

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**PARTICIPAÇÃO DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES E DE
SINALIZAÇÃO INTRACELULAR NOS MECANISMOS
CENTRAIS APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LIDIANE DAL BOSCO

Porto Alegre, 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**PARTICIPAÇÃO DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES E DE
SINALIZAÇÃO INTRACELULAR NOS MECANISMOS
CENTRAIS APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Dissertação 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 Mestre.

LIDIANE DAL BOSCO

Orientadora: Wania Aparecida Partata

Porto Alegre, 2010.

“No fim tudo dá certo...
Se não deu certo,
é porque ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Wania Aparecida Partata, pela orientação exemplar, que sempre me motivou a seguir em frente, pelos ensinamentos decisivos na minha formação como aluna e também como pessoa e pela confiança em mim depositada.

Aos queridos Renata e Luciano, que sempre me inspiraram, pela ajuda em muitos momentos importantes e pela amizade construída nestes anos.

À Professora Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro, pela perseverança com os experimentos e disposição em ouvir e aconselhar.

À equipe do professor Carlos Severo Dutra Filho, especialmente à aluna Carolina Didonet Pederzoli, por tornar possível a parceria de experimento e pelo indispensável auxílio prestado.

Aos professores do Departamento de Fisiologia pela disponibilidade para resolver questões teóricas e práticas e dedicação em ensinar Fisiologia aos seus alunos.

Ao pessoal do Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio, do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Comparado e do Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral, pela prestatividade e auxílio que possibilitou a realização dos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Comparada, pela compreensão e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho e pela convivência agradável durante todo este tempo.

À minha amiga, conselheira fiel e companheira de experimentos, Taína.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação, especialmente àqueles que ingressaram juntos no curso e que tornaram os encontros e desafios do Mestrado muito mais interessantes.

Àqueles colegas sempre dispostos a ouvir e ajudar, e que ao longo desta convivência se tornaram amigos e confidentes: Daiane, Maria Helena, Nadia e Rafael.

Às colaboradoras Arthiese Korb e Gisele Lovatel pela ajuda decisiva nos testes com os ratos e pela atenção especial antes, durante e depois da realização dos mesmos.

À equipe do Núcleo de Assessoria Estatística da UFRGS, especialmente ao aluno Luciano Guimarães, pela dedicação de tempo e esforços na análise dos resultados.

Às bibliotecárias do ICBS, sempre prestativas e atenciosas.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à Secretaria do PPG-Fisiologia pelos esforços em atender às necessidades dos alunos, especialmente às secretárias Alice e Sílvia.

Ao Marlo, pelo carinho, paciência e compreensão nesta etapa decisiva.

À minha família, por acreditar em mim, e principalmente aos meus pais, por incentivar as minhas escolhas, pela força para enfrentar os desafios, por acreditar na minha capacidade e pelo amor em todos os momentos.

ÍNDICE

RELAÇÃO DAS FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO.....	vii
INTRODUÇÃO	1
Dor e Nocicepção	1
Sistemas antioxidantes e de sinalização celular no processamento nociceptivo	5
OBJETIVOS.....	17
Objetivo geral	17
Objetivos específicos	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

RELAÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Vias nociceptivas da periferia ao SNC.....	3
Figura 2. Esquema das reações e respectivas enzimas envolvidas na formação de ROS e RNS.....	7
Figura 3. Sistema antioxidante da tiorredoxina.....	9
Figura 4. Interação entre a vitamina E e o ácido ascórbico e a relação com a Tiorredoxina Redutase (TrxR).....	11
Figura 5. Via de sinalização do NrF2.....	13
Figura 6. Via de morte celular programada mediada pelo AIF.....	16
Figura 7. Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI).....	20
Figura 8. Mediana do número de respostas ao teste da hipersensibilidade mecânica para os filamentos de Von Frey de 10, 15 e 26 gramas.....	27
Figura 9. Valores do IFI em ratos controle e submetidos à manipulação e secção do nervo isquiático.....	28
Figura 10. Valores de Ácido Ascórbico em medula espinal lombossacral de ratos controle e submetidos à manipulação e secção do nervo isquiático após 3, 7 e 15 dias da lesão.....	29
Figura 11. Atividade das enzimas TrxR e G6PDH em medula espinal lombossacral de ratos controle e submetidos à manipulação e secção do nervo isquiático, após 3, 7 e 15 dias da lesão.....	30
Figura 12. Expressão protéica do NrF2 e do AIF em medula espinal lombossacral de ratos controle e submetidos à manipulação e secção do nervo isquiático após 3, 7 e 15 dias da lesão.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	ácido ascórbico
AIF:	fator de indução de apoptose
AMP cíclico:	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARE:	elemento de resposta ao antioxidante
ASK1:	cinase 1 reguladora do sinal de apoptose
ATP:	trifosfato de adenosina
CAT:	catalase
CMT:	doença de <i>Charcot-Marie-Tooth</i>
CRE:	elemento de resposta ao AMP cíclico
DHA:	ácido dehidroascórbico
DRG:	gânglio da raiz dorsal
GSH:	glutaciona reduzida
GPx:	glutaciona peroxidase
GSSG:	glutaciona oxidada
G6PDH:	glicose-6-fosfato-desidrogenase
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
HNE:	4-hidroxi-2-nonenal
IFI:	Índice funcional do isquiático
Keap1:	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
NADPH:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NADP ⁺ :	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NFκB:	fator nuclear κB
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintase
Nrf2:	fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
O ₂ :	oxigênio molecular
O ₂ ^{•-} :	ânion superóxido
OH [•] :	radical hidroxil
SNC:	sistema nervoso central
SVCT:	transportador de vitamina C dependente de sódio
Trx:	tiorredoxina
TrxR:	tiorredoxina redutase
PARP-1:	poli(ADP-ribose) polimerase 1
PAR:	polímeros de poli(ADP-ribose)
ROS:	espécies reativas de oxigênio
RNS:	espécies reativas de nitrogênio
SOD:	superóxido-dismutase
TBARS:	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

O estudo da dor abrange diferentes modelos e abordagens. A lesão de um nervo periférico está relacionada à ocorrência de dor neuropática e a uma série de alterações neuroquímicas e neuroanatômicas importantes, que se estendem desde o local da injúria nervosa até os territórios de projeção central dos neurônios sensoriais. A medula espinal constitui um dos primeiros centros de processamento da informação nociceptiva, sendo de grande interesse o estudo dos possíveis moduladores neuroquímicos envolvidos neste processo. Dentre estes merecem destaque as espécies reativas de oxigênio (ROS), formadas durante o metabolismo energético celular e que em condições fisiológicas estão em equilíbrio com atividade de sistemas de defesa antioxidante. Em condições de dor neuropática tem se evidenciado um aumento na produção das ROS na medula espinal, decorrentes da diminuição de importantes sistemas antioxidantes e/ou de alterações no metabolismo energético deste tecido nervoso. Também a participação de vias de sinalização celular nos eventos que se seguem à lesão nervosa periférica tem sido descrita. Dentre estes, a ativação de vias de sobrevivência neuronal e também de moléculas pró-apoptóticas. Neste contexto, o presente estudo analisou os efeitos temporais da secção do nervo isquiático sobre as atividades das enzimas tioredoxina redutase (TrxR) e glicose-6-fostato-desidrogenase (G6PDH), quantificação do antioxidante ácido ascórbico (AA), e determinação da expressão do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e do fator de indução de apoptose (AIF) em medula espinal, nos intervalos de 3, 7 e 15 dias após a lesão periférica. Para isso, foram utilizados ratos Wistar, machos e adultos, subdivididos nos grupos controle (sem manipulação experimental), *sham* (sofreram apenas isolamento e manipulação do nervo isquiático) e denervado (submetidos à secção unilateral completa do nervo isquiático), com n=6 para cada grupo. Estes animais foram testados quanto à ocorrência de hipersensibilidade mecânica, pelo teste de Von Frey, e pelo teste da marca das patas, a fim de se obter o índice funcional do isquiático (IFI). Aos 3, 7 e 15 dias foi realizada a decapitação dos animais *sham* e denervado, e paralelamente do grupo controle, para remoção da medula espinal lombossacral que foi submetida às análises bioquímicas e de expressão protéica. Foi demonstrado que aos 3 e 7 dias os animais denervados apresentaram hipersensibilidade ao estímulo mecânico e que a secção do nervo ciático resultou na diminuição do IFI nestes animais em todos os períodos estudados. Já as alterações na atividade das enzimas TrxR e G6PDH ocorreram tanto nos animais denervados como nos *sham*; a TrxR mostrou-se reduzida em todos os períodos experimentais, com uma leve restauração da atividade aos 15 dias nos animais *sham*, mesmo período em que a G6PDH apresentou redução na atividade nos grupos *sham* e denervado. O AA também diminuiu na medula espinal destes animais, nos períodos de 7 e 15 dias. Quanto à expressão protéica, observou-se um aumento na expressão do Nrf2 aos 15 dias da secção do nervo isquiático na fração citoplasmática do tecido nervoso espinal, enquanto o AIF não apresentou variação entre os grupos e períodos experimentais

analisados. Estes resultados evidenciam que tanto a secção do nervo isquiático como a manipulação deste nervo constituem importantes estímulos para a modulação de sistemas enzimáticos e não enzimáticos na medula espinal, os quais podem estar intimamente relacionados às alterações no metabolismo da glicose e ativação de vias de sinalização celular. Neste contexto, o NrF2 parece estar sendo mobilizado para a recuperação da proteção antioxidante da medula espinal. No entanto, são necessárias análises complementares para melhor avaliar a participação deste fator de transcrição em períodos mais recentes, já que não foi evidenciada a indução de apoptose pela via do AIF neste tecido.

INTRODUÇÃO

Dor e Nocicepção

A dor consiste em uma experiência sensorial e emocional desagradável em resposta a um estímulo nocivo ou potencialmente prejudicial ao indivíduo. Este conceito de dor, como definido pela *International Association for the Study of Pain* (IASP), salienta o aspecto emocional desta experiência sensorial, considerando o significativo componente psicológico que envolve a percepção da dor (Byers & Bonica, 2001; D’Mello & Dickenson, 2008). A nocicepção, por sua vez, exerce uma função essencial à vida, alertando ao organismo a ocorrência, ou possibilidade iminente, de dano tecidual e promovendo as respostas fisiológicas e comportamentais necessárias à manutenção da integridade do mesmo (Kavaliers, 1988). No entanto, a sinalização gerada a partir do estímulo nocivo pode variar quanto sua duração e intensidade, podendo exceder seu papel protetor e ocasionar sofrimento ao indivíduo, prejudicando seriamente sua qualidade de vida (Turk & Melzack, 2001).

Uma classificação de dor amplamente utilizada diz respeito a sua duração. A dor associada à lesão tecidual, inflamação ou outro processo patológico de curta duração, independente de sua intensidade, é referida como dor aguda. Enquanto episódios de dor que se estendem de meses a anos, acompanhando doenças ou lesões teciduais não resolvidos num período de tempo esperado, são classificados como dor crônica (Turk & Melzack, 2001). Estima-se que cerca de um sexto da população mundial sofra de um quadro de dor crônica, a qual constitui a razão mais comum para a procura de atendimento médico e uma justificativa para a abstinência no trabalho. Além de ser causa de sofrimento ao paciente, a dor crônica se torna um sério problema de saúde pública (Campbell & Meyer, 2006; Haanpää et al., 2009).

Como modalidade sensorial não homogênea, a dor pode ser agrupada em categorias distintas, como dor fisiológica, inflamatória ou neuropática. A estimulação nociva do tecido intacto causa uma dor considerada fisiológica, devido ao seu caráter protetor. Os receptores envolvidos na detecção do estímulo doloroso são denominados nociceptores, os quais constituem terminações nervosas livres de alto

limiar, que podem ser ativados por estímulos químicos, térmicos e/ou mecânicos (polimodais). A informação sensorial gerada a partir da ativação dos nociceptores é transmitida, através de axônios mielinizados de pequeno calibre (fibras A delta) e axônios não-mielinizados (fibras C) a neurônios do corno dorsal da medula espinal que se projetam ao tálamo e então ao córtex cerebral (Figura 1) (D'Mello & Dickenson, 2008). Esta sinalização sensorial resulta na ativação do reflexo de retirada, bem como de respostas emocionais, autonômicas e neuro-humorais que permitem ao organismo reagir ao estímulo nocivo (Woolf and Salter, 2000; Costigan et al., 2006).

A dor patológica é gerada quando o tecido sofre uma lesão e/ou inflamação tecidual que culmina nos processos de sensibilização periférica e central, importantes mecanismos da dor neuropática e inflamatória. Nestas condições ocorrem alterações em canais iônicos, receptores e vias de sinalização celular, além da liberação de mediadores químicos, tanto no local da lesão como nas regiões do sistema nervoso central (SNC) envolvidas no processamento da dor, intensificando a transmissão nociceptiva (Millan, 1999; Woolf & Salter, 2000). A modulação nas vias centrais da dor se inicia pela ativação dos nociceptores periféricos, ocasionando uma resposta aumentada dos neurônios da via nociceptiva que passam a disparar por mais tempo e dentro de um limiar mais baixo de ativação (Woolf & Salter, 2000). Decorrentes do processo de sensibilização podem surgir alterações sensoriais características da dor patológica, como a hiperalgesia (aumento da sensibilidade aos estímulos potencialmente nocivos) e alodínia (respostas dolorosa aos estímulos considerados inócuos) (Millan, 1999; D'Mello & Dickenson, 2008).

De uma forma geral, os eventos modulatórios da transmissão nociceptiva 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. Nesse contexto enquadra-se o conceito de dor neuropática, o qual foi abordado anteriormente, que é a dor ocasionada em virtude de dano ou de disfunção de um nervo periférico ou de um agrupamento neuronal central (Millan, 1999).

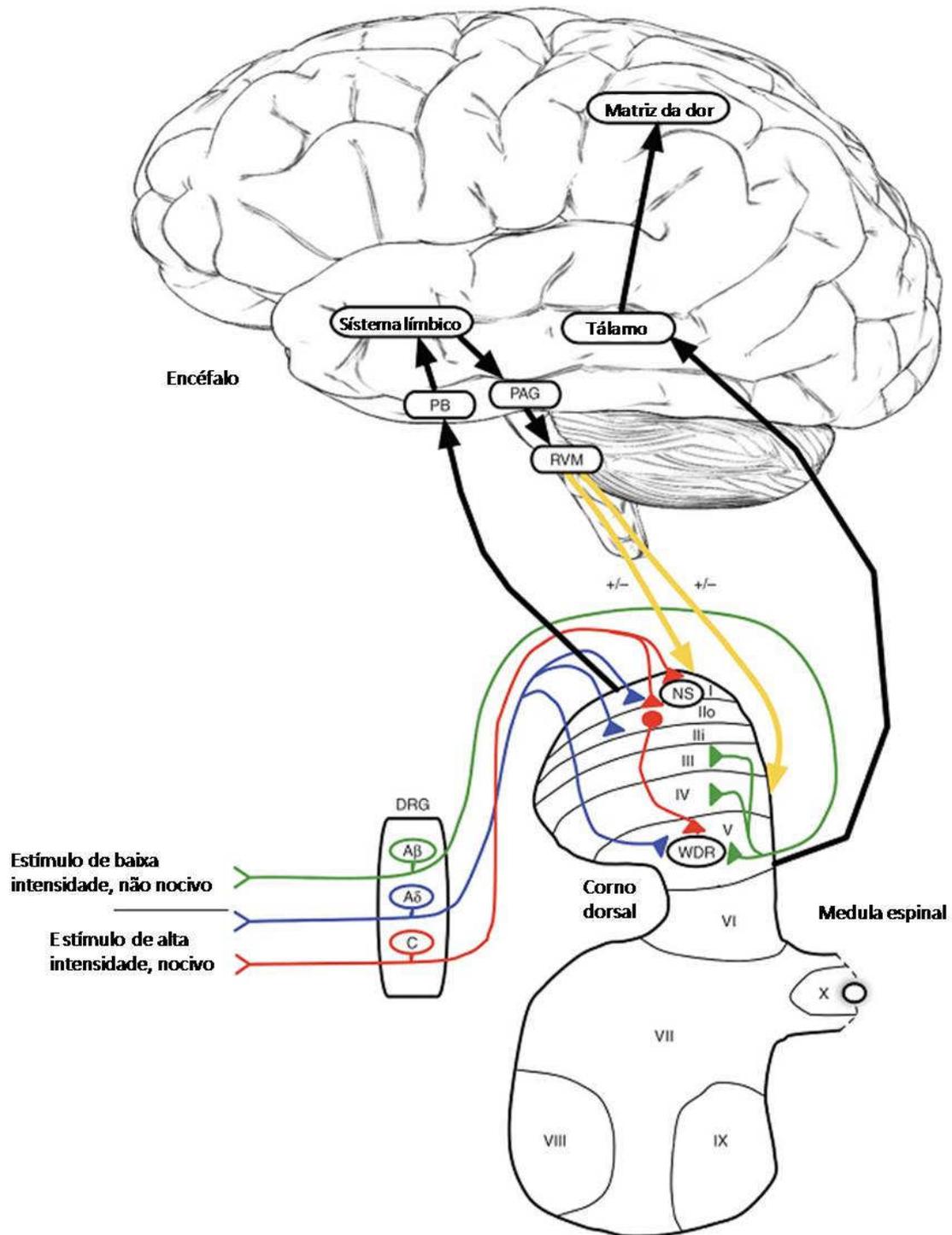


Figura 1. Vias nociceptivas da periferia ao SNC. Fibras aferentes primárias (tipos A β , A δ e C), cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG), transmitem impulsos nervosos da periferia ao corno dorsal da medula espinal. Neurônios de segunda ordem da via nociceptiva (NS) encontram-se principalmente na lâmina superficial do corno dorsal (lâminas I-II), enquanto neurônios de amplo espectro de resposta (WDRs) localizam-se profundamente (lâmina V). Neurônios de projeção da lâmina I inervam áreas como a parabraquial (PB) e substância cinzenta periaquedutal (PAG), as quais se comunicam com o sistema límbico. Deste sistema e da PAG emergem projeções descendentes que se dirigem a núcleos do tronco encefálico, como o bulbo ventromedial rostral (RVM), que modulam o processamento nociceptivo espinal. Neurônios da lâmina V dirigem-se principalmente ao tálamo (trato espinotalâmico) de onde se projetam a várias regiões corticais (córtex somatossensorial primário e secundário, córtices insular, cíngulo anterior e pré-frontal) que compõe a “matriz da dor”. Adaptado de D’Mello e Dickenson, 2008.

O estudo da dor em seres humanos é desafiante para os pesquisadores, pois compreende um inevitável caráter subjetivo, além de ser praticamente e eticamente auto-limitante. Portanto, os modelos animais de dor são amplamente utilizados em estudos comportamentais, farmacológicos e bioquímicos (Mogil, 2009). Neste contexto, o conceito de dor apropriado para animais foi proposto por Zimmermann em 1986, no qual a dor corresponde a “uma experiência sensorial aversiva causada por injúria real ou potencial, que gera reações vegetativas e motoras progressivas, resultando no comportamento aversivo aprendido, e que pode modificar comportamentos espécie-específicos, incluindo interação social”. Para compreensão dos seus mecanismos, os mamíferos não pertencentes à Família Hominidae são os modelos mais empregados e, embora não possuam capacidade de comunicação verbal, quando em contato com estímulos nociceptivos esses animais exibem respostas motoras similares às dos humanos. Tais respostas permitem inferir sobre a existência de dor (Dubner, 1983; Kavaliers, 1988; Le Bars, 2001).

Entre as diversas abordagens para o estudo da dor, podem ser citadas a injúria nervosa periférica e a indução de um processo inflamatório local. A lesão de um nervo periférico pode causar dor neuropática severa. Várias espécies de animais submetidos a situações que comprovadamente resultam em dor neuropática são utilizadas como modelos para o estudo da dor, de seus mecanismos e de sua fisiopatologia (Sommer & Myers, 1995; Zimmermann, 2001). A secção do nervo isquiático resulta em alterações neuroquímicas e neuroanatômicas importantes em neurônios sensoriais primários, bem como em seus territórios de projeção central (Rydh-Rinder et al., 1996; Ma & Bisby, 1998; Zimmermann, 2001). Em consequência da lesão nervosa periférica, ocorrem perdas motora, sensorial e vegetativa do segmento do corpo inervado pelo nervo lesionado, as quais se devem a interrupção da continuidade axonal, degeneração do segmento distal à lesão e, eventualmente, morte de neurônios axotomizados (Navarro et al., 2007). O estudo das alterações bioquímicas e morfológicas no SNC após a lesão nervosa periférica é relevante não apenas para a elucidação dos mecanismos envolvidos no processamento nociceptivo, como também pode contribuir para o entendimento dos eventos relacionados ao déficit das funções

motora, autonômica e sensorial que acomete a região afetada pela injúria nervosa (Cusick, 1996; Chen et al., 2002).

Sistemas antioxidantes e de sinalização celular no processamento nociceptivo

Uma variedade de substâncias é formada e liberada quando o tecido é lesionado, como as prostaglandinas, a bradicinina e a serotonina; enquanto outras são sintetizadas durante os eventos que se seguem à lesão tecidual. O papel destas substâncias se relaciona com os processos inflamatórios e atividade das fibras aferentes primárias (Dray, 1995; Zimmermann, 2001). Além da liberação de substâncias no local da lesão, as quais contribuem para a geração de descargas ectópicas e sensibilização periférica, destaca-se a participação de neurotransmissores e neuromoduladores, como o glutamato e a substância P, no corno dorsal da medula espinal e são responsáveis pelos efeitos excitatórios sobre os neurônios de segunda ordem da via nociceptiva (Byers & Bonica, 2001). O glutamato atua sobre receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), os quais constituem canais iônicos que permitem a passagem de íons Ca^{2+} . O influxo de Ca^{2+} pode promover a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e aumento da produção de óxido nítrico (NO) (Kawamata & Omote, 1999). O NO é uma molécula difusível que atua como mensageiro celular em muitas funções fisiológicas do SNC (Contestabile, 2008). No processamento nociceptivo, o NO atua como mensageiro retrógrado, modulando a atividade de neurônios pré-sinápticos e intensificando o sinal nociceptivo (Levy & Zochodne, 2004; Xu et al., 2007).

Outras moléculas liberadas nesta condição patológica são os radicais livres, amplamente citados como moléculas envolvidas nos processos fisiológicos do envelhecimento (Finkel & Holbrook, 2000), na gênese de várias patologias (Lerouet et al., 2002; Boll et al., 2003), bem como em condições de dor neuropática (Khalil et al., 1999; Khalil & Khodr, 2001; Kim et al., 2004). Entretanto, cabe ressaltar que os radicais livres e outras espécies reativas que não apresentam elétrons desemparelhados em seus orbitais moleculares, classificados como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS) de acordo com o composto químico de que derivam, são produtos do metabolismo celular normal, e quando em concentrações baixas ou moderadas,

podem desempenhar funções benéficas aos organismos vivos, como a defesa contra agentes infecciosos, a atuação em sistemas de sinalização celular como mensageiros secundários e indução de resposta mitogênica (Valko et al., 2007). É atribuída às ROS a regulação da expressão gênica por mecanismos que envolvem a modulação de fatores de transcrição redox-sensíveis (Haddad, 2002; Ribeiro et al., 2005).

Há muitas fontes de ROS no sistema nervoso: geração de superóxido pela fosforilação oxidativa mitocondrial; ativação da fosfolipase A2 pela cascata do ácido araquidônico; ativação de proteases que levam a conversão de xantina desidrogenase à xantina oxidase e produção de NO (Brookes et al., 2004; Coyle & Puttfarcken, 1993; Han et al., 2000). No processo de transporte de elétrons que ocorre na matriz mitocondrial, a oxirredução do oxigênio molecular (O_2) à água gera intermediários metabólicos, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que constituem as ROS responsáveis pela toxicidade atribuída ao O_2 , já que estas espécies possuem alta reatividade e podem causar dano aos tecidos ao reagir com as biomoléculas (Fridovich, 1998; Gabbita et al., 2000). Fisiologicamente, a concentração de espécies reativas é regulada pela atividade de sistemas de defesa antioxidante. Estes envolvem a ação de compostos com ação redox, que incluem a glutathiona (GSH), a tiorredoxina (Trx), o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e flavonóides, além de enzimas antioxidantes, como a superóxido-dismutase (SOD), que converte o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e a peroxirredoxina (Prx), que convertem o H_2O_2 em H_2O , entre outras, como a tiorredoxina redutase (TrxR) e a glutathiona redutase (GR) que atuam na reciclagem dos sistemas antioxidantes da Trx e da GSH, respectivamente (Figura 2) (Finkel & Holbrook, 2000; Nordberg & Arnér, 2001).

Ao aumento das quantidades de ROS e RNS, e os efeitos deletérios decorrentes da ação destes, denomina-se estresse oxidativo. Esta condição pode ocorrer nos sistemas biológicos quando há uma superprodução de espécies reativas seguida de uma deficiência na ação dos sistemas antioxidantes, ou seja, quando há um desequilíbrio no *status* pró-oxidante/antioxidante nos tecidos. O excesso de ROS e RNS pode provocar dano a lipídeos, proteínas ou DNA, causando prejuízo às funções

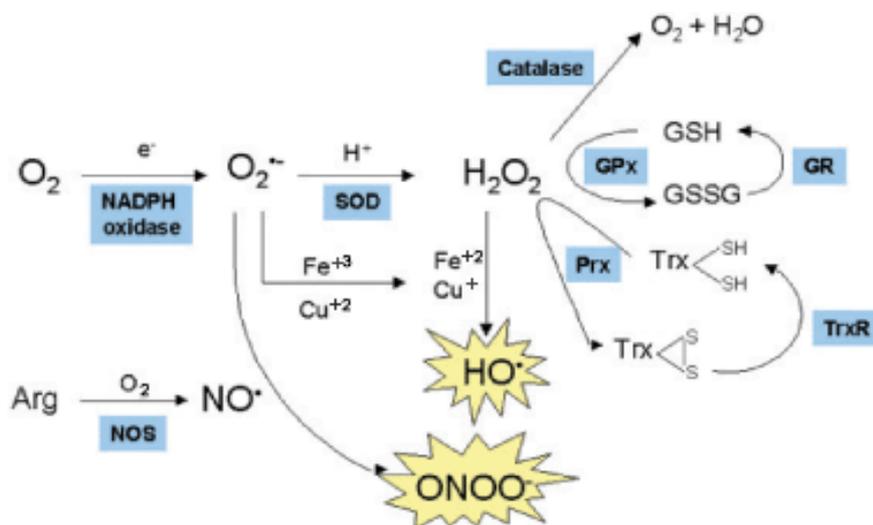


Figura 2. Esquema das reações e respectivas enzimas envolvidas na formação de ROS e RNS. NO: óxido nítrico; NOS: NO sintase. $ONOO^{\cdot}$: peroxinitrito; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; Prx: peroxirredoxina; TrxR: tiorredoxina redutase; Trx: tiorredoxina; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada (Barbosa et al., 2006).

celulares normais (Dröge et al., 2002; Valko et al., 2007), que pode culminar nos processos de envelhecimento e etiologia de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer, e a Esclerose Lateral Amiotrófica (Giasson et al., 2002; Ischiropoulos & Beckman, 2003).

O sistema nervoso central, e os neurônios em particular, são considerados alvos de injúria oxidativa devido ao seu alto metabolismo aeróbico, grande quantidade de substratos oxidáveis, como ácidos graxos poliinsaturados e catecolaminas, e capacidade antioxidante relativamente reduzida, como demonstrado pelas baixas concentrações de GSH e GPx (Sagara et al., 1993; Damier et al., 1993). Além disso, o tecido nervoso quando exposto a condições de alta demanda energética pode aumentar consideravelmente a produção mitocondrial de superóxido e outras ROS devido à disfunção na cadeia de transporte de elétrons (Andersen, 2004; Patenaude et al., 2005).

A participação de sistemas antioxidantes e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no processamento nociceptivo foi demonstrada por este grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (Guedes et al., 2006; 2008; 2009). A partir desses resultados

surgiu a hipótese de que as ROS estariam envolvidas em mecanismos de sinalização celular, como a via da Akt, uma serina/treonina cinase envolvida em diversas vias de transdução de sinal e relacionada aos mecanismos biológicos que induzem a sobrevivência celular (Kim & Chung, 2002). Observou-se um aumento da forma ativa desta cinase após a secção do nervo isquiático, quando também foi detectado o aumento, na medula espinal, do H_2O_2 e também de um composto formado a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), apesar de não ter sido evidenciado dano a lipídios pela técnica de TBARS. Portanto, os dados obtidos por estes estudos sugerem o envolvimento dos sistemas oxidantes, antioxidantes e de moléculas de sinalização celular na modulação do processamento nociceptivo e em mecanismos neuroprotetores que podem estar sendo ativados no tecido nervoso espinal a fim de evitar a perda neuronal observada após a injúria nervosa periférica (Moore et al., 2002; Siniscalco et al., 2007). Neste contexto, ainda existem muitas questões a serem elucidadas, dentre elas, a participação de outros sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos importantes no estado redox do tecido nervoso, bem como a investigação de moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação da proliferação e transcrição gênica da célula, além de sinalizadores e efetores do processo de morte celular.

O equilíbrio redox celular é mantido principalmente pela ação dos sistemas antioxidantes da glutathiona (GSH) e da tiorredoxina (Trx) (Masutani et al., 2005). A Trx é uma proteína de 12 kDa que possui um sítio dissulfeto/ditiol redox-ativo em sua estrutura e que opera conjuntamente com a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e a enzima tiorredoxina redutase (TrxR), formando um sistema redutor eficiente que, em cooperação com peroxidases Trx-dependentes, promove a remoção do H_2O_2 intracelular (Figura 3) (Holmgren, 1985; Holmgren & Björnstedt, 1995). As tiorredoxinas são proteínas abundantes encontradas em diferentes espécies, com isoformas diversas, que participam de reações biossintéticas essenciais e da regulação de muitas funções biológicas (Arner & Holmgren, 2000). Os componentes do sistema da Trx não participam apenas da remoção de ROS do ambiente celular, como podem desempenhar papéis regulatórios em diversas funções celulares pela interação proteína-proteína (Masutani et al., 2005). A Trx pode regular a

atividade de proteínas redox-sensíveis, envolvidas na transdução de sinais e expressão gênica, como a proteína ativadora 1, o fator nuclear κ B (NF κ B), e a cinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK1) (Hirota et al., 1997; Saitoh et al., 1998).

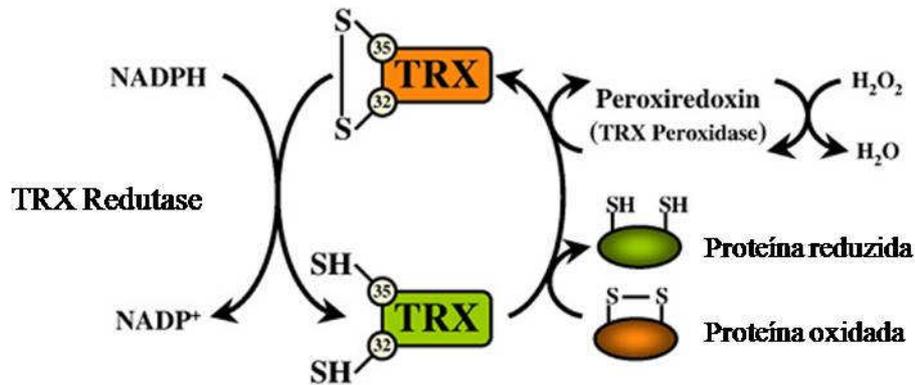


Figura 3. Sistema antioxidante da tioredoxina. TRX: tioredoxina; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida; NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma oxidada; H₂O₂: peróxido de hidrogênio (adaptado de Kaimul et al., 2007).

A Trx está amplamente distribuída pelos tecidos e sua expressão pode ser induzida por diversos agentes estressores (Powis & Montfort, 2001; Masutani et al., 2004). Na região regulatória do gene para a Trx há muitos sítios de ligação para fatores de transcrição promotores-específicos, como o elemento de resposta a antioxidante (ARE) e o elemento de resposta ao AMP cíclico (CRE) (Yamamoto et al., 1997). No sistema nervoso, a Trx em suas isoformas citosólica (Trx 1) e mitocondrial (Trx 2) foi demonstrada tanto periféricamente, no nervo isquiático (Stemme et al., 1985), bem como centralmente, em muitas regiões do encéfalo, principalmente aquelas de alta atividade metabólica, como a substância nigra e o núcleo subtalâmico (Lippoldt et al., 1995). A Trx foi reportada como fator neurotrófico para neurônios colinérgicos (Endoh et al., 1993), além de desempenhar um importante efeito neuroprotetor demonstrado pela superexpressão de Trx 1 em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal (Takagi et al., 1999) ou à excitotoxicidade decorrente da estimulação do receptor glutamatérgico em hipocampo (Takagi et al., 2000). Um aumento considerável da proteína e do RNA mensageiro da Trx foi demonstrado em neurônios motores adultos do núcleo hipoglossal após injúria em nervo hipoglossal. Para os autores, esta regulação para cima da Trx indica um mecanismo pelo qual os neurônios motores

reagem ao estresse oxidativo induzido pela axotomia acionando mecanismos de sobrevivência e regeneração neuronal, que foram observadas ao longo do tempo neste modelo (Mansur et al., 1998).

Os equivalentes redutores essenciais para a reação de ressíntese da Trx, e também da GSH, são fornecidos pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH). Este doador de elétrons é um componente-chave de algumas vias metabólicas e pode ser gerado por vários sistemas enzimáticos (Lehninger et al., 1995). Dentre os quais se destaca a via pentose-fosfato, que através da oxidação da glicose, gera ribose 5-fosfato para a síntese de ácidos nucléicos e também mantém o *pool* citosólico de NADPH. A primeira enzima desta via é a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), que cataliza a oxidação da glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato, num processo dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NADP⁺) e que conserva os equivalentes redutores na forma de NADPH (Lehninger et al., 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999). A atividade da via pentose-fosfato, que depende da funcionalidade da enzima G6PDH, é indispensável para a manutenção do balanço redox e detoxificação de ROS. A deficiência da enzima acarreta a redução na relação NADPH/NADP⁺ intracelular, debilita as defesas antioxidantes e pode culminar em dano oxidativo à célula (Ho et al., 2007). Propõe-se que a estimulação da via pentose-fosfato promova proteção contra a toxicidade do H₂O₂ em neurônios e astrócitos (Ben-Yoseph et al., 1996; Kussmaul et al., 1999). Além disso, a incubação com peroxinitrito desencadeia rápida ativação da via e acúmulo de NADPH, pela estimulação da atividade da G6PDH (Garcia Nogales et al., 2003), a qual exerce um importante papel na habilidade da célula de remover as ROS. Em última instância, a G6PDH pode modificar vias de sinalização que determinam o destino celular (Bolaños et al., 2008).

Além do sistema da Trx, o SNC possui uma alta concentração de ácido ascórbico (AA), uma vitamina hidrossolúvel que constitui um nutriente essencial para o ser humano, o macaco e o porquinho da Índia, que não são capazes de sintetizar este composto (Burns, 1959; Grünewald 1993). O AA é um importante antioxidante plasmático cujo decréscimo, que pode ser decorrente da carência desta vitamina na dieta dos seres humanos, está associado a distúrbios neurológicos e ao escorbuto

(Richardson et al., 2002). O AA desempenha diversas funções no organismo, como cofator na biossíntese enzimática de colágeno, carnitina, catecolaminas e outros neurohormônios (Tolbert, 1985; Wilson, 2002), além de ser um importante antioxidante que reduz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio à moléculas estáveis, impedindo desse modo a propagação em cadeia do processo de peroxidação lipídica iniciada por espécies reativas (Bendich et al., 1986). Em todas as reações que o AA participa ocorre a formação direta, ou através da dismutação em radical ascorbil, do ácido dehidroascórbico (DHA), a forma oxidada do AA (Figura 4). As células animais conseguem transportar e reduzir o DHA em AA de modo eficiente, mediante um transportador de glicose independente de sódio, e da reação química direta com a GSH ou enzimas dependentes de NADPH, como a TrxR e a DHA redutase dependente de GSH (Maellaro et al., 1994; Xu et al., 1996; May, 2002).

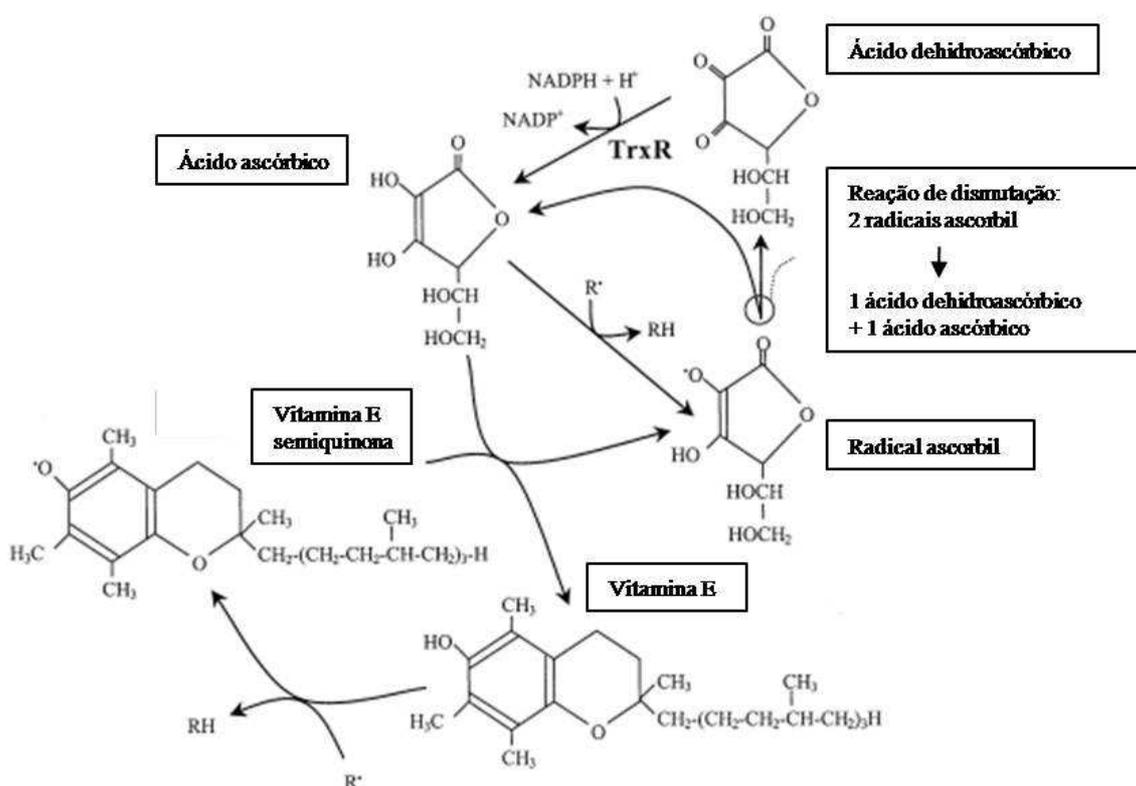


Figura 4. Interação entre a vitamina E e o ácido ascórbico e a relação com a Tiorredoxina Redutase (TrxR). A vitamina E é um importante antioxidante das membranas celulares que reage com radicais livres formando vitamina E semiquinona, a qual pode ser reduzida pelo ácido ascórbico (AA) novamente à vitamina E. Nesta reação são formados 2 radicais ascorbil que podem espontaneamente sofrer dismutação para AA ou ácido dehidroascórbico (DHA). A TrxR pode reduzir eficientemente o DHA à AA e também o radical ascorbil à AA, apesar de não ser completamente compreendido o mecanismo desta reação (adaptado de Nordberg & Arnér, 2001).

Além da manutenção da integridade lipídica e da proteção contra dano oxidativo, o AA pode atuar como neuromodulador no SNC (Niki, 1991; Frei et al., 1992), ao qual se atribui propriedades neuroprotetoras e anticonvulsivantes, evidenciadas em modelos de distúrbios neurodegenerativos desencadeados por excitotoxicidade, como doença de Huntington (Rebec et al., 2003), isquemia cerebral (MacGregor et al., 2003), e atividade epiléptica induzida por diferentes agentes, como ferro (Yamamoto et al., 2002), ácido metilmalônico (Figuera et al., 1999), pentilenotetrazol (Oliveira et al., 2004) e penicilina (Ayyildiz et al., 2007). O AA tem sido estudado como uma alternativa no tratamento de uma neuropatia periférica bastante comum, a doença de *Charcot-Marie-Tooth* (CMT), que envolve, entre outros fatores, a mielinização anormal de nervos periféricos (Passage et al., 2004; Pareyson & Marchesi, 2009). A utilização do AA nesta condição justificou-se por sua utilização em meios de co-cultura de axônios e células de Schwann (Carey & Todd, 1987; Eldridge et al., 1987; Plant et al., 2002) e pela citada relação entre deficiência de AA e neuropatia femoral (Hood, 1969). O tratamento com AA resultou em melhora substancial do fenótipo de CMT tipo 1A em camundongos (Passage et al., 2004). Estas evidências sugerem que o AA, além de exercer um importante papel como antioxidante celular e plasmático, pode atuar em mecanismos de neuromodulação no SNC, inclusive em processos relacionados à nocicepção.

A regulação de sistemas antioxidantes e da resposta celular ao estresse oxidativo envolve diversas moléculas sinalizadoras, dentre as quais se destaca o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), importante fator de transcrição que regula a expressão de uma variedade de enzimas citoprotetoras mediante ligação ao elemento responsivo a antioxidante (ARE), presente nas regiões promotoras de diversos genes (Kobayashi & Yamamoto, 2005; Osburn & Kensler, 2008). A partir da interação do Nrf2 com o ARE, são expressas enzimas antioxidantes e de detoxificação de fase 2 - envolvidas no metabolismo de xenobióticos eletrofílicos - em diferentes tecidos (Nguyen et al., 2003; Zhu et al., 2005). Em condições normais, o Nrf2 está localizado no citoplasma formando um complexo inativo com a proteína associada ao citoesqueleto Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), a qual suprime a atividade transcricional do Nrf2 pela ligação à um domínio regulatório onde se ligam outras proteínas, como um complexo ubiquitina ligase, que realiza a ubiquitinação e

consequente degradação do Nrf2 pelo proteossoma. A exposição a diferentes estressores, incluindo eletrófilos e ROS, promove a liberação do Nrf2 da Keap1, e permite sua translocação do citoplasma ao núcleo, onde ocorre a dimerização do Nrf2 com pequenas proteínas Maf, de forma que este interage com o elemento responsivo dos genes-alvo, ativando sua transcrição (Figura 5) (Itoh et al., 1997; Osburn & Kensler, 2008; Surh et al., 2009). Os genes que codificam as enzimas de detoxificação de fase II, glutationa-S-transferase, UDP-glucuronosil-transferase, epóxido hidrolase microsomal, entre outras, e as enzimas antioxidantes heme oxigenase-1, peroxirredoxina 1, CAT, GPx, SOD e Trx podem ser regulados pelo Nrf2 (Kobayashi & Yamamoto, 2005).

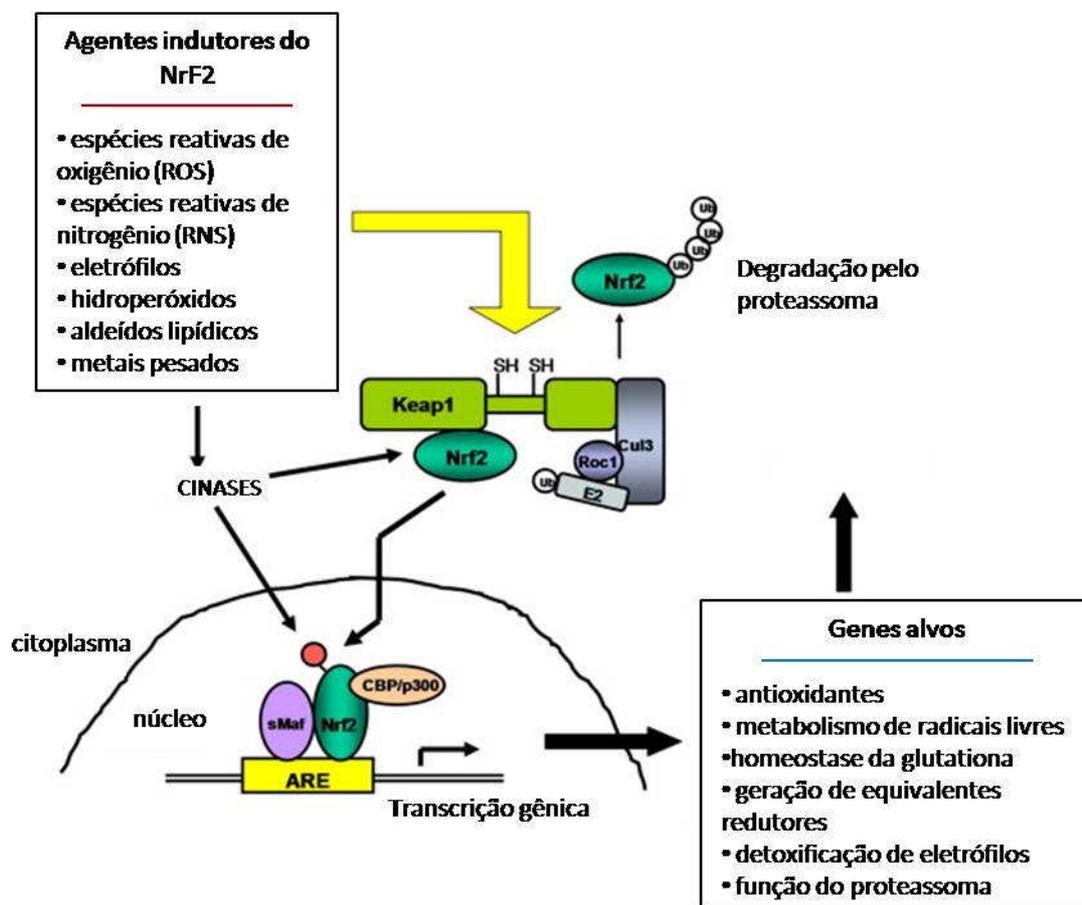


Figura 5. Via de sinalização do Nrf2. O Nrf2 é reprimido, no citoplasma, pela proteína associada ao citoesqueleto Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). A Keap1 apresenta um domínio para ligação de proteínas adaptadoras substrato-específicas relacionadas à ubiquitina ligase (Cul3, Roc1, E2). Ub: ubiquitina; ARE: elemento de resposta ao antioxidante; CBP: proteína ligada ao CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc); CBP e p300: co-ativadores do Nrf2; sMaf: pequenas proteínas Maf (adaptado de Osburn & Kensler, 2008).

A participação da sinalização por NrF2 na resposta inflamatória foi demonstrada em uma variedade de modelos experimentais que indicaram uma atenuação efetiva do estímulo pró-inflamatório, com diminuição tanto do processo inflamatório quanto do dano decorrente deste, pela ação do NrF2 via ARE (Ishii et al., 2005; Rangasamy et al., 2005; Li et al., 2008). Estudos empregando culturas primária de neurônios, e outros utilizando astrócitos transplantados em tecido nervoso, indicaram que a ativação da via NrF2-ARE pode promover resistência à neurotoxicidade induzida por agentes químicos ou estresse oxidativo (Johnson et al., 2002; Shih et al., 2003). As evidências até o momento disponíveis tem sugerido um papel neuroprotetor ao NrF2 e sua ação através do ARE, os quais podem estar diretamente envolvidos na patogênese de doenças neurodegenerativas e se tornarem alvos terapêuticos no tratamento destas (Johnson et al., 2008; de Vries et al., 2008). Quanto ao envolvimento do NrF2 em condições de dor, evidenciou-se um aumento na expressão de enzimas antioxidantes em células nervosas sensoriais após o insulto agudo por excesso de glicose, como observado em condições de neuropatia diabética. Este efeito foi atribuído à ativação do NrF2, cuja ação pode atenuar o aumento de ROS no gânglio da raiz dorsal e evitar o dano oxidativo ao tecido (Vincent et al., 2009).

A ocorrência de morte neuronal após a injúria nervosa periférica tem sido relatada tanto no gânglio da raiz dorsal (DRG) correspondente ao nervo lesionado (Himes & Tessler, 1989; Gillardon et al., 1996) como no corno dorsal da medula espinal (Gillardon et al., 1996; Azkue et al., 1998, Whiteside & Munglani, 2001; Moore et al., 2002). O processo de morte celular pode ocorrer de forma acidental ou desregulada (necrose) ou de forma programada, como na apoptose, de acordo com uma série de fatores exógenos bem como da habilidade da célula em reagir ao estímulo estressante ao qual é submetida (Fulda et al., 2010). A apoptose caracteriza-se pela autodigestão regulada da célula e pode ser decorrente da ativação de proteases específicas, denominadas caspases, ou de outras vias que utilizam outras moléculas efetoras do processo de morte celular programada, como o fator de indução de apoptose (AIF) (Kroemer & Martin, 2005; Krantic et al., 2007). Uma variedade de estímulos, incluindo oxidantes, radiação ionizante e muitos agentes quimioterápicos podem iniciar o processo apoptótico (Matés & Sánchez-Jiménez 2000), no qual a mitocôndria

desempenha um papel central, através da regulação de moléculas pró e anti-apoptóticas (Esposti, 2002). As ROS podem ativar diretamente a abertura de poros na membrana mitocondrial, promovendo a liberação do citocromo *c* no citoplasma celular e a consequente ativação das cascatas de sinalização que desencadeiam a apoptose (Skulachev, 1998; Brookes et al., 2000).

O fator de indução de apoptose (AIF) foi a primeira proteína mitocondrial relacionada à morte celular por apoptose a ser descrita (Susin et al., 1999). Esta constitui uma flavoproteína ancorada à membrana mitocondrial que sob condições fisiológicas exibe atividade nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase e parece contribuir aos processos de fosforilação oxidativa e respiração mitocondrial (Miramar et al., 2001). Durante o processo apoptótico o AIF é liberado da mitocôndria para o citoplasma através de uma clivagem no sítio N-terminal catalisada pela calpaína dependente de Ca^{2+} e outras enzimas (Otera et al., 2005; Polster et al., 2005; Yuste et al., 2005). Após esta clivagem, o AIF sofre translocação para o núcleo, onde participa da condensação da cromatina e ampla fragmentação do DNA, eventos característicos da apoptose (Otera et al., 2005; Lorenzo & Susin, 2007). O estímulo para liberação do AIF parece ser mediado pela ativação da poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1), cujos produtos principais, os polímeros de poli(ADP-ribose)(PAR), constituem o sinal que desencadeia a liberação do AIF da mitocôndria para o citosol (Figura 6) (Haince et al., 2005; Yu et al., 2006).

A morte celular mediada por AIF parece ser particularmente importante em células nervosas e há evidências que esta se relaciona diretamente à perda neuronal observada em disfunções neurodegenerativas, como doença de Parkinson, mal de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (Lorenzo & Susin, 2007; Krantic et al., 2007; Shibata et al., 2009). As evidências de ocorrência de apoptose em tecido nervoso espinal após lesão de nervo periférico relatam principalmente a ativação de proteínas da família Bcl-2 e da via das caspases (Maione et al., 2002), e ressaltam o envolvimento do sistema glutamatérgico neste processo (de Novellis et al., 2004; Jalalvand et al., 2008; Siniscalco et al., 2008). Quanto à participação do AIF nos mecanismos de morte celular na medula espinal de animais nestas condições, não há relatos até o presente momento. A partir disso, torna-se relevante estudar a ocorrência de morte neuronal

neste tecido, e seus mecanismos subjacentes, a fim de fornecer subsídios ao entendimento do quadro de alterações decorrentes da lesão nervosa e também permitir a elaboração de intervenções que possam contribuir para a redução das perdas motoras e sensoriais decorrentes deste tipo de injúria.

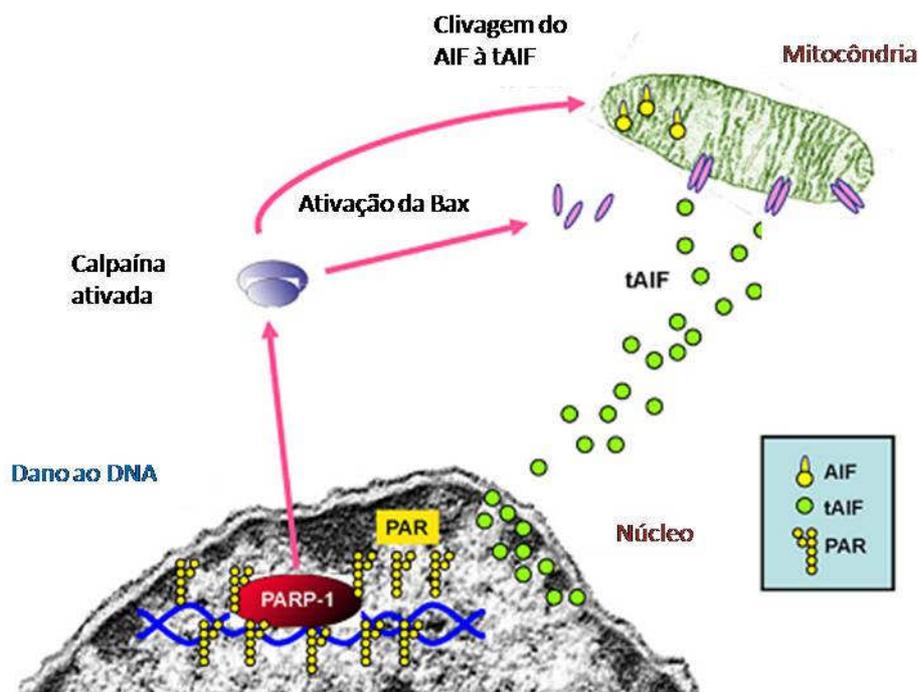


Figura 6. Via de morte celular programada mediada pelo AIF. Dano intenso ao DNA promove, via poli(ADP-ribose) polimerase (PARP-1), a ativação da calpaína. A calpaína ativada realiza a clivagem do AIF ancorado à membrana mitocondrial para sua forma solúvel (tAIF) e também promove a ativação da proteína Bax, que facilita a permeabilização da membrana externa da mitocôndria auxiliando a liberação do tAIF para o citosol. Uma vez liberado no citosol, o tAIF é translocado ao núcleo. PAR: polímeros de poli(ADP-ribose). Adaptado de Lorenzo & Susin, 2007.

Com base nestes conhecimentos o presente estudo mostra os efeitos temporais da secção do nervo isquiático sobre a expressão do AIF e do Nrf2, além de demonstrar ainda os efeitos desta condição experimental sobre a concentração de AA, a atividade das enzimas TrxR e G6PDH em medula espinal de ratos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi: 1) analisar a função motora e a sensibilidade mecânica de ratos submetidos à secção do nervo isquiático e, 2) avaliar os efeitos deste tipo de injúria sobre sistemas antioxidantes enzimático e não-enzimático, e moléculas relacionadas à sinalização celular em medula espinal destes animais, nos períodos de 3, 7 e 15 dias, a fim de estudar a variação temporal destes indicadores após a intervenção cirúrgica.

Objetivos Específicos

- Estudar a ocorrência de hiperalgesia mecânica, mediante emprego de filamentos de Von Frey de 10, 15 e 26g, em ratos com manipulação e secção unilateral completa do nervo isquiático, antes e aos 3, 7 e 15 dias após a intervenção experimental;
- Avaliar a função motora do nervo isquiático em ratos com manipulação e secção unilateral completa deste nervo mediante o emprego do teste da marca das patas e o cálculo do índice funcional do isquiático;
- Determinar a atividade das enzimas tioredoxina redutase e G6PDH, e a concentração de ácido ascórbico em homogeneizado de medula espinal de ratos adultos, machos, em condições basais e após 3, 7 e 15 dias da manipulação e secção unilateral completa do nervo isquiático;
- Quantificar, por técnica de *Western blot*, as possíveis alterações temporais na expressão do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NrF2) e do fator de indução de apoptose (AIF) em homogeneizados de medula espinal de ratos adultos, machos, em condições basais e após 3, 7 e 15 dias da secção unilateral completa do nervo isquiático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Neste estudo foram empregados ratos *Wistar* machos, adultos, com peso entre 200 e 300 g, obtidos do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estes animais permaneceram no ratário do Departamento de Farmacologia desta mesma universidade, antes e após os procedimentos, onde foram alimentados com ração adequada *ad libidum* e mantidos sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (22-24°C). Para a realização dos experimentos, os animais foram separados aleatoriamente em grupos de seis e então acondicionados em caixas de plástico adequadas, com assoalho de maravalha e livre acesso à alimentação e água. O projeto que antecedeu a realização deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (cadastro CEP: 2007874).

Procedimento Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: controle, *sham* e denervado (n=6 para cada grupo e o total de 42 animais no estudo), os quais serão descritos abaixo. Os períodos experimentais foram 3, 7 e 15 dias, correspondentes ao período pós-cirúrgico em que foi realizada a decapitação dos animais *sham* e denervado para remoção da medula espinal lombossacral. O grupo controle (n=6) foi preparado paralelamente aos anteriores, pela distribuição de 2 animais controle acompanhando cada período experimental. Estes foram testados pelo teste da marca das patas, para obtenção da função motora do ciático em condições normais, e então mortos por decapitação nos dias respectivos das mortes dos animais do 3º, 7º e 15º dias. No entanto, por não haver número suficiente de animais para compor um grupo controle para cada período, e dada a semelhança nos valores de seus resultados experimentais, estes foram agrupados em um único grupo. Os animais do grupo *sham* e denervado foram avaliados pelo teste da marca das patas e também submetidos à análise da hipersensibilidade mecânica (teste de Von Frey)

antes e após a intervenção experimental. Estes animais foram mortos também por decapitação aos 3, 7 e 15 dias após a lesão nervosa periférica.

Para o procedimento de denervação periférica, os ratos do grupo denervado foram previamente anestesiados com uma solução mista de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Sob efeito do anestésico, estes animais tiveram seu membro posterior direito fixado em uma superfície rígida para incisão dos tecidos moles e visualização do nervo isquiático. Este foi completamente isolado utilizando-se dois fios de sutura de algodão colocados abaixo do nervo a uma distância de dois milímetros um do outro. Em cada um dos fios foi dado um nó e o segmento do nervo localizado entre os dois fios foi removido (seccionado) e a incisão suturada com fio de algodão. O tipo de sutura utilizada foi a de Wolff, a mais indicada nos casos de maior tensão (Lazzeri, 1977). Os animais pertencentes ao grupo *sham* também foram submetidos ao procedimento anestésico e de isolamento do nervo isquiático, porém não sofreram secção do segmento nervoso. Já os animais controles não passaram por nenhuma intervenção anestésica ou cirúrgica.

Determinação do Índice Funcional do Isquiático

Os ratos dos diferentes grupos experimentais foram submetidos à análise da função motora da pata para determinação do Índice Funcional do Isquiático (IFI). Os ratos dos grupos *sham* e denervado dos períodos 3, 7 e 15 dias foram avaliados ao final de cada período, ou seja, antes da decapitação. Os controles também foram testados no dia da decapitação. A avaliação funcional do nervo isquiático foi realizada pelo teste da marca das patas (*walking track analysis*), descrita por De Medinacelli em 1982, o qual constitui um método de análise funcional do nervo que avalia alterações de marcha consequentes à lesão da pata operada através da impressão de pegadas. Neste teste, o animal foi colocado em um corredor de madeira (8,5x100 cm) com acesso a um ambiente escuro. O chão do corredor foi forrado com uma tira de papel branco de mesma medida e o rato a ser testado teve suas patas traseiras marcadas com tinta preta. A seguir, o animal foi solto no início do corredor por onde se locomoveu em direção ao ambiente escuro, ao final do corredor, deixando impressas as marcas de suas patas traseiras. Todos os animais foram anteriormente treinados com três

passagens pelo corredor, permitindo a adaptação e exploração do local. Foram selecionadas para análise as pegadas com qualidade e clareza de impressão das mesmas, sendo aferidas as patas operada (direita) e contralateral (esquerda). As aferições foram feitas sempre pelo mesmo examinador e o Índice Funcional do Isquiático foi calculado conforme a fórmula abaixo:

$$IFI = -38,3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109,5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13,3 \frac{(EIT-NIT)}{NIT} - 8,8$$

A pata esquerda, ou normal, corresponde à letra N; a pata lesionada, ou experimental, à letra E. Foram realizadas as medidas: da extensão da pegada (PL: distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), da largura da mesma (TS: distância entre o 1º e 5º dedo), e da distância entre os dedos intermediários (IT: 2º e 4º dedo) das patas traseiras (Figura 7). Os valores obtidos por esta fórmula são considerados um índice da condição funcional do nervo isquiático expresso em déficit funcional. Variações de zero a ± 11 estão nos desvios de normalidade para a fórmula, sendo que zero representa função normal e -100 representa perda total da função. Valores intermediários correspondem a déficits parciais de função.

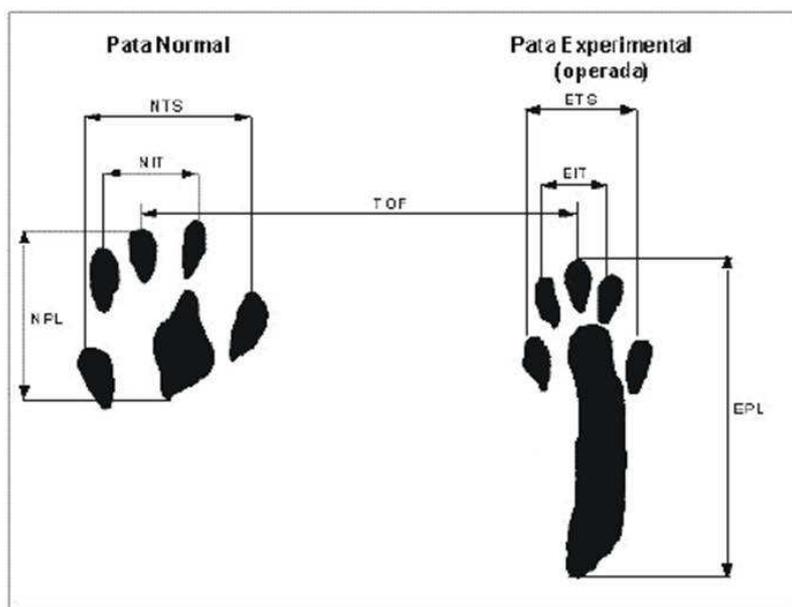


Figura 7. Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI). N: normal; E: experimental (operada); TS: abertura total dos dedos (1º ao 5º); IT: abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º); PL: comprimento da pegada. Adaptado de Monte-Raso et al., 2006.

Teste de Von Frey

Os animais dos grupos *sham* e denervado, dos períodos 3, 7 e 15 dias, foram testados para determinação de sua sensibilidade mecânica antes e depois do procedimento cirúrgico. Paralelamente, foram avaliados os animais controle para comparações com as medidas pré-cirúrgicas. Os animais foram colocados individualmente em caixas de vidro (12x20x20 cm) apoiadas sobre uma superfície elevada e revestida por tela metálica. Após a aclimatação neste ambiente por 10 minutos, foram aplicados estímulos de ordem crescente de força na superfície plantar da pata posterior direita (ipsilateral à lesão), utilizando-se Filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc, USA) de 10, 15 e 26 g. A força em questão pode ser alcançada pelo dobramento do filamento, que foi mantida por 3 s com 10 repetições para cada intensidade. Foram consideradas como respostas positivas aquelas em que o animal realizou o movimento de retirada do membro posterior imediatamente após o estímulo mecânico, e não as respostas seguidas de caminhada. Os resultados foram expressos como mediana das respostas positivas (entre 0 e 10) e comparadas as medidas pré e pós-cirúrgicas.

Remoção do tecido nervoso e preparação das amostras

Os ratos dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação e a porção lombossacral da medula espinal foi prontamente removida, acondicionada em *ependorfs* e congelada em nitrogênio líquido para posterior homogeneização. Para as determinações de atividade enzimática e ácido ascórbico, o tecido foi descongelado e homogeneizado em solução contendo KCl 1,15% (5 mL/g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 µL/mL de KCl adicionado). Já para a técnica de *Western blot*, as amostras foram homogeneizadas em tampão contendo detergentes (Tris HCl 20 mmol, NaCl 150mmol, EDTA 1 mmol, glicerol 10%, Nonidet P40, PMSF 200 µmol, pH 7,4) na proporção de 1:5 (peso/volume). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para evitar a degradação das proteínas, principalmente as enzimas, analisadas neste estudo. O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 1000 g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante resultante deste processo constituiu a

amostra que foi mantida em freezer -60°C até a realização das medidas de atividade enzimática e quantificação dos compostos químicos (Llesuy et al., 1985).

Quantificação de proteínas

Para as medidas de atividade enzimática e determinação do ácido ascórbico, as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando como padrão uma solução de albumina bovina. Os resultados foram expressos em mg de proteína por mL de amostra. Para a técnica de *Western Blot*, as proteínas foram medidas pelo método de Bradford (1976), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados expressos em mg/mL.

Quantificação do ácido ascórbico

O ensaio de quantificação do ácido ascórbico foi realizado conforme descrito por Roe e Kuether (1942), com adaptações elaboradas e padronizadas em nosso laboratório (Lab. Neurobiologia Comparada). Inicialmente as amostras foram centrifugadas, sob refrigeração, por 5 minutos a 1000 g e o sobrenadante foi separado para o ensaio. Preconizou-se uma curva padrão de ácido ascórbico (AA) (Synth[®]) com as seguintes quantidades: 0,0015 mg; 0,00375 mg; 0,0075 e 0,0150 mg. Preparou-se então uma solução de AA de 10 mg/mL e a partir desta uma solução de 0,100 mg/mL, a qual foi distribuída, em duplicata, em tubos *ependorfs* nos volumes 20, 50, 100 e 200 microlitros e completados até 400 μL com ácido tricloroacético 4% (Vetec[®]). O conteúdo destes foi então agitado com carvão ativado (Synth), de granulometria 1-2 mm, tratado previamente com ácido clorídrico 10 %, para conversão do AA em sua forma oxidada. Após, separou-se 300 microlitros desta solução, adicionou-se 10 microlitros de solução de tiouréia 10% (Vetec[®]), 75 microlitros de 2,3-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 2% (Sigma) e encaminharam-se os *ependorfs* para banho-maria a 37°C por 3 horas. Terminado este tempo adicionou-se 375 microlitros de ácido sulfúrico 85% (Nuclear[®]), gota a gota, com os *ependorfs* em banho de gelo, e aguardou-se 30 minutos para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 540 nanômetros. Na presença de AA desenvolve-se uma coloração alaranjada, proporcional à concentração. As amostras tiveram o mesmo tratamento, porém com a

adição de ácido tricloroacético ocorre desproteinização, sendo necessário centrifugar novamente os *ependorfs* por breve período, e seguir o ensaio utilizando o sobrenadante obtido. A partir da curva padrão de AA e regressão linear obtém-se o resultados em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína.

Atividade da Tiorredoxina Redutase (TrxR)

A determinação da atividade da tiorredoxina redutase foi determinada utilizando 5,5'-ditióbis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e NADPH. O método está baseado na redução do DTNB em TNB, um composto de coloração amarela que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm. A quantidade de TNB reduzido foi calculada usando o coeficiente de absorção de $13,6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para tanto, preparou-se um meio de reação (pH 7,0) contendo DTNB (72 mmol/L), NADPH (47 mmol/L) e EDTA (200mmol/L) no qual a reação de formação do TNB foi medida durante 1 minuto. Uma unidade de TrxR é definida como 1 μmol de TNB formado por minuto. Os dados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{mim}/\text{mg}$ proteína (Holmgren & Bjornstedt, 1995).

Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase foi determinada conforme o método descrito por Leong & Clark (1984), no qual a mistura de reação (1 mL) contém: Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7,5), MgCl_2 (10 mmol/L), NADP^+ (0,5 mmol/L) e amostra (15 μL). A reação é iniciada pela adição de glicose-6-fosfato (1 mmol/L) e lida em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade de G6PDH corresponde a 1 mmol de substrato transformado por minuto e a atividade específica é representada como unidades (U) por mg de proteína.

Expressão protéica por Western Blot

A partir da quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), as amostras (60 μg de proteína) foram preparadas com tampão de carga (Tris 65 mmol/L, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%) (Lammi, 1970) e então submetidas à separação das proteínas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio 12%) pelo sistema *mini-protean* (Bio-Rad). Antes de serem carregadas no gel, as amostras foram previamente aquecidas a 90°C por 2 minutos em

banho seco (modelo 330-3D, Nova Ética). Para a identificação do peso molecular das proteínas de interesse, utilizou-se um marcador de peso molecular *full range* (Amersham Pharmacia). A eletroforese foi efetuada a 120 V por 3 horas na presença de tampão de corrida (glicina 192 mmol/L, Tris 25 mmol/L e SDS 0,1%, pH 8,3). A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de carga, e pelo peso molecular.

Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond, Amersham) utilizando-se o tampão de corrida com 20% de metanol e o sistema de transferência (mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell) a 250 A durante 90 minutos. Para o bloqueio das ligações inespecíficas, realizou-se a incubação das membranas com leite em pó 1% em tampão TTBS (Tris 20 mmol/L, NaCl 140 mmol/L e Tween 20 a 0,05 %, pH 7,5) durante 60 minutos. Após, estas foram incubadas com os anticorpos primários por, no mínimo, 12 horas a 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram anti-AIF (Chemicon, 1:1000) e anti-Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), previamente diluídos em TTBS acrescido de albumina sérica bovina (BSA) 2,5% e azida sódica 1%. As membranas foram lavadas três vezes sucessivas com TTBS e então incubadas com os anticorpos secundários (anti-coelho, 1:5000, para ambos) por 2 horas a temperatura ambiente. Todas as incubações ocorreram sob agitação constante. Antes de proceder à revelação por quimiluminescência, as membranas foram lavadas com TBS (Tris 20 mmol/L e NaCl 140 mmol/L).

A reação de quimiluminescência foi possível pela utilização de substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico) e exposição das membranas ao filme radiográfico Hyperfilm (Amersham) por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, os filmes foram incubados em soluções de revelador, ácido acético 10% e fixador. Todo o processo de revelação foi realizado em uma sala escura e a autorradiografia gerada foi analisada utilizando o software *Molecular Dynamics Image Quant*, versão 3.22 (*Computing densitometer model 300 A*). A densitometria obtida para as bandas dos anticorpos foi corrigida por uma banda inespecífica obtida pela coloração da

membrana com vermelho de *Ponceau* (Klein et al., 1995). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (valor percentual referente ao total do gel).

Análise estatística

Os dados resultantes da avaliação da hipersensibilidade mecânica foram analisados pelo teste *t* de Wilcoxon, que se adequou às características e tamanho da amostra. Para as demais variáveis, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi <0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando como ferramenta computacional o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 16. O número de animais estabelecido para cada grupo (n=6) baseou-se em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório com o mesmo modelo (Guedes et al., 2006; 2008 e 2009).

RESULTADOS

Teste de Von Frey

A medida da sensibilidade mecânica nos animais controle foi muito semelhante às medidas pré-cirúrgicas dos animais *sham* e denervado para todos os períodos experimentais. Portanto, optou-se por realizar as comparações entre medidas pré e pós-cirúrgicas dentro dos mesmos grupos, de modo que os valores dos animais controle para o teste de Von Frey não foram apresentados nem utilizados para fins de análise estatística. Não houve diferença significativa entre as respostas pré e pós-cirúrgica dos animais *sham* aos filamentos de Von Frey de 10, 15 e 26 g em nenhum dos períodos analisados (Figura 8A,B,C). Aos 3 dias após a secção unilateral completa do nervo isquiático, os valores das medidas pós-cirúrgicas do grupo denervado foram significativamente maiores que as pré-cirúrgicas para os filamentos de 15 e 26 gramas (Figura 8B,C). No período de 7 dias após esta lesão, os animais denervados apresentaram aumento estatisticamente significativo das medidas pós-cirúrgicas em relação às pré-cirúrgicas para todos os filamentos estudados (Figura 8A,B,C). Já aos 15 dias após a axotomia, não se observou diferença significativa entre as respostas pré e pós-cirúrgicas dos animais denervados em nenhuma intensidade de estímulo aplicada (Figura 8 A,B,C).

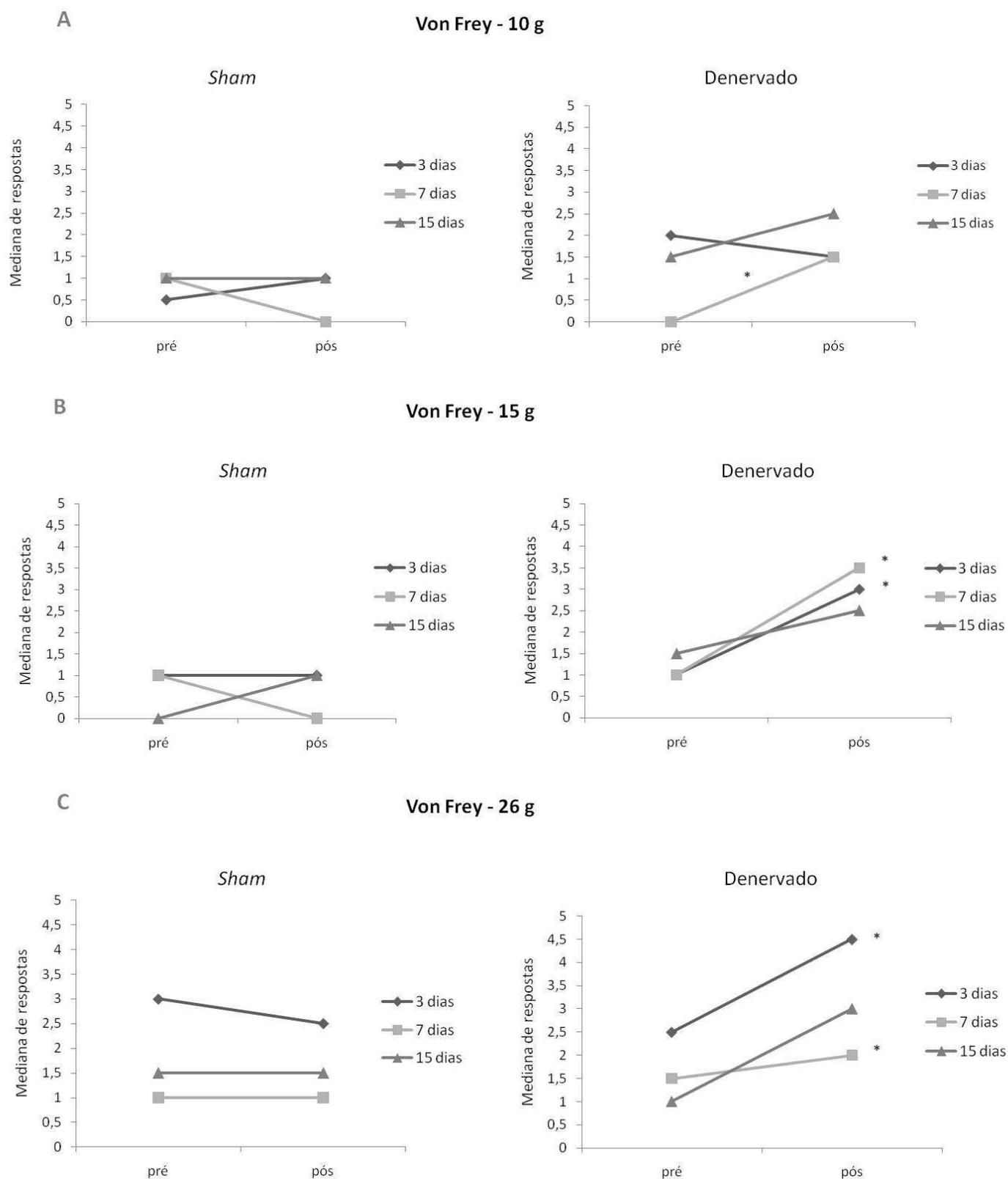


Figura 8. Mediana do número de respostas ao teste da hipersensibilidade mecânica para os filamentos de Von Frey de 10 (A), 15 (B) e 26 (C) gramas. Estão representadas as respostas pré e pós-cirúrgicas de ratos submetidos à manipulação (*sham*) e secção do nervo isquiático (denervado) nos períodos de 3, 7 e 15 dias após a lesão. * Diferença estatisticamente significativa entre as medidas pré e pós-cirúrgica (teste t de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Índice Funcional do Isquiático (IFI)

Aos 3, 7 e 15 dias após a secção do nervo isquiático, os ratos apresentaram decréscimo significativo do IFI, quando estas medidas foram comparadas àquelas dos seus respectivos grupos *sham* e aos valores obtidos nos animais controle. Os valores do IFI não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando foram comparados os animais *sham* com o grupo controle, mantendo-se os valores deste índice, nesses animais, na faixa de normalidade estimada para este teste (Figura 9).

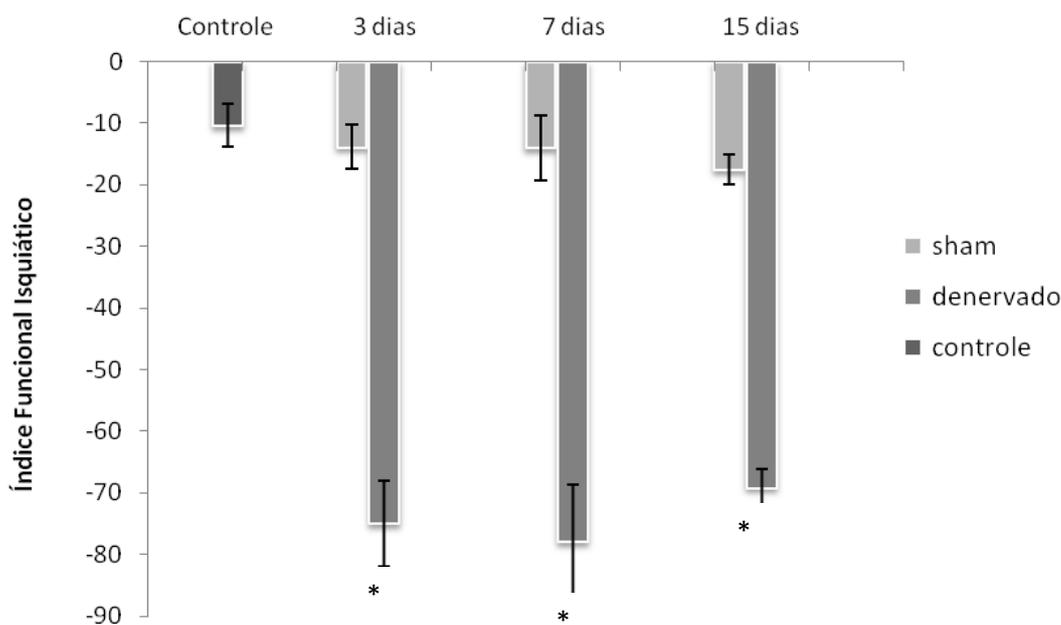


Figura 9. Valores do Índice Funcional do Isquiático em ratos controle e submetidos à manipulação (*sham*) e secção do nervo isquiático (denervado). Os valores estão expressos em média dos índices individuais \pm erro padrão da média. * Diferença significativa em relação aos grupos *sham* e controle (ANOVA de uma via seguida de Tukey, $P < 0,05$).

Ácido ascórbico (AA)

Os valores de AA na medula espinal de ratos do grupo controle foi $1,14 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/mg}$ de proteína (Figura 10). Este valor não variou significativamente aos 3 dias após a secção unilateral completa do nervo isquiático. Porém, aos sete dias após o procedimento cirúrgico, os valores de AA foram significativamente reduzidos nos grupos *sham* e denervado, estando esta redução ainda presente aos 15 dias após a lesão nervosa periférica nesses grupos experimentais (Figura 10).

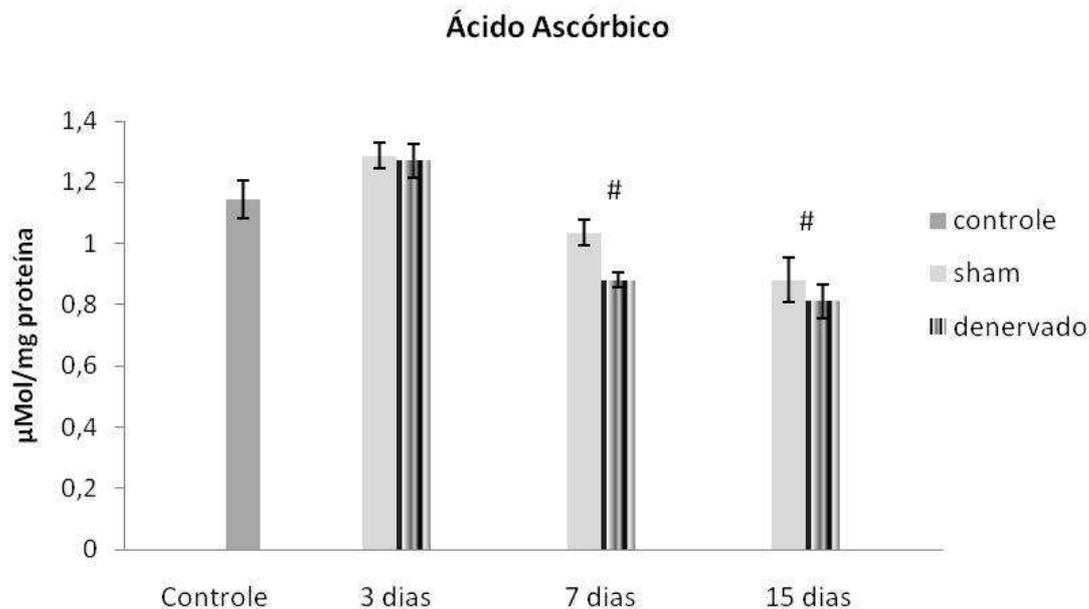


Figura 10. Valores de Ácido Ascórbico em medula espinal lombossacral de ratos controle e submetidos à manipulação (*sham*) e secção do nervo isquiático (denervado) após 3, 7 e 15 dias da lesão. Os valores representam a média \pm erro padrão da média. # Diferença significativa dos grupos *sham* e denervado aos 7 e 15 dias em relação aos demais grupos (ANOVA de uma via seguida de Tukey, $P < 0,05$).

Tiorredoxina redutase (TrxR)

A atividade da enzima tiorredoxina redutase na medula espinal de ratos controles foi de $15,47 \pm 0,66$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Figura 11A). Esta atividade foi significativamente reduzida neste tecido de ratos aos 3 e 7 dias após a manipulação e a secção unilateral completa do nervo isquiático, quando estes valores foram comparados àqueles obtidos no grupo controle. Interessantemente, a atividade desta enzima mostrou valores semelhantes nos grupos *sham* e denervado destes períodos experimentais. Aos 15 dias após o procedimento cirúrgico, a atividade da TrxR aumentou no grupo *sham*, sendo este acréscimo significativo em relação às medidas obtidas nos grupos *sham* e denervado nos períodos de 3 e 7 dias após a lesão nervosa periférica. Contudo, a atividade enzimática deste período ainda foi significativamente menor do que aquela do grupo controle. Todavia, este valor não diferiu significativamente daquele obtido no grupo denervado deste período (Figura 11A).

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da enzima G6PDH foi de $6,48 \pm 0,36$ unidades/mg de proteína na medula espinal de ratos que não sofreram qualquer manipulação no nervo isquiático (controle) (Figura 11B). Esta atividade não mostrou mudanças significativas aos 3 e 7

dias após a manipulação e a secção unilateral completa deste nervo. Contudo, a atividade desta enzima, nesse tecido, estava significativamente reduzida aos 15 dias após o procedimento cirúrgico nos animais dos grupos *sham* e denervado, quando estes valores foram comparados àqueles dos demais períodos e grupos experimentais (Figura 11B).

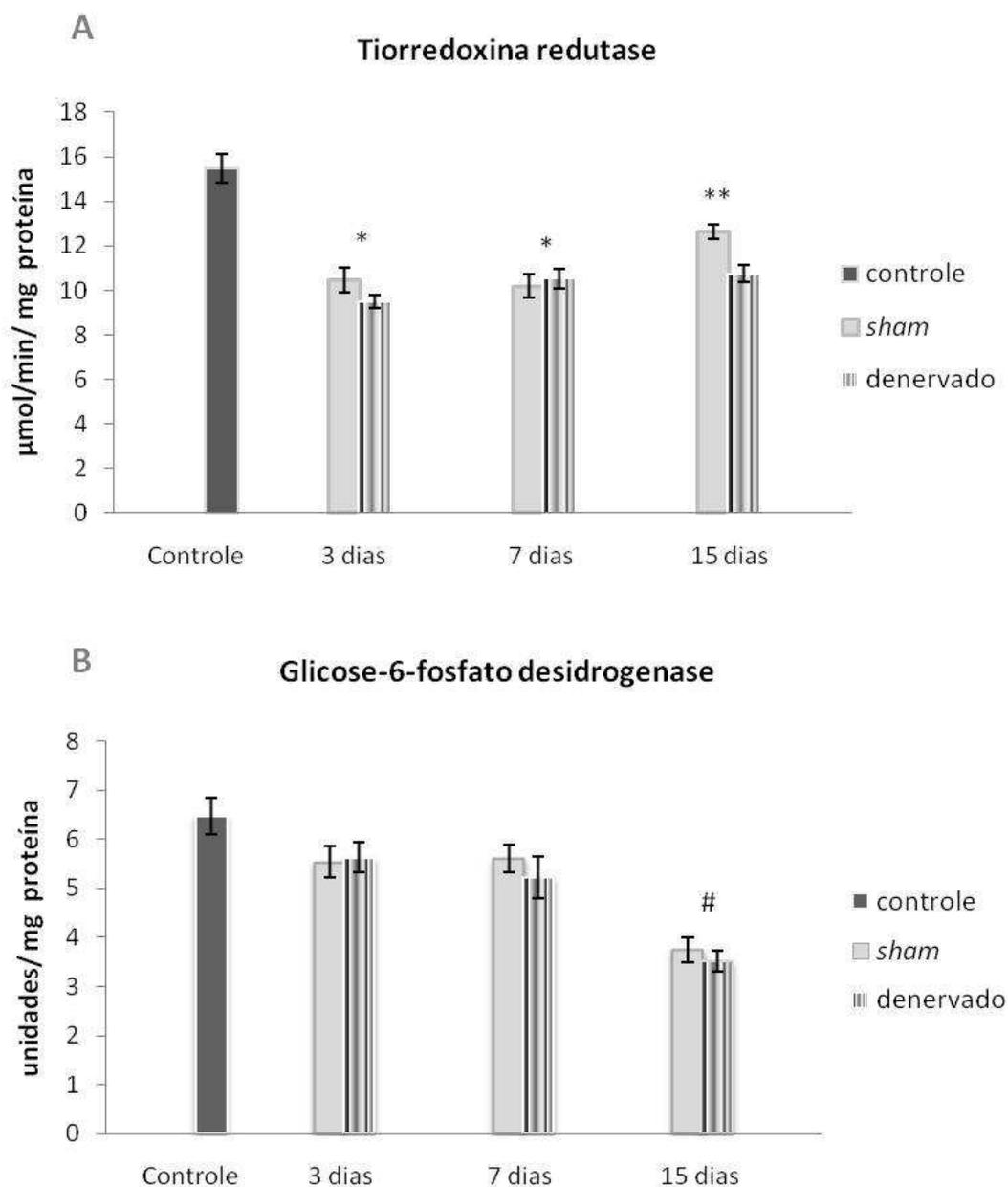


Figura 11. Atividade das enzimas tiorredoxina redutase (A) e glicose-6-fosfato desidrogenase (B) em medula espinal lombossacral de ratos controle e submetidos à manipulação (*sham*) e secção do nervo isquiático (denervado) após 3, 7 e 15 dias da lesão. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. * Diferença significativa em relação ao grupo controle; ** Diferença significativa em relação a todos os demais grupos experimentais, exceto o denervado do mesmo período; # Diferença significativa dos grupos *sham* e denervado após 15 dias em relação aos demais grupos ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey).

Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NrF2)

O emprego do anticorpo anti-NrF2 pela técnica de Western blot em medula espinal lombossacral de ratos mostrou bandas de marcação com peso molecular em torno de 57 KDa, o que correspondente ao peso molecular do fator. Estas bandas foram selecionadas para captura e quantificação (Figura 12A). A partir dos valores da quantificação das bandas (percentual em relação ao total do gel), obtiveram-se os logaritmos naturais a fim de reduzir a dispersão dos dados e adequar os mesmos à análise estatística. Observou-se que manipulação e a secção unilateral completa do nervo isquiático não provocou mudanças significativas na expressão deste fator nos períodos de 3 e 7 dias após o procedimento cirúrgico. Esta expressão também não mudou significativamente no grupo *sham* do período de 15 dias após a lesão nervosa periférica. Contudo, a expressão do NrF2 mostrou elevação na medula espinal dos ratos denervados deste período, sendo este acréscimo estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle (Figura 12B).

Fator de indução de apoptose (AIF)

A imunodeteccção por anti-AIF em medula espinal lombossacral de ratos revelou bandas com peso molecular de aproximadamente 67 KDa, as quais foram capturadas e quantificadas (Figura 12C). A expressão do AIF em homogeneizado de medula espinal de ratos controle, *sham* e denervado não apresentou variação estatisticamente significativa nos grupos e períodos analisados (Figura 12D).

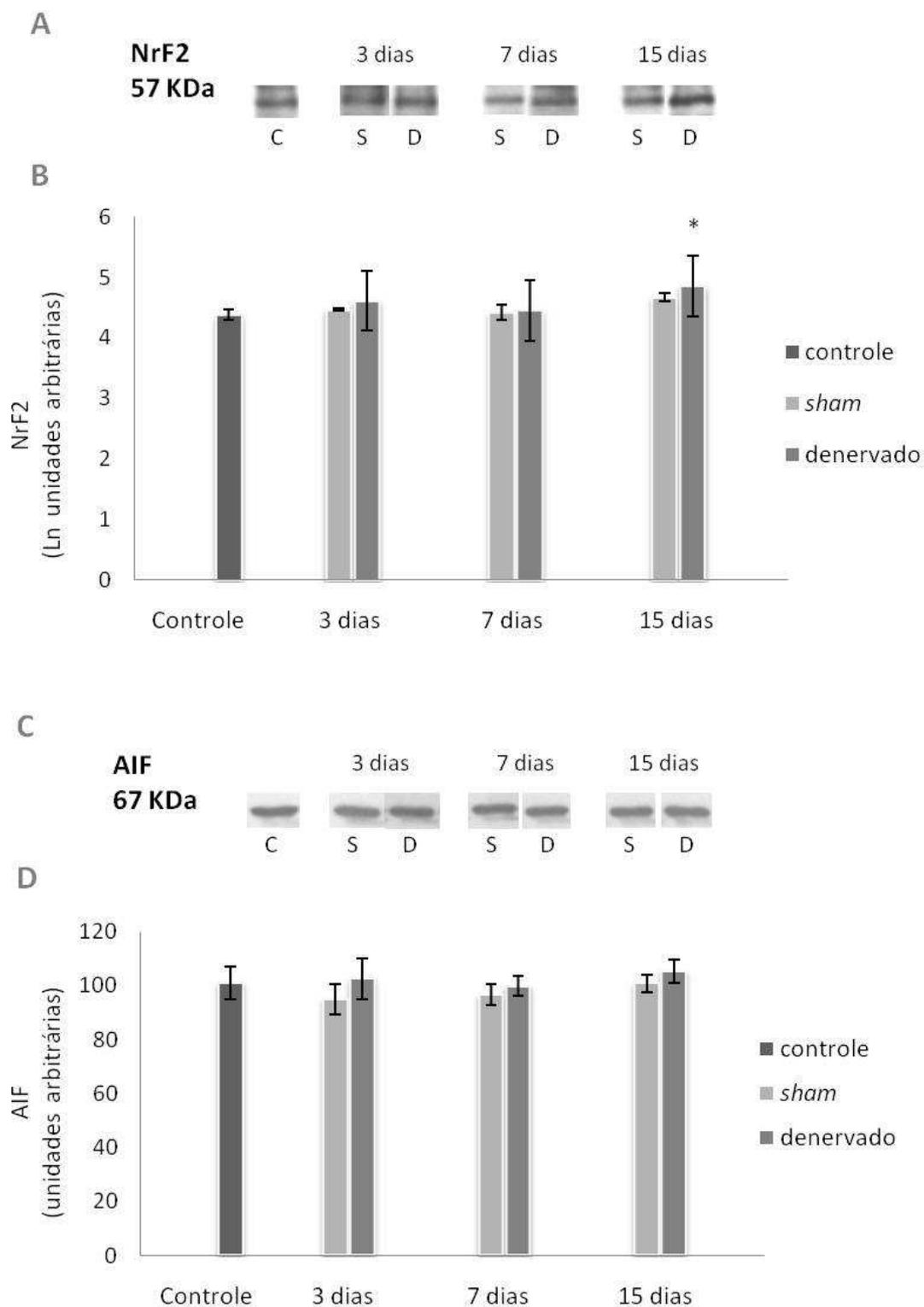


Figura 12. Expressão protéica do NrF2 (B) e do AIF (D) em medula espinal lombossacral de ratos controle e submetidos à manipulação (*sham*) e secção do nervo isquiático (denervado) após 3, 7 e 15 dias da lesão. (A e C) Bandas representativas dos *Westerns Blots*. As siglas correspondem aos grupos controle (C), *sham* (S) e denervado (D) dos períodos 3, 7 e 15 dias. (B e D) Média \pm erro padrão da média, em unidades arbitrárias. Para o NrF2, estes foram transformados em logaritmo (Ln). * Diferença significativa em relação ao grupo controle ($P < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey). Para os resultados do AIF, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (ANOVA de uma via).

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a secção do nervo isquiático aumenta a sensibilidade ao estímulo mecânico e gera um déficit na função motora da pata ipsilateral à lesão. Tanto a secção nervosa quanto a manipulação do nervo isquiático promoveram alterações bioquímicas na medula espinal lombossacral de ratos, evidenciadas pela medida das atividades enzimáticas da tioredoxina redutase e da glicose-6-fosfato desidrogenase e pela quantificação do ácido ascórbico. Quanto aos sistemas de sinalização celular, o efeito da secção do nervo isquiático sobre fator de transcrição NrF2 foi notável apenas no período mais tardio analisado, enquanto a via de sinalização apoptótica pelo AIF não sofreu modificações após a intervenção experimental em nenhum dos períodos.

A injúria nervosa periférica frequentemente resulta em dor neuropática (Klusáková & Dubový, 2009). A secção total de nervo periférico, conforme proposto por Wall e colaboradores (1979), mimetiza os sintomas do “membro fantasma”, condição que acomete indivíduos após amputação de um membro ou lesões espinais transversais. A ocorrência de hiperalgesia neste modelo tem sido relatada, acompanhada ou não de autotomia, ou seja, da automutilação da pata em que se realizou a denervação (Kingery & Vallin, 1989; Kauppila & Xu, 1996). No presente estudo, os animais foram observados constantemente, desde o procedimento cirúrgico até a morte, e nenhum caso de autotomia foi relatado. Quanto à hiperalgesia, foi demonstrado um aumento na frequência de respostas para os filamentos de Von Frey de 15 e 26 g de intensidade, nos animais denervados 3 e 7 dias após a secção do nervo isquiático (Figura 8). Para o filamento de 10 g, as respostas foram aumentadas apenas nos animais denervados aos 7 dias, enquanto no grupo denervado 15 dias e em todos os animais *sham* não houve diferença antes e após o procedimento experimental para nenhum dos filamentos aplicados. Estas informações permitem inferir que a secção do nervo isquiático aumenta a sensibilidade ao estímulo mecânico nos períodos de 3 e 7 dias. Estudos anteriores desta equipe evidenciaram a ocorrência de hipersensibilidade térmica nos animais denervados nos mesmos períodos (Guedes et al., 2006). Conjuntamente, estas evidências de hipersensibilidade térmica e

mecânica sustentam a hipótese que a secção do nervo isquiático produz um quadro de hiperalgesia nos períodos mais recentes estudados.

As alterações funcionais e a reorganização estrutural observadas na medula espinal após a injúria neuronal periférica podem exercer um papel importante na plasticidade sináptica e processos de regeneração nervosa (Navarro, 2007), além da participação no processamento nociceptivo. A compreensão destes eventos pode apontar grupamentos neuronais, sistemas bioquímicos e/ou moléculas importantes no processo de reorganização temporal e espacial de circuitos neuronais da medula espinal que podem resultar na recuperação motora e funcional do membro afetado pela lesão nervosa. O teste da marca das patas, que fornece o índice funcional do isquiático (IFI), é um método quantitativo de análise da função global do membro inervado pelo isquiático (De Medinaceli et al., 1982). Este índice tem sido utilizado para avaliar a recuperação motora após a injúria do nervo isquiático e pode evidenciar os efeitos da aplicação de alguma intervenção terapêutica (Ilha et al., 2008; Korb et al., 2010) ou fornecer informações acerca da recuperação espontânea da função do nervo, como no caso deste estudo.

A análise do IFI confirmou o déficit funcional da pata ipsilateral à lesão nos animais denervados, em todos os períodos experimentais analisados (Figura 9). Os animais *sham* apresentaram IFI's muito semelhantes aos dos controles, o que indica que o procedimento cirúrgico nestes animais não afeta a integridade e a função nervosa, apesar de estar relacionado à redução do limiar de sensibilidade térmica e alterações bioquímicas na medula espinal de ratos submetidos ao isolamento do nervo isquiático (Guedes et al., 2006; 2008; 2009). Estes resultados abrem perspectivas para a avaliação funcional do isquiático em períodos mais longos após a denervação, a fim de se estudar o período necessário para reconstituição axonal do segmento nervoso seccionado, independente da aplicação de estímulos ou agentes com potencial regenerativo. Ao se considerar a hipótese que a recuperação temporal e espontânea da função nervosa envolve modificações morfológicas e bioquímicas na medula espinal, torna-se relevante o estudo e elucidação destes parâmetros.

Dentre as moléculas relacionadas ao processamento nociceptivo, vem sendo estudado o envolvimento das ROS e RNS no local da lesão (Khalil et al., 1999; Chung, 2004) e na medula espinal (Park et al., 2006; Schwartz et al., 2008) de animais em condições de dor neuropática. A produção aumentada de ROS e RNS neste tecido pode ser decorrente da ativação de receptores NMDA que seguem à estimulação das fibras aferentes periféricas (Gao et al., 2007; Lee et al., 2010), e cujo envolvimento nos mecanismos de sensibilização central tem sido descrito (Woolf & Thompson, 1991; Ultenius et al., 2006). Esta equipe demonstrou que a secção do nervo isquiático também pode modular sistemas oxidantes e antioxidantes na medula espinal, pelo aumento do H_2O_2 e redução de defesas antioxidantes importantes, como a SOD e a CAT (Guedes et al., 2006; 2008). Além disso, a produção de NO parece estar aumentada neste tecido em animais submetidos à injúria nervosa, estímulo que ocasionou também a mobilização do sistema antioxidante da GSH (Guedes et al., 2009). Além destes sistemas, a injúria nervosa periférica e as alterações no estado redox do tecido nervoso também podem modificar vias de sinalização celular, relacionadas à sobrevivência neuronal ou efetoras do processo de morte celular programada. Neste contexto, foi demonstrado que a secção do nervo isquiático culmina na ativação da Akt na medula espinal (Guedes et al., 2008), importante cinase que regula os processos de proliferação e sobrevivência celular. Além destes sistemas anteriormente citados, é considerada a hipótese que outros importantes sistemas antioxidantes e vias de sinalização celular do tecido nervoso espinal são mobilizados e podem sofrer modificações em decorrência da secção nervosa periférica.

O ambiente redutor intracelular é mantido basicamente pela ação dos sistemas antioxidantes da GSH e da Trx, com a contribuição de grupamentos de cisteína de outras proteínas citoplasmáticas. A proporção entre as formas reduzida e oxidada destas moléculas pode determinar o estado redox da célula (Maher, 2006). No entanto, a análise das proporções entre GSH/GSSG e Trx reduzida/Trx oxidada em diferentes compartimentos celulares, como citoplasma, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo apresentou variações importantes, sugerindo que estes sistemas podem responder independentemente a estímulos e modular diferentes sistemas de sinalização, conforme o microambiente subcelular em que se encontram

(Burhans & Heintz, 2009). Para que o sistema da Trx atue normalmente, além da síntese da proteína Trx, é fundamental a atividade da enzima Trx redutase (TrxR), que utiliza elétrons da NADPH para a redução da Trx oxidada (Arnér & Holmgren, 2000). A TrxR possui características únicas e pode exercer outras funções celulares, além da redução da Trx. Expressa por três genes distintos (TrxR 1, TrxR 2 e TrxR 3), esta enzima pode reduzir, em compartimentos celulares distintos, diferentes tipos de substratos, dentre os quais o ácido lipóico, hidroperóxidos lipídicos, ácido dehidroascórbico e radical ascorbil (Arnér, 2009). A importância da TrxR no encéfalo em desenvolvimento foi demonstrada pela ausência da isoforma citosólica desta enzima, que culminou em disfunções motoras e padrões neuronais reduzidos e desorganizados em muitas regiões encefálicas (Soerensen et al., 2008).

No presente estudo realizou-se a medida das atividades enzimáticas e a quantificação de proteínas e do ácido ascórbico em homogeneizado de medula espinal, de modo que as informações obtidas sobre estes parâmetros referem-se principalmente ao compartimento citoplasmático celular. Quanto à atividade da enzima TrxR, os resultados evidenciaram uma significativa diminuição nos grupos *sham* e denervado em todos os períodos experimentais quando comparados ao controle (Figura 11A). Uma sutil restauração na atividade desta enzima foi observada aos 15 dias da secção do nervo isquiático, porém esta elevação ainda não superou a atividade enzimática obtida nos animais controles. A hipótese que esta diminuição seja decorrente de uma menor disponibilidade de substratos para a reação mediada por TrxR foi parcialmente testada pela medida da atividade da G6PDH, importante enzima do ciclo das pentoses que constitui uma das principais vias de fornecimento do NADPH. Verificou-se uma redução na atividade da G6PDH aos 15 dias da intervenção cirúrgica nos animais *sham* e denervados (Figura 11B), o que permite sugerir uma menor quantidade de NADPH no tecido nervoso espinal destes animais no período em questão. No entanto, não é possível estabelecer uma relação direta entre a atividade de TrxR e o fornecimento de NADPH pela via das pentoses, já que a diminuição na atividade da G6PDH ocorre no período mais tardio analisado, enquanto a TrxR tem sua atividade reduzida já aos 3 dias da intervenção cirúrgica. Observa-se também que aos

15 dias os animais *sham* mostram uma recuperação parcial na atividade da TrxR, período em que a G6PDH apresenta os menores valores de atividade enzimática.

As proteínas do sistema da Trx são selenoproteínas, de modo que a atividade de TrxR é dependente de selênio (Se). A disfunção no metabolismo do Se ou a ausência deste elemento pode afetar as distintas selenoproteínas e os tipos celulares específicos de modo distinto (Arnér, 2009). Estudo com diferentes tecidos de rato evidenciou que a deficiência de selênio na dieta ocasionou redução na atividade de TrxR nos tecidos hepático e renal, sem afetar, no entanto, a atividade desta enzima no cérebro (Hill et al., 1997). Deste modo, é improvável que esta seja a causa primária da redução na atividade de TrxR observada neste estudo. São consideradas hipóteses para esta diminuição a limitação dos substratos para as reações que envolvem a TrxR, como a própria Trx, ou ainda uma menor quantidade de TrxR disponível no tecido analisado, por uma redução na transcrição desta enzima. Porém, não há subsídios até o presente momento para confirmar ou refutar estas hipóteses, já que este trabalho não realizou a quantificação destas proteínas.

A inibição da TrxR pode ser provocada por muitos tipos moleculares, em diferentes contextos (Arnér, 2009), dentre os quais se destaca o estudo em células tumorais, onde foi evidenciado o aumento na expressão desta enzima (Cenas et al., 2006; Hedström et al., 2009). Um inibidor potente da TrxR é o 4-hidroxi-nonenal (HNE) (Fang & Holmgren, 2006), um produto final da peroxidação de lipídios. O aumento do HNE no tecido nervoso espinal foi demonstrado por este grupo de pesquisa em trabalhos anteriores, empregando o mesmo modelo de lesão nervosa periférica (Guedes et al., 2008). Portanto, é possível que a TrxR esteja sofrendo uma inibição de sua atividade por este composto. No entanto, o aumento do HNE ocorre apenas aos 7 dias da secção do nervo isquiático, enquanto a atividade da TrxR é reduzida também nos animais *sham* e nos períodos de 3, 7 e 15 dias. Considerando que nos períodos de 7 e 15 dias ocorreu um aumento dos metabólitos do NO, após a secção do nervo isquiático, e do H₂O₂, nos grupos *sham* e denervados (Guedes et al., 2008; 2009), sugere-se que a redução na atividade de TrxR na medula espinal resulta da ação de oxidantes ou de outros produtos da oxidação de constituintes celulares, cuja

participação nos mecanismos centrais após a injúria nervosa periférica precisa ainda ser elucidada.

A maior atividade metabólica do tecido nervoso em condição de injúria, anteriormente citada pelo envolvimento na geração de ROS, foi demonstrada pelo aumento na utilização de glicose pelo tecido nervoso após a indução de dor neuropática (Price et al., 1991; Mao et al., 1992). A maior parte da glicose consumida pelos tecidos animais é catabolizada até piruvato pela via glicolítica, cuja principal função é gerar energia na forma de ATP. Existem, no entanto, outras vias catabólicas para a glicose que culminam na formação de produtos importantes para a função celular, entre eles as pentose-fosfato e o ácido ascórbico (Lehninger et al., 1995). A via das pentoses fosfato, como citada previamente, tem sua atividade regulada pela enzima G6PDH, cuja atividade mostrou-se reduzida na medula espinal de animais *sham* e denervados aos 15 dias. Uma possível explicação para esta redução é a menor disponibilidade de glicose para esta via, já que o tecido encontra-se sob alta demanda energética. Além da produção de energia para manter a excitabilidade neuronal na medula espinal, foi demonstrado que a injúria nervosa periférica pode elevar os níveis basais de ATP extracelular no gânglio da raiz dorsal, que pode atuar como um mecanismo modulatório do processamento nociceptivo (Matsuka et al., 2008). Outra possibilidade para a redução da atividade de G6PDH foi demonstrada por estudo com células endoteliais submetidas a altas concentrações de glicose, no qual a inibição da atividade desta enzima seria decorrente da fosforilação pela enzima fosfocinase A (PKA) induzida pelo aumento no AMP cíclico (Zhang et al., 2000). A partir destas hipóteses, torna-se necessário investigar as possíveis alterações na estrutura da G6PDH ou ainda os fatores alostéricos que podem estar envolvidos na regulação da atividade desta importante enzima no tecido nervoso espinal depois da manipulação e/ou secção de nervo periférico.

O ácido ascórbico (AA), gerado também pela via secundária da metabolização da glicose (Lehninger et al., 1995), constitui um importante antioxidante no encéfalo, medula espinal e glândula adrenal (Rice, 2000). Neste estudo, foi demonstrada a redução na quantidade deste antioxidante na medula espinal dos animais *sham* e denervados nos períodos de 7 e 15 dias (Figura 10). Como o AA não é sintetizado pelo

tecido nervoso, este é transportado do líquido cerebrospinal para o interior do SNC e dos neurônios por um transportador dependente de sódio (SVCT2), o qual causa o acúmulo de AA contra o gradiente de concentração. O DHA, a forma oxidada do AA, é transportado para o interior e exterior das células por transportadores de glicose da família GLUT (Harrison & May, 2009). A rápida remoção do DHA das células nervosas e sua redução a AA, principalmente em astrócitos e por ação da GSH e redutases dependentes de NADPH, como a TrxR, é essencial para prevenir os efeitos tóxicos deste composto sobre neurônios e restaurar a concentração de AA necessária para a função celular (Wells & Xu, 1994; Wilson, 2002). A diminuição na quantidade do AA evidenciada na medula espinal após o procedimento cirúrgico ocorre nos mesmos períodos em que a concentração do H₂O₂ está elevada na medula espinal (Guedes et al., 2008), sugerindo que este antioxidante está sofrendo oxidação por esta ROS. No entanto, esta diminuição de AA não pode ser atribuída ao processo de oxidação a DHA, pois o AA deste tecido foi oxidado a DHA que foi então quantificado, conforme a técnica utilizada (adaptada de Roe & Kuether, 1942). Esta diminuição pode ser decorrente de alterações na disponibilidade, síntese, degradação ou distribuição dos transportadores SVCT2, proteínas de membrana que estão sujeitas a regulação por hormônios e moléculas envolvidas em vias de sinalização intracelular (Liang et al., 2002; Savini et al., 2008). É possível ainda que esteja ocorrendo uma depleção nos estoques de AA da medula espinal, como demonstrado em fração mitocondrial de encéfalo de ratos incubadas com peroxinitrito (Vatassery et al., 2004). Nesta condição, pode estar ocorrendo a oxidação irreversível do DHA, que ao ser convertido a ácido dicetogulônico, não pode ser mais recuperado. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para se descrever por quais mecanismos ocorre a diminuição na quantidade de AA observada na medula espinal de animais *sham* e denervados.

Considerando a íntima relação entre as ROS e RNS, os sistemas antioxidantes e as vias de sinalização celular na regulação dos processos de sobrevivência celular, transcrição gênica e apoptose (Trachootham et al., 2008), foi analisada a expressão protéica do fator de transcrição NrF2 e do efetor da apoptose independente de caspases, o AIF. O presente estudo evidenciou um aumento da expressão protéica do NrF2 em homogeneizado de medula espinal lombossacral 15 dias após a secção do

nervo isquiático (Figura 12B). Todavia, deve ser lembrado que foi utilizada apenas fração citoplasmática. Assim, este resultado está indicando que aos 15 dias após a axotomia periférica há acréscimo na expressão citoplasmática deste fator nos animais submetidos à secção do nervo isquiático. Sob as condições celulares normais, o NrF2 encontra-se no citoplasma ligado à proteína inibitória Keap1 e outras proteínas responsáveis pela constante degradação deste fator pelo proteossoma 26S (Nguyen et al., 2003). A interação de Keap1 com enzimas citoprotetoras e/ou de resposta ao estresse, ou mesmo a interação direta desta proteína com ROS, permite a oxidação de resíduos de cisteína críticos na manutenção da ligação de Keap1 ao NrF2. A liberação deste fator pode ser facilitada pela fosforilação de resíduos específicos de serina ou treonina (Suhr et al., 2009), de forma que o NrF2 dissocia-se do complexo, estabiliza-se e é translocado ao núcleo, onde interage com as proteínas co-ativadoras CBP/p300 e promove a expressão gênica mediada pelo ARE (Kang et al., 2005; Kaspar et al., 2009). Estudos em modelos de dor neuropática, inclusive em modelo de secção unilateral completa do nervo isquiático desenvolvidos por esta equipe de pesquisadores (Guedes et al., 2008; 2009), evidenciaram o aumento da produção de ROS na medula espinal, particularmente do superóxido mitocondrial (Park et al., 2006; Kim et al., 2008; Schwartz et al., 2009). A ação destas espécies na dissociação do NrF2 da Keap-1 com consequente translocação deste fator para o núcleo celular e ativação da transcrição gênica, particularmente de enzimas antioxidantes, tem sido descrita (Levonen et al., 2004; Fourquet et al., 2010).

Como o presente estudo não avaliou a fração nuclear, não se pode descartar a possibilidade de translocação do NrF2 para o núcleo celular. Portanto, a relação entre secção nervosa periférica, aumento de ROS e RNS na medula espinal, ativação da via do NrF2 e aumento da síntese de antioxidantes e outras proteínas citoprotetoras constitui ainda uma hipótese bastante plausível. Até o presente momento, é possível afirmar apenas que a secção nervosa periférica afeta a quantidade citoplasmática deste fator na medula espinal lombossacral após 15 dias de lesão. Entretanto, é necessária uma análise mais detalhada acerca dos efeitos da axotomia periférica sobre a localização subcelular do NrF2 e expressão protéica de genes cuja transcrição é estimulada por este fator, dada a importância da ativação desta via para a

sobrevivência neuronal, como relatado para o tecido nervoso sob condições de estresse (Vargas et al., 2006; 2008). Deve ser lembrado que a via do Nrf2 é considerada a mais importante na defesa da célula contra o estresse oxidativo (Zhang, 2006; Kobayashi & Yamamoto, 2006; Copple et al., 2008) e nossos resultados não descartam a possibilidade de participação desta via em períodos iniciais após lesão nervosa periférica.

Os eventos centrais subseqüentes à lesão nervosa periférica podem culminar na ativação dos receptores NMDA, geração de ROS, diminuição de defesas antioxidantes e ativação de efetoras do processo de morte celular programada, (Siniscalco et al., 2007). Este estudo analisou a expressão do AIF na medula espinal de ratos controle e após a manipulação e secção do nervo isquiático e nenhuma alteração na quantidade deste fator foi observada entre estes animais (Figura 12D), que apresentaram valores basais de AIF inalterados pelo estímulo nociceptivo. Sugere-se que a participação de outras vias de sinalização esteja evitando a ocorrência de apoptose na medula espinal, como a ativação da Akt, evidenciada após a secção do nervo isquiático nos períodos iniciais da lesão (Guedes et al., 2008). Além disso, torna-se importante considerar que outras vias de sinalização para a sobrevivência celular podem ser ativadas por alterações no estado redox da célula, como a do NFkB, que promove a inibição de importantes mediadores do processo apoptótico (Trachootham, 2008). No entanto, não se descarta a hipótese que a secção do nervo isquiático promova perda neuronal no SNC pela ativação de outras vias de sinalização apoptóticas, como a da Bax, Bcl-X_s, ASK1 e outras que culminam na ativação das caspases.

CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho, pode-se concluir que:

- A secção unilateral do nervo isquiático provoca aumento na sensibilidade mecânica de ratos e pode ser uma manifestação do quadro de hiperalgesia destes animais;
- Os animais denervados apresentam uma perda motora e funcional da pata que sofreu denervação, evidente ainda aos 15 dias da lesão nervosa;
- As enzimas TrxR e G6PDH tem sua atividade reduzida nos animais *sham* e denervados, evidenciando que tanto a secção do nervo isquiático quanto a manipulação deste nervo constituem estímulos capazes de promover alterações em sistemas enzimáticos na medula espinal. Apesar de não ter sido evidenciada a diminuição do NADPH do tecido nervoso espinal, a limitação de substratos para a atividade da TrxR poderia ser um fator limitante à sua atividade. Já a diminuição na atividade da G6PDH pode ser decorrente de alterações no metabolismo da glicose na medula espinal ou ainda ser resultado de algum mecanismo de regulação alostérica ativado em resposta a variação na concentração deste substrato energético;
- A redução da quantidade de AA na medula espinal dos grupos *sham* e denervados pode ser consequência da oxidação irreversível deste antioxidante pelo aumento de ROS na medula espinal destes animais. Ainda, pode estar ocorrendo uma depleção nos estoques de AA da medula espinal, decorrente de alguma deficiência na síntese ou transporte deste antioxidante para o interior do tecido nervoso;
- O NrF2 tem sua expressão protéica aumentada aos 15 dias nos animais denervados, cuja ação sobre a transcrição gênica não foi estabelecida já que foi avaliada a fração citoplasmática do tecido nervoso espinal.
- A expressão protéica do AIF não foi alterada após a manipulação e/ou secção do nervo ciático, sugerindo que os mecanismos relacionados à sobrevivência celular podem estar sendo recrutados pela medula espinal a fim de evitar a perda neuronal e manter a integridade do tecido.

REFERÊNCIAS

- Arnér ES and Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J Biochem.* 267: 6102-6109.
- Arnér ES (2009) Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1790(6):495-526. Epub 2009 Feb 11.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10: 18-25.
- Ayyildiz M, Coskun S, Yildirim M, Agar E (2007) The effects of ascorbic acid on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsia.* 48(7):1388-95. Epub 2007 May 13.
- Azkue JJ, Zimmermann M, Hsieh TF, Herdegen T (1998) Peripheral nerve insult induces NMDA receptor-mediated delayed degeneration in spinal neurons. *Eur. J Neurosci.* 10:2204-2206.
- Barbosa L F, Medeiros MHG, Augusto O (2006) Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quím. Nova [online]* 29(6):1352-1360.
- Ben-Yoseph O, Boxer PA, Ross BD (1996) Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J. Neurochem.* 66:2329-2337.
- Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM (1986) The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* 2:419-444.
- Bolaños JP, Delgado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A (2008) Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. *Biochim. Biophys. Acta* 1777(7-8):789-93. Epub 2008 Apr 13. Review.
- Boll MC, 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.
- 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.* 72:248-54.
- Brookes PS, Salinas EP, Darley-usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-usmar, VM, Anderson PG (2000) Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J Biol. Chem.* 275: 20474-20479.
- Burhans WC, Heintz NH (2009) The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. *Free Rad. Biol. Med.* 47(9):1282-1293.

- Burns JJ (1959) Biosynthesis of L-ascorbic acid: basic defect in scurvy. *Am J Med.* 26:740-748.
- Byers MR, Bonica JJ (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.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J Physiol. Cell. Physiol.* 287:C817-33.
- Campbell JN, Meyer RA (2006) Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52(1):77-92. Review.
- Carey DJ, Todd MS (1987) Schwann cell myelination in a chemically defined medium: demonstration of a requirement for additives that promote Schwann cell extracellular matrix formation. *Brain Res.* 429(1):95-102.
- Cenas N, Prast S, Nivinskas H, Sarlauskas J, Arnér ES (2006) Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells. *J Biol. Chem.* 281(9):5593-603. Epub 2005 Dec 14.
- Chung JM (2004) The role of reactive oxygen species (ROS) in persistent pain. *Mol. Interv.* 4:248-250.
- Chen R, Cohen LG, Hallett M (2002) Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 111(4):761-73.
- Contestabile A (2008) Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. *Prog. Neurobiol.* 84:317-28.
- Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK (2008) The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246(1):24-33. Epub 2007 Nov 12. Review.
- Costigan M, Scholz J, Samad T and Woolf CJ (2006) Pain. In: Siegel, GJ, Albers RW, Brady S, Price DL (eds). *Basic Neurochemistry*. Academic Press 7th edition, 927-938.
- Coyle J, Puttfarcken P, (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Cusick CG (1996) Extensive cortical reorganization following sciatic nerve injury in adult rats versus restricted reorganization after neonatal injury: implications for spatial and temporal limits on somatosensory plasticity. *Prog. Brain Res.* 108:379-90.
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52:1-6.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.* 77(3):634-643.

- Holmgren A, Björnstedt M (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 252:199-208.
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth.* 101(1):8-16. Epub 2008 Apr 15. Review.
- Dray A (1995) Inflammatory mediators of pain. *Br. J Anaesth.* 75: 125-131.
- de Novellis V, Siniscalco D, Galderisi U, Fuccio C, Nolano M, Santoro L, Cascino A, Roth KA, Rossi F, Maione S (2004) Blockade of glutamate mGlu5 receptors in a rat model of neuropathic pain prevents early over-expression of pro-apoptotic genes and morphological changes in dorsal horn lamina II. *Neuropharmacology* 46(4):468-79.
- de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B, Hoozemans J, van Horsen J. (2008) Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic. Biol. Med.* 45(10):1375-83. Epub 2008 Sep 13.
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-95.
- Dubner R (1983) Pain research in animals. *Ann. NY Acad. Sci.* 75:128-132.
- Eldridge CF, Bunge MB, Bunge RP, Wood PM (1987) Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. *J Cell Biol.* 105(2):1023-34.
- Endoh M, Kunishita T, Tabira T (1993) Thioredoxin from activated macrophages as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192(2):760-5.
- Esposti MD (2002) The roles of Bid. *Apoptosis* 7:433-440.
- Fang J, Holmgren A (2006) Inhibition of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase by 4-Hydroxy-2-nonenal in Vitro and in Vivo. *J Am. Chem. Soc.* 128(6):1879-1885.
- Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Nin Brauer MC, Gonzalez-Rodriguez LL, Frussa-Filho R, Wajne RM, deMello CF (1999) Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport* 10:2039-2043.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB (2010) Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol. Chem.* 285(11):8463-71. Epub 2010 Jan 8.
- Frei B, Stocker R, Ames BN (1992) Small molecule antioxidant defenses in human extracellular fluids. *Current Com. Cell Mol. Biol.* 5:23-45.
- Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp. Biol.* 201(8):1203-9. Review.

- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J Cell Biol.* 2010:214074. Epub 2010 Feb 21.
- Gabbita SP, Robinson KA, Stewart CA, Floyd RA, Hensley K (2000) Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arq. Biochem. Biophys.* 376:1-13.
- Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K (2007) Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 131(3):262-71. Epub 2007 Feb 20.
- Garcia Nogales P, Almeida A, Bolaños JP (2003) Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *J Biol. Chem.* 278:864-874.
- Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ (2002) The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 1264-1275.
- Gillardot F, Klimaschewski L, Wickert H, Krajewski S, Reed JC, Zimmermann M (1996) Expression pattern of candidate cell death effector proteins Bax, Bcl-2, Bcl-X, and c-Jun in sensory and motor neurons following sciatic nerve transection in the rat. *Brain Res.* 739(1-2):244-50.
- Guedes RP, Dal Bosco L, Teixeira CM, Araújo ASR, Llesuy S, Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA (2006) Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. *Neurochem. Res.* 31:603-609.
- Guedes RP, Araújo AS, Janner D, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA (2008) Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 28(8):1049-56. Epub 2008 Apr 1.
- Guedes RP, Dal Bosco L, Araújo AS, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA (2009) Sciatic nerve transection increases glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 80(6):422-7. Epub 2009 Aug 14.
- Grünewald R A (1993) Ascorbic acid in the brain *Brain Res. Ver.* 18(1):123-133.
- Haanpää ML, Backonja MM, Bennett MI, Bouhassira D, Cruccu G, Hansson PT, Jensen TS, Kauppila T, Rice AS, Smith BH, Treede RD, Baron R (2009) Assessment of neuropathic pain in primary care. *Am. J Med.* 122(10):13-21.
- Haddad JJ (2002) Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal.* 14(11):879-97. Review.
- Haince JF, Rouleau M, Hendzel MJ, Masson JY, Poirier GG (2005) Targeting poly(ADP-ribose)ylation: a promising approach in cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 11:456-463.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine.* 3th edition. Oxford University Press.

- Han DS, Cadenas E, Kobayashi MS, Packer L (2000) Oxidative stress in glutamate Neurotoxicity *Oxid. Stress Dis.* 5:127-156.
- Harrison FE, May JM (2009) Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Rad. Biol. Med.* 46(6):719-30. Epub 2009 Jan 6.
- Hedström E, Eriksson S, Zawacka-Pankau J, Arnér ES, Selivanova G (2009) p53-dependent inhibition of TrxR1 contributes to the tumor-specific induction of apoptosis by RITA. *Cell Cycle* 8(21):3576-83. Epub 2009 Nov 1.
- Hill KE, McCollum GW, Boeglin ME, Burk RF (1997) Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234(2):293-5.
- Himes BT, Tessler A (1989) Death of some dorsal root ganglion neurons and plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. *J Comp. Neurol.* 284:215-230.
- Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94:3633-3638.
- Ho HY, Cheng ML, Chiu DT (2007) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep.* 12(3):109-18.
- Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54:237-271.
- Holmgren A, Björnstedt M (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 252:199-208.
- Hood J (1969) Femoral neuropathy in scurvy. *N Engl. J Med.* 281(23):1292-3.
- Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EE, Rigon P, Xavier LL, Achaval M (2008) Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil. Neural Repair.* 22(4):355-66. Epub 2008 Mar 8.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh K, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:313-322.
- Ishii Y, Itoh K, Morishima Y, Kimura T, Kiwamoto T, Iizuka T, Hegab AE, Hosoya T, Nomura A, Sakamoto T, Yamamoto M, Sekizawa K (2005) Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. *J Immunol.* 175(10):6968-75.
- Ischiropoulos H, Beckman JS (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect or association? *J Clin. Invest.* 111:163-169.
- Jalalvand E, Javan M, Haeri-Rohani A, Ahmadiani A (2008) Stress- and non-stress-mediated mechanisms are involved in pain-induced apoptosis in hippocampus and dorsal lumbar spinal cord in rats. *Neuroscience* 157(2):446-52. Epub 2008 Sep 4.

- Johnson, D.A., G.K. Andrews, W. Xu J.A. Johnson (2002) Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice. *J Neurochem.* 81:1233–1241.
- Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann. NY Acad. Sci.* 1147:61-9.
- Kang KW, Lee SJ, Kim SG (2005) Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 7(11-12):1664-73.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 47(9):1304-9. Epub 2009 Aug 7. Review.
- Kauppila T, Xu XJ (1996) Sciatic nerve section induces mechanical hyperalgesia in skin adjacent to the deafferented region in rats: lack of correlation with autotomy behavior. *Neurosci. Lett.* 211:65-67.
- Kavaliers, M. 1988. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.* 21: 923-931.
- Kawamata T, Omote K (1999) Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3,5-monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. *Anesthesiology* 91(5):1415-24.
- 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(1):31-7.
- 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 Radic. Biol. Med.* 31(4):430-9.
- Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM (2004) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in rat model of neuropathic pain. *Pain* 111:1116–24.
- Kim D, Chung J (2002) Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol.* 35(1):106-15. Review.
- Kim HY, Chung JM, Chung K (2008) Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: the effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci. Lett.* 447(1):87-91. Epub 2008 Sep 24.
- Kingery WS, Vallin JA (1989) The development of chronic mechanical hyperalgesia, autotomy and collateral sprouting following sciatic nerve section in rat. *Pain* 38(3):321-32.
- 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(1):59-66.

- Klusáková I, Dubový P (2009) Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. *Ann. Anat.* 191(3):248-59. Epub 2009 Apr 10.
- Kobayashi M, Yamamoto M (2005) Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation, *Antioxid. Redox Signal.* 7:385–394.
- Korb A, Bonetti LV, da Silva SA, Marcuzzo S, Ilha J, Bertagnolli M, Partata WA, Faccioni-Heuser MC (2010) Effect of treadmill exercise on serotonin immunoreactivity in medullary raphe nuclei and spinal cord following sciatic nerve transection in rats. *Neurochem. Res.* 35(3):380-9. Epub 2009 Sep 23.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2007) Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog. Neurobiol.* 81(3):179-96. Epub 2007 Jan 5.
- Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* 11:725–730.
- Kusmaul L, Hamprecht B, Dringen R (1999) The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. *J Neurochem.* 73:1246–1253.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lazzeri L (1977) Fases fundamentais da técnica cirúrgica. JM Varela Livros, 1-190.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53(4):597-652. Review.
- Lee KY, Chung K, Chung JM (2010) Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J Neurophysiol.* 2010 Jan;103(1):382-91. Epub 2009 Nov 11.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1995) *Principles of Biochemistry*. 3th edition, Worth Publishers Inc., New York, NY.
- Leong SF, Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain: enzymes associated with glucose metabolism. *Biochem. Journal* 218:131-138.
- Lerouet D, Beray-Berthat 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.* 958:166-75.
- Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM (2004) Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. Journal* 378(2):373-82.
- Levy D, Zochodne DW (2004) NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Pract.* 4(1):11-8.

- Liang WJ, Johnson D, Ma LS, Jarvis SM, Wei-Jun L (2002) Regulation of the human vitamin C transporters expressed in COS-1 cells by protein kinase C [corrected]. *Am. J Physiol. Cell Physiol.* 283:1696-1704.
- Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, Kong AN (2008) Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 76(11):1485-9. Epub 2008 Jul 23.
- Lippoldt A, Padilla CA, Gerst H, Andbjør B, Richter E, Holmgren A, Fuxe K (1995) Localization of thioredoxin in the rat brain and functional implications. *J Neurosci.* 15:6747-6756.
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71(3):241-9.
- Lorenzo HK, Susin AS (2007) Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat.* 10(6):235-55. Epub 2008 Jan 3. Review.
- Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 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. *Neurosci.* 86: 1217-1234.
- MacGregor DG, Avshalomov MV, Rice ME (2003) Brain edema induced by in vitro ischemia: causal factors and neuroprotection. *J Neurochem.* 85:1402-1411.
- Maellaro E, Del Bello B, Sugherini L, Santucci A, Comporti M, and Casini AF (1994) Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Biochem. Journal* 301: 471-476.
- Maher P (2006) Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance. *Antioxid. Redox Signal.* 8(11-12):1941-70.
- Maione S, Siniscalco D, Galderisi U, de Novellis V, Uliano R, Di Bernardo G, Berrino L, Cascino A, Rossi F (2002) Apoptotic genes expression in the lumbar dorsal horn in a model neuropathic pain in rat. *Neuroreport* 13:101-106.
- Mansur K, Iwahashi Y, Kiryu-Seo S, Su Q, Namikawa K, Yodoi J, Kiyama H (1998) Up-regulation of thioredoxin expression in motor neurons after nerve injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 62:86-91.
- Mao J, Price DD, Coghill RC, Mayer DJ, Hayes RL (1992) Spatial patterns of spinal cord [¹⁴C]-2-deoxyglucose metabolic activity in a rat model of painful peripheral mononeuropathy. *Pain* 50(1):89-100.
- Masutani H, Bai J, Kim YC, Yodoi J (2004) Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 29(3):229-42.

- Masutani H, Ueda S, Yodoi J (2005) The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1:991-8.
- Mates JM, Sanchez-Jimenez FM (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: Implications for cancer therapy. *Internatl J Biochem. Cell Biol.* 32:157-170.
- Matsuka Y, Ono T, Iwase H, Mitirattanakul S, Omoto KS, Cho T, Lam YY, Snyder B, Spigelman I (2008) Altered ATP release and metabolism in dorsal root ganglia of neuropathic rats. *Mol. Pain* 4:66.
- May J M (2002) Recycling of vitamin C by mammalian thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 347: 327–332.
- Millan JM. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57: 1-164.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem.* 276(19):16391-8. Epub 2001 Feb 13.
- Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat. Ver. Neurosci.* 10(4):283-94. Epub 2009 Mar 4. Review.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS (2006) Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev. Bras. Fisioter.* 10(1): 113-119.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (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):6724-31.
- Navarro X (2007) Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *Int. Rev. Neurobiol.* 87:483-505.
- Nguyen, T, Sherratt, P J, and Pickett, C. B (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233-260.
- Niki E (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *The Am. J Clin. Nutr.* 54:1119S-1124S.
- Nordberg J, Arnér ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31(11):1287-312.
- Oliveira MS, Furian AF, Royes LFF, Figuera MR, De Carvalho J, Fiorenza NG, Mello CF (2004) Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128:721-728.
- Osburn WO, Kensler TW (2008) Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 659:31–39.

- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K (2005) Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO Journal* 24:1375-1386.
- Pareyson D, Marchesi C (2009) Diagnosis, natural history and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol.* 8(7):654-67.
- Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K (2006) Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.* 391:108-111.
- Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontés M (2004) Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.* 10(4):396-401. Epub 2004 Mar 21.
- Patenaude A, Murthy MR, Mirault ME (2005) Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(10):1063-80.
- Plant GW, Currier PF, Cuervo EP, Bates ML, Pressman Y, Bunge MB, Wood PM (2002) Purified adult ensheathing glia fail to myelinate axons under culture conditions that enable Schwann cells to form myelin. *J Neurosci.* 22(14):6083-91.
- Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol. Chem.* 280:6447-6454.
- Powis G, Montfort WR (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:261-95.
- Price DD, Mao JR, Coghill RC, d'Avella D, Cicciarello R, Fiori MG, Mayer DJ, Hayes RL (1991) Regional changes in spinal cord glucose metabolism in a rat model of painful neuropathy. *Brain Res.* 64(2):314-8.
- Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tudor RM, Georas SN, Biswal S (2005) Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp. Med.* 202(1):47-59.
- Rebec GV, Barton SJ, Marseilles AM, Collins K (2003) Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport* 14:1263-1265.
- Ribeiro SMR, Queiroz JH, Pelúzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR (2005) A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal* 21(3):133-149. Versão online.
- Rice ME (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23(5):209-16. Review.
- Richardson TIL, Ball L, Rosenfeld T (2002) Will an orange a day keep the doctor away? *Postgrad. Med. J.* 78:292-294.

- Roe JM, Kuether CA (1942) Detection of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol. Chem.* 147: 399-407.
- 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.
- Sagara JI, Miura K, Bannai S (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem.* 61:1672-1676
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 17:2596-2606.
- Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV (2008) SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* 34(3):347-55. Epub 2007 Jun 1.
- Schwartz ES, Lee I, Chung K, Chung JM (2008) Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 138(3):514-24. Epub 2008 Mar 28.
- Shibata N, Kakita A, Takahashi H, Ihara Y, Nobukuni K, Fujimura H, Sakoda S, Sasaki S, Yamamoto T, Kobayashi M (2009) Persistent cleavage and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in motor neurons in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol.* 2009 Aug 9. [Epub ahead of print]
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci.* 23(8):3394-406.
- Siniscalco D, Fuccio C, Giordano C, Ferraraccio F, Palazzo E, Luongo L, Rossi F, Roth KA, 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):158-66. Epub 2006 Dec 1.
- Siniscalco D, Giordano C, Fuccio C, Luongo L, Ferraraccio F, Rossi F, de Novellis V, Roth KA, Maione S (2008) Involvement of subtype 1 metabotropic glutamate receptors in apoptosis and caspase-7 over-expression in spinal cord of neuropathic rats. *Pharmacol. Res.* 57(3):223-33. Epub 2008 Feb 2.
- Skulachev VP (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 423, 275-280.
- Soerensen J, Jakupoglu C, Beck H, Förster H, Schmidt J, Schmahl W, Schweizer U, Conrad M, Brielmeier M (2008) The role of thioredoxin reductases in brain development. *PLoS One* 3(3):1813.

- 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(5):478-85.
- Stemme S, Hansson H A, Holmgren A, Rozell B (1985) Axoplasmic transport of thioredoxin and thioredoxin reductase in rat sciatic nerve. *Brain Res.* 359: 140-146.
- Surh YJ, Kundu JK, Li MH, Na HK, Cha YN (2009) Role of Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Upregulation in Adaptive Survival Response to Nitrosative Stress *Arch. Pharm. Res.* 32(8):1163-76. Epub 2009 Aug 29.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718):441-6.
- Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J (1999) Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(7):4131-6.
- Takagi Y, Hattori I, Nozaki K, Mitsui A, Ishikawa M, Hashimoto N, Yodoi J (2000) Excitotoxic hippocampal injury is attenuated in thioredoxin transgenic mice. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 20(5):829-33.
- Tolbert BM (1985) Metabolism and function of ascorbic acid and its metabolites. *Int. J Vitam. Nutr. Res. Suppl.* 27: 121-138.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10(8):1343-74. Review.
- Turk DC, Melzack R (2001) *Handbook of pain assessment* . The Guilford Press 2rd edition.
- Ulfenius C, Linderöth B, Meyerson BA, Wallin J (2006) Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci. Lett.* 399(1-2):85-90. Epub 2006 Feb 8.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, 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. Epub 2006 Aug 4.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman JS, Barbeito L (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem.* 97(3):687-96. Epub 2006 Mar 8.
- Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA (2008) Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 28(50):13574-81.
- Vatassery GT, Lai JC, DeMaster EG, Smith WE, Quach HT (2004) Oxidation of vitamin E and vitamin C and inhibition of brain mitochondrial oxidative phosphorylation by peroxynitrite. *J Neurosci Res.* 75(6):845-53.

- Vincent AM, Kato K, McLean LL, Soules ME, Feldman EL (2009) Sensory neurons and schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* 11(3):425-38.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7(2):103-11.
- Wells WW, Xu DP (1994) Dehydroascorbate reduction. *J Bioenerg. Biomembr.* 26:369-377.
- Wilson JX (2002) The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett.* 527:5-9.
- Woolf CJ, Thompson SW (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):293-9.
- Whiteside GT, Munglani R (2001) Cell death in the superficial dorsal horn in a model of neuropathic pain. *J Neurosci. Res.* 64:168–173.
- Wilson JX (2002) The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett.* 527: 5-9.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288(5472):1765-9.
- Xu DP, Washburn M P, Sun G P, Wells W W (1996) Purification and characterization of a glutathione dependent dehydroascorbate reductase from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 117-121.
- 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. Epub 2007 May 5.
- Yamamoto M, Sato N, Tajima H, Furuke K, Ohira A, Honda Y, Yodoi J (1997) Induction of human thioredoxin in cultured human retinal pigment epithelial cells through cyclic AMP-dependent pathway; involvement in the cytoprotective activity of prostaglandin E1. *Exp. Eye Res.* 65, 645–652.
- Yamamoto N, Kabuto H, Matsumoto S, Ogawa N, Yokoi I (2002) α -Tocopheryl-L-ascorbate-2-O-phosphatediester, a hydroxyl radical scavenger, prevents the occurrence of epileptic foci in a rat model of post-traumatic epilepsy. *Pathophysiol.* 8:205-214.
- Yu SW, Andrabi AS, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose)(PAR)polymer-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:18314-18319.
- Yuste VJ, Moubarak RS, Delettre C, Bras M, Sancho P, Robert N, d'Alayer and J, Susin AS (2005) Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell Death Differ.* 12:1445–1448.

- Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC (2000) High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells, *The Journal of Biological Chemistry* 275:40042–40047.
- Zhang DD (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* 38(4):769-89. Review.
- Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y (2005) Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* 579(14):3029-36.
- Zimmermann M (1986) Behavioural investigations of pain in animals, in *Assessing Pain in Farm Animals* (Duncan IJ Hand Molony Yeds) 16–29, Office for Official Publications of the European Communities, Bruxelles.
- Zimmermann M (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J Pharmacol.* 429: 23-37.