier, S.F. (2001). Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.*, **24**(8): 450-455.

- Woolf, C.J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, **306** (5944): 686-688.
- Woolf, C.J.; Thompson, S.W. (1991). The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*, **44**(3): 293-299.
- Woolf, C.J.; Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(14): 7723-7730.
- Wu, S.C.; Wrobel, J.S.; Armstrong, D.G. (2007). Assessing the impact of pharmacologic intervention on the quality of life in diabetic peripheral neuropathic pain and fibromyalgia. *Pain Med.*, **8**(2): S33-S42.
- Xie, C.; Lovell, M.A.; Markesbery, W.R. (1998). Glutathione transferase protects neuronal cultures against four hydroxynonenal toxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, **25**(8): 979-988.
- Xu, L.; Mabuchi, T.; Katano, T.; Matsumura, S.; Okuda-Ashitaka, E.; Sakimura, K.; Mishina, M.; Ito, S. (2007). Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide*, **17** (1): 18-24.
- Yang, L.; Zhang, F.X.; Huang, F.; Lu, Y.J.; Li, G.D.; Bao, L.; Xiao, H.S.; Zhang, X. (2004). Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **19**(4): 871-883.
- Yoneda, T.; Inagaki, S.; Hayashi, Y.; Nombra, T.; Takagi, H. (1992). Differential regulation of manganese and copper/zinc superoxide dismutases by the facial nerve transection. *Brain Res.*, **582**: 342-345.
- Yoritaka, A.; Hattori, N.; Uchida, K.; Tanaka, M.; Stadtman, E.R.; and Mizuno, Y. (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** (7): 2696-2701.
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, **74**: 139-162.
- Yu, W.H. (2002). Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with CuZn-superoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **962**: 111-121.
- Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, **429**: 23-37.