

Beatriz Stein Neto

PAPEL DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE-2
E DE ALDEÍDOS REATIVOS NA DOR NEUROPÁTICA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia
do Instituto Butantan para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

Beatriz Stein Neto

PAPEL DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE-2 E DE
ALDEÍDOS REATIVOS NA DOR NEUROPÁTICA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia
do Instituto Butantan para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Vanessa Olzon Zambelli

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Neto, Beatriz Stein

Papel da enzima aldeído desidrogenase-2 e de aldeídos reativos na dor neuropática / Beatriz Stein Neto ; orientadora Vanessa Olzon Zambelli. – São Paulo, 2019.

74 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Bioprospecção e Desenvolvimento.

1. Dor. 2. Estresse oxidativo. 3. Aldeído desidrogenase-2. 4. Aldeídos. 5. Neuropatia. 6. Bioprospecção e Desenvolvimento. I. Zambelli, Vanessa Olzon. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

CDD 615.9

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Beatriz Stein Neto, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências -Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação após a data da defesa:

- () Imediato
() 06 meses
(X) 12 meses
() Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 22 de de abril de 2019.


.....
Aluna – Beatriz Stein Neto

De acordo: 
.....
Orientadoa: Dr^a Vanessa Olzon Zambelli

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

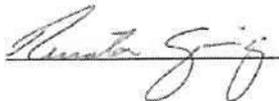
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: BEATRIZ STEIN NETO

DATA DO EXAME: 22/03/2019

BANCA EXAMINADORA: Profas. Dras.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Vanessa O. Zambelli (Presidente)		(X)	()
Marucia Chacur		(X)	()
Renata Giorgi		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADA (X) REPROVADA ()

Comentários da Banca (opcional):



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN

ib butantan

COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA DO INSTITUTO BUTANTAN (CIBio-IBu)
Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55-11) 2627-9585
cibio.butantan@butantan.gov.br

Carta CIBio-IBu - 40/2014

São Paulo, 04 de novembro de 2014

Ilma. Sra.
Dra. Vanessa Olzon Zambelli
Pesquisadora
Laboratório de Especial de Dor e Sinalização

Prezada Dra. Vanessa,

Comunicamos que a Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Butantan–CIBio/IBu, autoriza o desenvolvimentos dos projetos: “: **Papel da enzima aldeído desidrogenase-2 e 4-hidroxinonenal na dor**” dentro do Certificado de Qualidade em Biossegurança 039/98 – CQB 039/98, no Biotério do Laboratório Especial de Dor e Sinalização com Nível de Biossegurança I (Extrato de Parecer nº 4253/2014 em 10/10/2014) por ter sido o projeto classificado como sendo de Nível de Biossegurança I (NBI), conforme parecer em anexo.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente

Aryene Góes Trezena
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto Butantan

Dedico esse trabalho aos meus pais pelo carinho e apoio imensuráveis e imprescindíveis para a formação do mesmo.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Vanessa Zambelli. Que no decorrer dos anos sempre demonstrou muita paciência, dedicação e paixão pela ciência. Me incentivando a encontrar essa curiosidade pelo pensamento crítico. Obrigada por acreditar em mim e mostrar que aprimoramento é algo constante e rotineiro.

A Bianca Evangelista, que durante esses anos foi colega, terceiro braço e ombro parceiro e amigo. Aos alunos de iniciação científica Guilherme Galdino e Karina Dias, que de alguma forma sempre ajudaram e colaboraram com a realização desse projeto. Obrigada também a todos os colegas do Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS) pelas dicas, conversas e trocas.

A toda a equipe do biotério e secretaria do LEDS por auxiliar e facilitar a rotina laboratorial.

Aos colegas e professores obrigada pela convivência e aprendizados do dia a dia.

Aos meus pais e irmão pelo apoio e amor incondicionais!

Aos meus amigos Kevin, Vitória, Felipe e tantos outros que durante esses anos foram pacientes e proporcionaram suporte emocional, conselhos, ouvidos e muito carinho!

A Deus por me proteger e me enviar pessoas que me incentivam ao crescimento e me apoiam! Por iluminar meus passos e me permitir finalizar esse projeto.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) número do processo da bolsa de mestrado: 2016/01485-0, auxílio regular à pesquisa: 2017/16071-5.

"Na vida, não existe nada a temer, mas a entender."

Marie Curie

RESUMO

NETO, Beatriz Stein. **Papel da enzima Aldeído Desidrogenase-2 e de Aldeídos Reativos na Dor Neuropática**. 2019. 74. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

O controle da dor neuropática é um desafio e uma necessidade clínica não atendida. A aldeído-desidrogenase 2 (ALDH2) é uma enzima mitocondrial responsável pelo metabolismo de aldeídos reativos, incluindo o acetaldeído, 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA). A geração endógena de aldeídos reativos ocorre sob estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Nosso grupo demonstrou que aldeídos reativos estão diretamente relacionados com a gênese da dor aguda inflamatória, uma vez que a Alda-1, uma pequena molécula que ativa seletivamente a ALDH2 induz analgesia por reduzir os níveis desses aldeídos no tecido inflamado. No entanto, o papel dessa enzima na dor neuropática é desconhecido. Portanto, o objetivo deste projeto foi investigar se a ativação sustentada da ALDH2 seria capaz de controlar a dor neuropática em camundongos. Para tanto, utilizamos duas estratégias: (a) perda de função da ALDH2, por meio da utilização de camundongos transgênicos portadores de uma mutação que inativa a ALDH2 (ALDH2*2) ou inibição farmacológica da ALDH2 (Aldi) e (b) ganho de função da ALDH2, por meio da administração de Alda-1. Animais selvagens C57/BL foram utilizados como controle. A neuropatia foi induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). O limiar nociceptivo foi determinado, antes e por 28 dias após a cirurgia, utilizando o método de filamentos de von Frey. Após a avaliação nociceptiva, amostras de tecidos envolvidos nas vias nociceptivas como a medula espinal, gânglio da raiz dorsal (DRG), nervo isquiático e sangue foram obtidas para detecção de adutos de 4-HNE por Western blot ou ensaio de ELISA competitivo. O MDA foi quantificado por detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nossos resultados mostraram que CCI diminuiu o limiar nociceptivo (hiperalgesia), tanto nos camundongos selvagens quanto ALDH2*2, por todo o período de observação, ou seja, 28 dias). A Alda-1 bloqueia a hiperalgesia induzida pela CCI nos animais selvagens por 14 dias. Esse efeito não é mais detectado no 21º e 28º dias. Com relação aos animais ALDH2*2, a Alda-1 induz analgesia por 14 dias. Este efeito analgésico é parcial no 21º e 28º dias. Os ensaios bioquímicos demonstraram que a

CCI não alterou os níveis de adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinhal, nervo isquiático ou DRG. Interessantemente, detectamos aumento nos níveis deste aldeído no soro de animais, 7 dias após a CCI. A elevação sistêmica de 4-HNE é acompanhada de aumento de MDA no nervo isquiático. A elevação desses aldeídos é controlada pela ativação sustentada da ALDH2 pela Alda-1. Não detectamos alteração significativa nos níveis desses aldeídos em animais ALDH2*2. Por outro lado, a inibição da ALDH2 pela Aldi favoreceu o acúmulo de MDA no nervo isquiático de animais operados, 28 dias após a CCI. Em conjunto, nossos resultados indicam que a Alda-1 apresenta efeito analgésico em modelo de neuropatia. Esse efeito parece ser decorrente da inibição de aldeídos circulantes e do seu acúmulo no local da lesão. Assim, a ALDH2 pode ser um novo alvo terapêutico para o controle da dor neuropática.

Palavras-chave: Aldeído desidrogenase-2. Dor neuropática. Hiperalgisia. Estresse oxidativo. Aldeídos.

ABSTRACT

NETO, Beatriz Stein. **The Role of Aldehyde Dehydrogenase-2 Enzyme and Reactive Aldehydes in Neuropathic Pain**. 2019. 74 p. Master's dissertation (Master's degree in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

Neuropathic pain control is a challenge and unmet clinical need. Aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) is a mitochondrial enzyme responsible for the metabolism of reactive aldehydes, such as acetaldehydes, 4-hidroxinonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA). The endogenous generation of reactive aldehydes occurs upon oxidative stress and lipid peroxidation. Our group demonstrated that reactive aldehydes are directly involved with the genesis of acute pain, once that Alda-1, a small molecule that selectively activates the ALDH2 induces analgesia by reducing the levels of these reactive aldehydes in the inflamed tissue. However, the role of this enzyme in neuropathic pain is still unknown. Therefore, the aim of this project was to investigate if the sustained activation of ALDH2 is able to control the development of neuropathic pain in mice. Thus, we used two strategies: (a) ALDH2 loss of function, by using a transgenic mice that carries an inactivating point mutation in ALDH2 (ALDH2*2) or pharmacological inhibition of ALDH2 (Aldi) and (b) gain of function, by giving Alda-1 to mice. Wild type mice C57/BL were used as control group. Neuropathy was induced by the chronic constriction of the sciatic nerve (CCI). The nociceptive threshold was determined before and during 28 days after surgery, by the von-Frey filaments method. After the nociceptive evaluation, samples of tissues involved in the nociceptive pathway, such as spinal cord, dorsal root ganglia (DRG), sciatic nerve and blood were obtained for the detection of 4-HNE adducts by Western Blot or competitive ELISA assay. MDA was quantified by detection of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS). Our results showed that the CCI reduces the nociceptive threshold (hyperalgesia), both on wild type mice and ALDH2*2, for the entire period of observation (28 days). Alda-1 blocks the hyperalgesia-induced by CCI in the wild type mice. This effect persists for 14 days and is no longer detected on days 21th and 28th. Regarding the ALDH2*2 animals, Alda-1 induces analgesia for 14 days. This effect is partial on 21th and 28th days. The biochemical assays demonstrated that the CCI did not alter the levels of 4-HNE adducts with proteins from the spinal cord, sciatic nerve or DRG. Interestingly, elevation on the levels of

these aldehyde were evaluated in serum, 7 days after CCI. The systemic increasing in 4-HNE is accompanied by the elevation of MDA in the sciatic nerve. These alterations are controlled by the sustained activation of ALDH2 by Alda-1. Alterations of this aldehydes were not detected in ALDH2*2 mice. On the other hand, the inhibition of ALDH2 by Aldi, contributed for the MDA sciatic nerve accumulation in the of operated mice, 28 days afterwards. Together, our data indicates that Alda-1 presents analgesic effect in neuropathic pain models. This effect seems to be due the inhibition of circulating aldehydes and accumulation at the injury site. Thereby, ALDH2 could be a new therapeutic for the neuropathic pain control.

Keywords: Aldehyde-dehydrogenase-2. Neuropathic Pain. Hyperalgesia. Oxidative Stress. Aldehydes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Circuitos da dor	22
Figura 2: Transdução do estímulo	24
Figura 3: Etapas da peroxidação lipídica não enzimática.....	28
Figura 4: Aduto de Michael	29
Figura 5: Estrutura química da Alda-1	31
Figura 6: Avaliação do desenvolvimento da neuropatia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) durante 28 dias.	42
Figura 7: Avaliação comportamental de animais tratados com inibidor farmacológico Aldi, durante 28 dias após a CCI.	43
Figura 8: Efeito da Alda-1 sobre os adutos de 4- hidroxinonenal (4-HNE) na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal (DRG) ipsilateral à constrição crônica do nervo isquiático (CCI), 7 dias após a cirurgia.	45
Figura 9: Efeito da Alda-1 sobre os adutos de 4- hidroxinonenal (4-HNE) na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal (DRG) ipsilateral à constrição crônica do nervo isquiático (CCI), 14 dias após a cirurgia.	46
Figura 10: Efeito da Alda-1 sobre os adutos de 4- hidroxinonenal (4-HNE) na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal (DRG) ipsilateral à constrição crônica do nervo isquiático (CCI), 28 dias após a cirurgia.....	47
Figura 11: Avaliação dos níveis circulantes de 4-HNE no soro de animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático e tratados com Alda-1 durante 28 dias.	49
Figura 12: Avaliação dos níveis circulantes de 4-HNE no soro de animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático e tratados com Aldi (inibidor ALDH2) durante 28 dias.	50
Figura 13: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) na medula espinal ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 14 dias após à cirurgia.....	52
Figura 14: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) no nervo isquiático ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 7 dias após à cirurgia.....	52
Figura 15: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) no nervo isquiático ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 28 dias após à cirurgia.....	53
Figura 16: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) no nervo isquiático ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 28 dias após à cirurgia.....	53

- Figura 17:** Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal ipsi e contra lateral à constrição crônica, 7 dias após a cirurgia. 67
- Figura 18:** Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na DRG ipsi e contra lateral à constrição crônica, 7 dias após a cirurgia. 68
- Figura 19:**Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal e gânglio da raiz dorsal contra lateral à constrição crônica, 7 dias após a cirurgia. . 69
- Figura 20:** Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal contralateral à constrição crônica, 14 dias após a cirurgia. 70
- Figura 21:** Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal ipsi e contra lateral à constrição crônica, 21 dias após a cirurgia. 71
- Figura 22:** Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal ipsilateral à constrição crônica, 28 dias após a cirurgia. 72
- Figura 23:** Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal no gânglio da raiz dorsal ipsi e contra lateral à constrição crônica, 28 dias após a cirurgia. 73
- Figura 24:** Efeito da Alda-1 sobre a expressão de 4- hidroxinonenal no gânglio da raiz dorsal contra lateral à constrição crônica, 28 dias após a cirurgia. 74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Dor e considerações gerais	19
1.2 Via nociceptiva – transmissão da dor.....	20
1.3 Mitocôndria e estresse celular.....	25
1.4 Peroxidação lipídica e a formação de aldeídos reativos (4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA)).....	26
1.5 Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) mitocondrial: modulação alostérica mediada por Alda-1.....	30
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais	36
4.2 Indução da dor neuropática	36
4.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa: determinação da hiperalgesia	37
4.4 Caracterização do efeito das moléculas Alda-1 e Aldi sobre a dor neuropática.....	38
4.5 Preparação das amostras de tecido.....	38
4.6 Caracterização da formação de adutos pelo 4-HNE na vigência de dor crônica causada pela CCI por Western Blot.....	38
4.7 Avaliação da concentração de adutos de 4-HNE no soro de animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático durante 28 dias.	39
4.8 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica na medula espinhal e nervo isquiático de animais submetidos à cci.....	39
4.9 Análise estatística.....	40

5. RESULTADOS	41
5.1 Avaliação do envolvimento da ALDH2 na sensibilidade nociceptiva de animais selvagens e transgênicos (ALDH2*2)	41
5.2 Avaliação do efeito da Alda-1 nos níveis de adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e gânglio da raiz dorsal (DRG), 7, 14 e 28 dias após a cirurgia.	43
5.3 Avaliação do papel da ALDH2 nos níveis circulantes de 4-HNE de animais submetidos à CCI.....	48
5.4 Avaliação dos níveis do aldeído MDA em proteínas do nervo isquiático e medula espinal de animais selvagens e transgênicos em animais submetidos à CCI: efeito da Alda-1 e Aldi	51
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE.....	67

1. INTRODUÇÃO

A aldeído desidrogenase-2 (ALDH-2) é uma importante enzima mitocondrial responsável pela eliminação de aldeídos tóxicos da célula¹⁻³. Esta enzima catalisa a oxidação destes compostos a ácidos menos reativos. Estudos realizados pelo nosso grupo, mostram que a ativação da ALDH-2, por uma pequena molécula, denominada Alda-1^{4,5}, apresenta potente efeito antinociceptivo no modelo de hiperalgisia aguda induzida pela carragenina. Este efeito é mediado pela diminuição dos níveis de aldeídos no tecido inflamado. Contudo, a contribuição desta enzima bem como de aldeídos tóxicos em fenômenos nociceptivos crônicos não foi descrita até o momento.

1.1 Dor e considerações gerais

Dor é um sintoma comum na maioria das doenças, nos acompanha desde o nascimento e sua principal função é atuar como mecanismo protetor contra estímulos nocivos⁶. De acordo com a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), dor “é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”.

Nesse contexto, é importante citar que o processo doloroso apresenta um componente subjetivo relevante⁷. Portanto, usualmente a intensidade da dor está relacionada e depende das experiências anteriores de cada indivíduo. Como a dor possui caráter emocional, utilizamos o termo nocicepção para o processo neural de codificação de estímulos nocivos (IASP). Sendo assim, a nocicepção está presente na maioria dos casos dolorosos, contudo, pode ocorrer dor sem nocicepção e nocicepção sem dor⁸.

A dor pode ser manifestada de duas formas: aguda e crônica. A dor aguda, também conhecida como dor nociceptiva, é geralmente caracterizada por ser a primeira resposta do organismo contra um estímulo ou agente nocivo, apresentando uma curta duração, em geral, três meses. A dor aguda pode ter origem inflamatória, que é uma resposta protetora e envolve células do sistema imune, vasos sanguíneos e mediadores inflamatórios. Vale lembrar que a dor é um dos cinco sinais cardinais da inflamação (edema; rubor; calor; dor e perda de função)^{9,10}. Com relação à dor crônica ocorre quando a dor aguda torna-se persistente, usualmente,

após três meses de duração. Ela pode ocorrer quando o agente nocivo não é eliminado, por exemplo. A não resolução da dor aguda pode ser classificada como dor crônica inflamatória, como a artrite reumatóide, ou dor crônica não inflamatória, como por exemplo a dor neuropática. A definição mais recente para dor neuropática da IASP é “dor causada por danos ao sistema nervoso somatossensorial devido à trauma ou doença”. Exemplos de neuropatia são: neuropatia diabética; neuralgia pós-herpética; lesões da medula espinal ou dor neuropática pós-cirúrgica¹¹.

A dor crônica é um grave problema de saúde pública, afetando um número significativo de pessoas e suas famílias. Anualmente nos Estados Unidos são realizados mais de 100 milhões de diagnósticos de dor crônica, sendo que, 50 milhões são classificados como dor parcial ou totalmente incapacitante. Estudos recentes estimam que a dor neuropática acomete cerca de 7-10% da população mundial. Apenas na América do Norte mais de U\$ 600 bilhões são gastos para o tratamento da dor crônica por ano¹²⁻¹⁴. O impacto e a severidade da dor crônica na rotina funcional do indivíduo é moldado por uma complexa interação de fatores biopsicossociais que determinam a experiência dolorosa de cada um¹³.

É importante mencionar que, a dor neuropática está associada ao aumento de prescrições e visitas regulares ao médico. Tipicamente, pacientes apresentam um conjunto distinto de sintomas, tais como: dor em queimação, dor em pontada e dor resultante de estímulos não dolorosos, como o toque leve. Os sintomas persistem e tendem a se tornar crônicos e responderem cada vez menos ao tratamento farmacológico. Distúrbios do sono, ansiedade e depressão são frequentemente diagnosticados em pacientes com dor neuropática e a qualidade de vida dos mesmos é geralmente mais prejudicada do que nos pacientes que apresentam dor crônica não-neuropática, ou seja, dor que não origina da lesão ou irritação dos nervos¹¹.

1.2 Via nociceptiva – transmissão da dor

Como mencionado anteriormente, a dor deriva de uma disfunção no sistema nervoso somatossensorial devido à trauma ou doença. Esse sistema permite a percepção do toque, pressão, dor, temperatura, percepção espacial, movimento e vibração. Os nervos somatossensoriais estão presentes na pele, músculos, fáscia e articulações, e incluem receptores que respondem a estímulos térmicos, mecânicos,

químicos e dolorosos (nociceptores), que enviam sinais para a medula espinal e em seguida para o córtex cerebral, para posterior processamento do estímulo¹¹.

Os diferentes tipos de estímulos nocivos são captados por um conjunto de fibras nervosas: fibras C não mielinizadas e fibras A δ , caracterizadas por serem de menor diâmetro e mielinizadas, que são diferentes dos sensores táteis mielinizados (as fibras A β) e os proprioreceptores. É interessante mencionar que estudos tem descrito que após lesão periférica, ocorre brotamento colateral de fibras A β de baixo limiar para neurônios nociceptivos de segunda ordem encontrados no corno dorsal da medula espinal¹⁵.

Além das fibras C e A δ , existe um outro grupo de nociceptores não-mielinizados, sensíveis a estímulos térmicos e insensíveis a estímulos mecânicos, denominados receptores “silenciosos” ou “adormecidos” (*silent/sleeping nociceptors*). Tais nociceptores não estão normalmente ativos e se tornam excitáveis, ou ativos, apenas sob condições patológicas, por exemplo na vigência de inflamação^{16,17}.

Os neurônios que constituem as fibras nociceptivas são pseudounipolares, contendo um axônio dirigido à periferia, um corpo celular presente no gânglio da raiz dorsal da medula espinal (DRG) e um axônio dirigido ao sistema nervoso central (corno dorsal da medula espinal), onde ocorre a primeira sinapse do sistema de transmissão da dor. Os estímulos nociceptivos são caracterizados como aqueles capazes de gerar lesão tecidual potencial ou real e ativar nociceptores¹⁸.

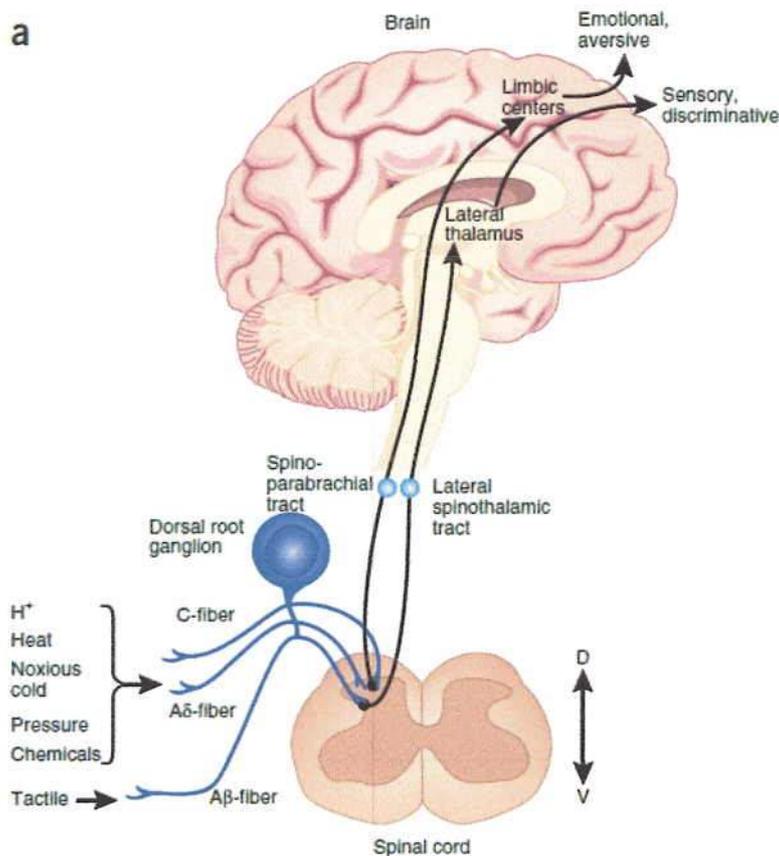
As propriedades físico-químicas dos estímulos nocivos (calor, frio, pressão e produtos químicos) são convertidos em atividade elétrica devido aos “*transient receptor potential*” ou canais TRPs e canais purinérgicos, e a propagação desse impulso elétrico é amplificada por canais de sódio para gerar os potenciais de ação¹⁵.

As aferências das fibras nociceptivas primárias que transportam esses impulsos periféricos formam sinapses glutamatérgicas (excitatórias) com neurônios de segunda ordem, principalmente nas lâminas (I e II) no corno dorsal da medula espinal, enquanto que as fibras não nociceptivas formam sinapses nas lâminas mais profundas (Fig. 1). Na coluna dorsal, ocorre a integração e processamento dos estímulos sensoriais e a transmissão dessa informação da medula espinal é realizada por várias vias para distintos locais de projeção no cérebro. Sendo assim, após a propagação da informação nociceptiva dos neurônios de primeira ordem para

os de segunda ordem, o estímulo nociceptivo é então modulado- inibitória ou excitatóriamente- e os neurônios de projeção levam a informação nociceptiva por diferentes vias ascendentes, para centros supraespinais¹⁹ (vide figura 1).

Por exemplo, o trato espinotalâmico lateral projeta entradas sensoriais multimodais de neuronios para o tálamo lateral e esse fenômeno está envolvido no processamento sensorial e discriminativo dos aspectos da dor. Em contraste, acredita-se que as áreas que medeiam o aspecto emocional e os componentes aversivos da dor envolvem o trato espinotalâmico medial e a projeção do trato espinoparabraquial ao tálamo medial, além do envolvimento de estruturas límbicas. A experiência da dor é percebida no córtex cerebral, e a informação é enviada de maneira descendente à medula espinal para permitir a reação de retirada na presença de um estímulo nocivo¹⁵.

Figura 1: Circuitos da dor



(a, b) Visão esquemática dos principais circuitos mediadores da dor fisiológica (a) algumas manifestações da dor crônica (b).
Fonte: @copyright Kuner R., 2010.

Na presença de uma lesão neural periférica, por exemplo, ocorre a degeneração dos neurônios periféricos. No local onde ocorre dano celular, numa tentativa de regeneração, forma-se um neuroma, caracterizado pelo crescimento benigno (ramificações) de tecido nervoso. Estudos utilizando microneurografia neural, realizados com seres humanos acordados que tiveram algum membro amputado e relataram sentir "dor fantasma" (sensação de sentir dor num membro que não está mais ali), demonstraram registros de fibras aferentes projetando-se em direção ao neuroma e estas apresentavam atividade ectópica espontânea, bem como disparos atípicos de potenciais de ação. Esses pacientes apresentavam dor de queimação e sensações de choque elétrico, logo, esses dados sugerem que tais sintomas estão envolvidos com a atividade ectópica aferente primária, promovendo hiperalgesia e dor espontânea¹⁹.

A definição atual de hiperalgesia pela IASP é "um aumento da resposta frente um estímulo normalmente doloroso", e por sua vez alodínia é "dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor". Hiperalgesia e alodínia são fenômenos sensoriais que se desenvolvem em indivíduos normais após uma lesão periférica e podem também se desenvolver na pele não danificada em certas condições neuropáticas. A dor visceral também é frequentemente acompanhada por sensibilização e hiperalgesia na região somática de referência²⁰. O termo hiperalgesia é aplicado para o aumento da sensibilidade à dor e está relacionada à caracterização desse fenômeno em seres humanos¹⁸. Cabe ressaltar que os termos hiperalgesia aplicam-se à diminuição do limiar de dor em humanos. Assim, como é avaliada a nocicepção em animais, a diminuição do limiar nociceptivo é denominada hipernocicepção.

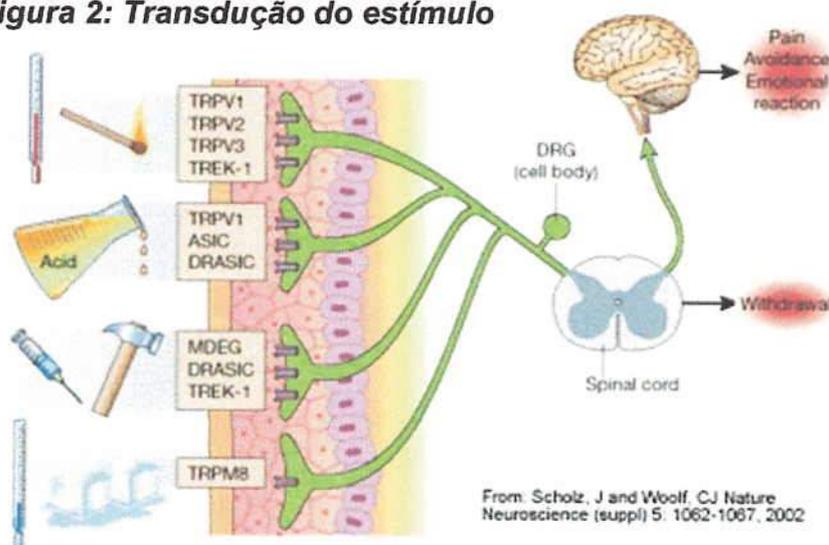
Durante o processo da transmissão do estímulo doloroso periférico, pode ocorrer a liberação de mediadores inflamatórios tanto no sistema nervoso periférico quanto central. Esse processo é denominado neuroinflamação e pode resultar em sensibilização do sistema nervoso. Tal fenômeno está associado à mudanças vasculares que podem ter como consequência o aumento de infiltração de leucócitos. Dessa maneira, as células do sistema imune liberam então substâncias como: prótons extracelulares; citocinas e quimiocinas; bradicinina; prostaglandinas; endotelinas; aminas simpáticas; substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); ATP; óxido nítrico entre outros, que estimulam ao extravasamento de fluido e células do sangue. Podendo dessa maneira, interferir

com a atividade dos neurônios nociceptivos aferentes primários ou na modulação da dor no corno dorsal da medula espinal^{10,16,21-25}

Como observado até o momento a informação nociceptiva é detectada na periferia através da captação dos estímulos pelas fibras nervosas aferentes em forma de potenciais de ação elétricos. Estes são transmitidos bioquimicamente até os centros supraespinais. Para a geração desses potenciais de ação e a propagação do estímulo que resulta na sensação dolorosa, existem diversos receptores que desempenham um papel crucial nesse processo e medeiam as influências na transmissão nociceptiva. Os principais receptores são os canais iônicos, que regulam a excitabilidade neuronal numa escala de micro-segundos e em seguida os receptores acoplados a proteína G que são ativados por diversos neurotransmissores e neuromoduladores¹⁵.

Nos últimos anos, estudos tem revelado canais iônicos como os TRPs; canais para ATP; canais iônicos sensíveis à ácido; canais Piezo (os que com a sua abertura promovem o influxo de cálcio, despolarizando os neurônios sensoriais), como receptores nociceptivos^{26,27}. Dentre esses canais, certos TRPs como o TRPV1-4, TRPA1 e o TRPM8 tem atraído considerável atenção por sua alta expressão em nociceptores, onde podem atuar como detectores e transdutores de estímulos térmicos, químicos e mecânicos. A ativação ou sensibilização desses canais está intrinsicamente envolvida com a condição de dor patológica²⁸ (Figura 2).

Figura 2: Transdução do estímulo



Transdução do estímulo nocivo em impulso elétrico para os terminais periféricos das fibras nociceptivas não mielinizadas C e mielinizadas A δ , sensíveis ao calor, estímulo mecânico, químico e frio. Essa atividade é conduzida à medula espinhal e após a transmissão do impulso para o córtex cerebral a sensação de dor é experienciada.

Fonte: @copyright Scholz, J e Woolf, C.J., 2002.

1.3 Mitocôndria e estresse celular

Sabe-se que mecanismos bioquímicos na via nociceptiva possuem conexão intrínseca com a mitocôndria devido ao seu envolvimento na produção de ATP, e, conseqüente influência na liberação de neurotransmissores, implicando seu importante papel na modulação da transmissão do sinal nociceptivo. Logo, tal organela é crucial na sobrevivência celular, não apenas por viabilizar a síntese de ATP, mas também por controlar o metabolismo energético, sintetizar aminoácidos não essenciais, bases precursoras do DNA, hormônios e moléculas da sinalização intracelular. Na última década, diversas evidências têm mostrado que a disfunção mitocondrial está relacionada com doenças degenerativas, como Alzheimer e Parkinson^{5,29} e também com fenômenos nociceptivos^{5,30,31}.

A mitocôndria é a principal fonte de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, oriundos principalmente dos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons. Em condições de homeostase, estas espécies de oxigênio são reduzidas por enzimas como a superóxido desmutase, catalase, glutationaperoxidase ou por “scavengers” como a vitamina E ou ubiquinol. Contudo, em processos de envelhecimento, hipóxia ou na presença de agentes exógenos, como mediadores inflamatórios, pode ocorrer uma alteração no controle redox, resultando em aumento excessivo nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em geral, o aumento exacerbado da produção de EROs pela mitocôndria, resulta em redução da viabilidade celular. Esse fenômeno está diretamente associado à oxidação de DNA, lipídeos, açúcares e proteínas mitocondriais, resultando em uma série de anormalidades na mitocôndria, com drástica redução do potencial da membrana interna mitocondrial, diminuição na síntese de ATP, aumento da captação de cálcio pela mitocôndria, prejuízo no controle de qualidade de proteína mitocondrial e ativação de vias pró-apoptóticas, por extravasamento de citocromo C para o citosol³².

As EROs são moléculas muito reativas, porém instáveis e, portanto, agem em locais próximos aos locais onde foram produzidas e por um curto período de tempo. Entretanto, a oxidação de lipídios insaturados, presentes na membrana da mitocôndria, pelas EROs, pode formar moléculas extremamente estáveis e reativas, que são capazes de atuar em diferentes regiões na célula e reagir com diferentes

proteínas e DNA. Dentre os oxidantes produzidos, encontram-se os peróxidos lipídicos que podem ser metabolizados pela glutatinoxidase. Contudo, na presença de um doador de elétron, este peróxido sofre uma reação não-enzimática e se divide para produzir, por exemplo, um aldeído tóxico, o 4-hidróxi - 2 - nonenal (4-HNE).

1.4 Peroxidação lipídica e a formação de aldeídos reativos (4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA))

Os constituintes estruturais dos lipídeos, como triacilgliceróis, fosfolipídeos, esfingomielinas e esteróides, são geralmente encontrados e estocados no tecido adiposo do organismo de mamíferos^{33,34}. Os lipídeos que compõem as membranas celulares (fosfolipídeos) possuem peculiar importância, pois controlam o estado fisiológico das membranas de organelas através da modificação dos seus aspectos biofísicos, como a polaridade e permeabilidade. Além disso, podem também apresentar um papel importante como sinalizadores celulares. As principais enzimas que geram mediadores de sinalização lipídica são lipoxigenases, que medeiam ácidos hidroperóxi-araquidônicos (HPETE), lipoxinas, leucotrienos, ou biossíntese de hepoxilinas após a oxidação de ácido araquidônico (AA); ciclooxigenase que produz prostaglandinas e citocromo P-450 (CYP-450), que gera ácidos epóxi-araquidônicos, leucotoxinas, tromboxano, ou prostaciclina^{35,36}. A sinalização lipídica pode ocorrer via ativação de uma variedade de receptores, incluindo receptores acoplados a proteína G e nucleares³⁷.

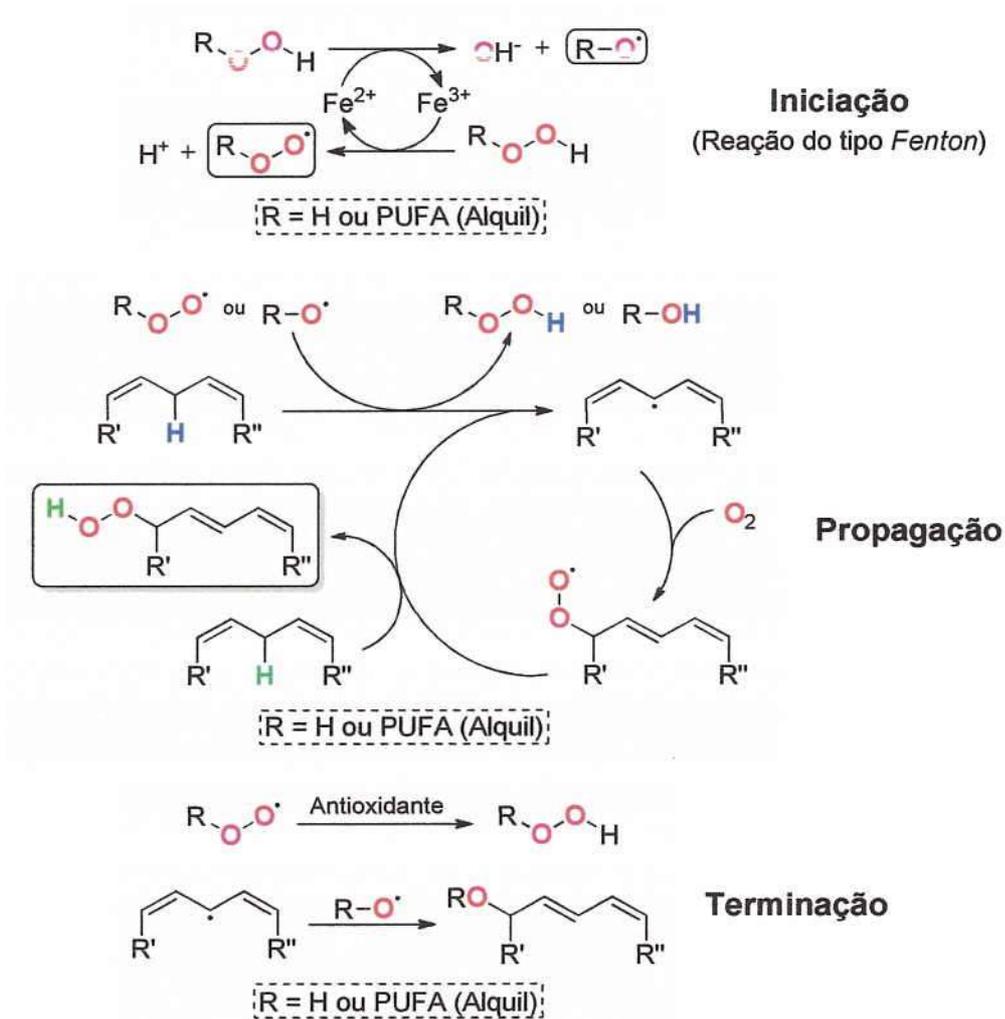
De modo geral, a peroxidação lipídica pode ser descrita como um processo oxidativo, mediado por espécies radicalares, sobre componentes estruturais lipídicos insaturados, especialmente em ácidos graxos polinsaturados (PUFAs). Glicolipídios, fosfolipídios e colesterol também são moléculas-alvo no processo de modificação peroxidativa. Tal processo envolve a abstração de um próton ligado ao carbono da insaturação, seguido da inserção de espécies oxigenadas, resultando na modificação e formação de radicais peróxi e hidroperóxi na estrutura do lipídeo³⁸. Os lipídios também podem ser oxidados por enzimas como lipoxigenases, ciclooxigenases e CYP-450.

Sob condições fisiológicas ou níveis baixos de peroxidação lipídica (condições subtóxicas), ocorre a ativação de sistemas, ou vias de sinalização, que regulam

proteínas antioxidantes constitutivas. A ativação dessas enzimas contribui para a manutenção e sobrevivência celular, tornando-se uma resposta adaptativa ao estresse. Em contraste, sob médias ou altas taxas de peroxidação lipídica (condições tóxicas) a extensão do dano oxidativo sobrecarrega a capacidade de reparo, e as células induzem apoptose ou morte celular programada; ambos os processos podem levar a danos celulares e moleculares, contribuindo para o desenvolvimento de estados patológicos e envelhecimento acelerado³⁹⁻⁴².

O processo global de peroxidação lipídica consiste em três etapas: iniciação, propagação e terminação^{38,43,44}. Na etapa de iniciação da peroxidação lipídica, as espécies radicalares (espécies reativas de oxigênio) são formadas como produto da reação do tipo *Fenton*. Tal reação consiste na homólise da ligação peróxi promovida pela oxidação (transferência de um único elétron) do Ferro (II) ao Ferro (III). Na propagação, os pró-oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxila, atacam o hidrogênio alílico formando o radical lipídico com o carbono central ($L \cdot$). O radical lipídico ($L \cdot$), por sua vez, reage rapidamente com o oxigênio para formar um radical peróxi lipídico ($LOO \cdot$) que abstrai um hidrogênio de outra molécula lipídica gerando um novo L (que perpetua a reação em cadeia) e hidroperóxi-lipídico ($LOOH$). Na reação de terminação, antioxidantes, como a vitamina E, doam um hidrogênio radicalar para as espécies $LOO \cdot$, levando à um correspondente radical da vitamina E que reage com outro $LOO \cdot$, formando produtos não radicalares (Figura 3).

Figura 3: Etapas da peroxidação lipídica não enzimática.



Na etapa de iniciação, os primeiros radicais são gerados por ferro ativo. Na etapa de propagação, os radicais são capazes de reagir com novos substratos, criando novos radicais. O passo de propagação se repete até a etapa de terminação, onde os radicais são eliminados por antioxidantes ou reagindo com outro radical.

Fonte: M.M. Gaschler, B.R. Stockwell, 2017, adaptado.

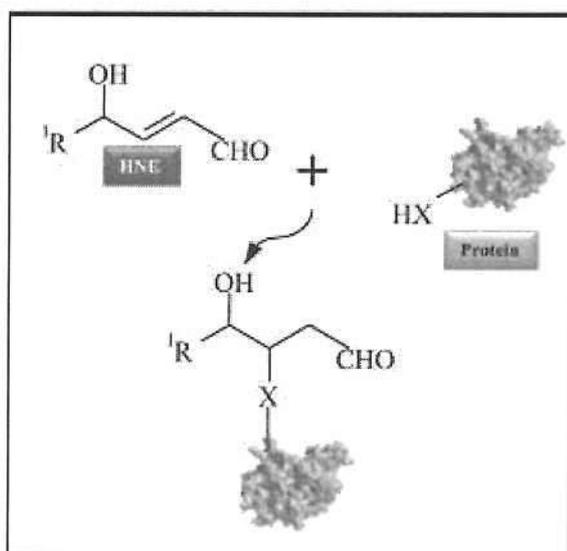
Sendo assim, a peroxidação lipídica ou reação de oxigênio com lipídeos insaturados produz uma ampla variedade de produtos de oxidação. Os principais produtos primários da peroxidação lipídica são estruturas hidroperóxi-lipídicas (LOOH). Concomitantemente, pode haver a formação de co-produtos da oxidação posterior aos LOOHs, levando à formação de aldeídos. A literatura descreve extensivamente diversos aldeídos formados ao final da peroxidação lipídica, assim como a sua influência em processos metabólicos. Dentre os mais estudados, podemos citar o malondialdeído (MDA), propanal, hexanal e o já citado 4-HNE. O

MDA possui o maior caráter mutagênico, ao passo que o 4-HNE apresenta o maior caráter citotóxico³⁷.

O MDA é um produto gerado em processos enzimáticos *in vivo* durante a biossíntese do tromboxano A₂ (TX₂). O TX₂ é um metabólito biologicamente ativo derivado do ácido araquidônico (AA), formado pela ação do tromboxano A₂ sintase, após a atividade das ciclooxygenases (COX) nos endoperóxidos (PGH₂ e PGG₂) no ciclo do AA. Uma vez que o MDA é formado, este pode ser metabolizado por enzimas ou pode reagir com proteínas dos tecidos ou DNA e formar adutos de alta afinidade resultando em danos biomoleculares³⁷.

Paralelamente, o 4-HNE é um aldeído α,β -insaturado altamente reativo formado a partir da quebra de ácidos graxos poliinsaturados em ésteres de colesterol, fosfolipídeos e triglicerídeos. Como descrito anteriormente, é um co-produto da peroxidação lipídica e a via para sua produção e biotransformação é bem estabelecida. O 4-HNE exibe uma variedade de atividades biológicas incluindo a inibição da síntese proteica, de ácidos nucleicos e a inativação de enzimas. Por esse aldeído possuir um carbono eletrofílico, como dito anteriormente, localizado na posição 3 da molécula. Este carbono pode formar uma ligação com resíduos de aminoácidos tais como cisteína, histidina ou lisina da proteína alvo (adição conjugada/Michael). Estudos têm demonstrado que cerca de 1 a 8% do 4-HNE formado na célula modifica proteínas, resultando em perda de função destas⁴⁵. Ademais, a presença desses adutos proteicos contribui no processo de biomarcação em caso de ocorrência e extensão de estresse oxidativo.

Figura 4: Aduto de Michael



Formação de aduto de Michael entre uma proteína e uma molécula de HNE, resultando numa proteína modificada

Fonte: @copyright Castro J., 2017.⁴⁶

É interessante mencionar que, quando produzidos em níveis basais (i.e. < 1 μM), os aldeídos como o 4-HNE e MDA, atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares. Entretanto, sob condições de estresse oxidativo, ocorre produção exacerbada destes aldeídos, saturando as vias de seu metabolismo, o que favorece modificações de moléculas biológicas e o início de processos patológicos. A importância clínica destes aldeídos decorre de sua habilidade em se difundir à locais mais distantes de onde é produzido. Assim, pode ocorrer a formação de adutos com diversas proteínas, modificando-as irreversivelmente. Estudos têm demonstrado que o 4-HNE pode se ligar a albumina plasmática, enzimas do metabolismo, proteínas de membrana e citosólicas, cadeia transportadora de elétrons, entre outros⁴⁷. Este aldeído tem sido extensivamente relacionado à etiologia de diversas doenças, como doenças cardiovasculares e hepáticas, e mais recentemente, a fenômenos nociceptivos⁴⁸⁻⁵⁰. Trevisani e colaboradores (2007) mostraram pela primeira vez que o 4-HNE é capaz de formar ligações covalentes irreversíveis com receptores TRPA1 (do inglês *transient receptor potential A1*).

Os receptores TRPA1 são canais permeáveis à cálcio e podem ser ativados tanto por fosforilação quanto por modificações covalentes. A ativação destes receptores favorece o influxo de cálcio, podendo induzir dor e inflamação neurogênica por meio da liberação de CGRP (do inglês *calcitonin gene related peptide*) e SP (substância P). Estudos têm mostrado que os receptores TRPA1 são ativados por isotiocianato, tiosulfonato e cinamaldeídos, compostos que constituem os ingredientes picantes de alimentos como mostarda, alho e canela, respectivamente. Interessantemente, a injeção de 4-HNE em animais, ou a liberação endógena deste eletrófilo, acarretada por lesão tecidual, induz nocicepção em decorrência da ativação de receptores TRPA1 e consequente liberação de neuropeptídeos⁴⁸.

1.5 Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) mitocondrial: modulação alostérica mediada por Alda-1

As aldeído desidrogenases (ALDHs) são um grupo de enzimas que catalizam a oxidação de aldeídos a seus ácidos carboxílicos correspondentes, não tóxicos, em uma reação irreversível dependente de NAD(P)⁺. Já foram descritas dezessete isoformas da ALDHs, que estão expressas em diversos tecidos. A ALDH2 é uma

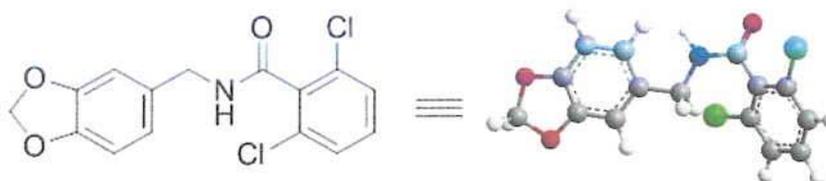
enzima homo-tetramérica localizada na matriz mitocondrial e é responsável pela oxidação do acetaldeído produzido a partir da metabolização do etanol, pela enzima álcool desidrogenase. Esta enzima também metaboliza aldeídos alifáticos de cadeia curta e cadeia longa, sendo responsável pela conversão oxidativa do 4-HNE a aldeídos menos tóxicos.

A localização mitocondrial desta enzima é de particular importância na remoção de 4-HNE, uma vez que a membrana desta organela é rica em ácidos graxos insaturados, sendo, portanto, importante alvo para o ataque de oxidantes produzidos pela cadeia transportadora de elétrons.

Interessantemente, Chen e colaboradores (2008) mostraram que a ativação ALDH2 (maior fosforilação) está relacionada com o efeito cardioprotetor do etanol, como redução da área de infarto, por exemplo. Assim, a maior ativação da ALDH2 pelo acetaldeído diminui a formação de adutos de 4-HNE em tecido cardíaco após isquemia. Este efeito benéfico decorre, pelo menos em parte, da remoção de 4-HNE por esta enzima uma vez que este aldeído tóxico regula negativamente a ALDH2, ou seja, quanto maior os níveis deste aldeído, menor é atividade desta enzima, o que contribui para a elevação dos níveis deste agente tóxico⁵¹.

Baseado nestes achados, Mochly-Rosen e colaboradores pesquisaram por meio de *high-throughput-screen* (HTS), um ensaio automatizado que foi utilizado para o teste, por fluorescência, de 60.000 moléculas candidatas a inibir a ALDH2, na tentativa de descobrir uma droga capaz de aumentar a atividade da ALDH2 identificaram uma pequena molécula *N*-(1,3-benzodioxol-5-dimetil)-2,6-diclorobenzamida, denominada **Alda-1**.

Figura 5: Estrutura química da Alda-1



Alda-1 aumenta a atividade de ALDH2 em até duas vezes, em comparação com sua atividade basal, e não apresenta atividade sobre a aldeído desidrogenase-1 (citossólica) ou sobre a aldeído desidrogenase-5 (mitocondrial). Ainda, a Alda-1 aumenta em até 11 vezes a atividade da ALDH2*2 uma mutante da ALDH2, muito

comum entre a população asiática. Esta mutação confere perda de até 95% na atividade da ALDH2⁵².

Estudos recentes com humanos demonstram que a população asiática apresenta hiperalgesia mais intensa na presença de capsaicina ou ácido láctico, quando comparado a caucasianos ou americanos⁵³⁻⁵⁵. Contudo, não existem estudos mostrando se esta resposta é decorrente de diferenças sociais, culturais ou genéticas. Assim, a importância desta enzima, em processos nociceptivos, deve ser considerada. Adicionalmente, o acetaldeído, substrato da ALDH2, induz nocicepção por atuar em receptores TRPA1. Apesar destes dados, é importante ressaltar que nosso grupo é pioneiro nos estudos relacionando a enzima ALDH2 e dor.

Estudos avaliando o benefício da Alda-1 em tecidos cardíacos mostraram que a ativação da ALDH2 é suficiente para induzir cardioproteção em roedores e este efeito é decorrente, pelo menos em parte, da diminuição na formação dos adutos de 4-HNE. Desta forma, a Alda-1 é uma promissora molécula na terapia de doenças cardiovasculares⁵⁶.

Assim, motivados pelos efeitos da Alda-1 sobre a atividade da ALDH2 e remoção de 4-HNE, nosso grupo iniciou um estudo avaliando o efeito da Alda-1 sobre a hiperalgesia inflamatória. Foi observado que a administração intraplantar de carragenina promove aumento nos níveis de 4-HNE e aldeídos, como o malondialdeído e acetaldeído, no tecido plantar de ratos, contribuindo para a nocicepção. A ativação da ALDH2 pela Alda-1 promove reversão deste processo hiperalgésico, com diminuição nos níveis de aldeídos no tecido plantar. Adicionalmente, o efeito antinociceptivo da Alda-1 não é antagonizado por naloxona, sugerindo que esta molécula não pertence à classe dos opióides.

De fato, níveis elevados de 4-HNE são detectados em doenças inflamatórias e estão envolvidos na nocicepção. Interessantemente, camundongos transgênicos portadores do alelo asiático ALDH2*2 que carregam a mutação E487K na enzima ALDH2, apresentam maior hiperalgesia inflamatória, quando comparados aos animais selvagens, sugerindo que esta enzima apresenta um importante papel em processos nociceptivos⁵⁷. Apesar destes dados, a importância desta enzima mitocondrial para processos de nocicepção crônica não é conhecida.

Demonstramos anteriormente que a administração de Alda-1 é capaz de reverter a hiperalgesia crônica induzida pela constrição do nervo isquiático de camundongos C57/BL (CCI). Contudo, este efeito apresenta curta duração (2 horas). Portanto, o intuito deste trabalho foi testar o efeito antinociceptivo da Alda-1

administrada continuamente aos animais e avaliar o envolvimento da enzima ALDH2 no controle e modulação da nocicepção. Contudo, não sabemos se a deficiência enzimática na ALDH2 contribui para a antecipação da instalação da neuropatia. Estudos que investiguem o mecanismo de ação, bem como a busca de melhores intervenções farmacológicas, como dose e período de administração da Alda-1, se fazem necessários neste modelo.

2. JUSTIFICATIVA

A dor é um importante problema de saúde pública que afeta aproximadamente 1 em cada 5 indivíduos⁵⁸. Os fármacos opióides estão entre os mais prescritos para o tratamento da dor e também são responsáveis por grandes complicações acidentais como “overdoses” e morte, além de induzir dependência, tolerância e a outras complicações⁵⁹.

Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de fármacos não opióides que apresentem menores efeitos adversos.

Nosso grupo vem demonstrando que a deficiência enzimática da ALDH2 mitocondrial está associada à nocicepção. A Alda-1, uma molécula ativadora da ALDH2 é uma promissora molécula com atividade antinociceptiva em modelo agudo de hiperalgesia inflamatória e este efeito é decorrente da diminuição de aldeídos tóxicos no tecido lesado. Apesar destes dados, a participação da ALDH2 e aldeídos tóxicos em processos nociceptivos crônicos foi pouco investigada. Experimentos realizados anteriormente indicam que a Alda-1 apresenta efeito antinociceptivo em modelo de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático de camundongos. Estes dados revelam que a Alda-1 é uma promissora molécula com atividade antinociceptiva em modelo de hiperalgesia crônica. Entretanto, ainda são necessários estudos complementares e mais aprofundados para avaliar efetivamente o controle da ALDH2 através desta molécula.

3. OBJETIVOS

Os objetivos geral e específicos desse trabalho consistiram em:

3.1 Geral

O objetivo geral deste projeto de pesquisa foi investigar o papel da enzima aldeído desidrogenase-2 no controle da dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de camundongos, caracterizando o envolvimento de aldeídos tóxicos endógenos, como o 4-HNE, no desenvolvimento desse tipo de neuropatia.

3.2 Específicos

Os objetivos específicos foram investigar:

- (a) o possível envolvimento da ALDH2 endógena no controle da hiperalgesia neuropática induzida pela constrição do nervo isquiático, por meio de tratamentos farmacológicos como a Alda-1, ativadora da ALDH2 e Aldi, inibidora da ALDH2, utilizando mini-bomba osmótica para a liberação controlada dos fármacos;
- (b) se a CCI favorece a formação de adutos de 4-HNE ou interferem com níveis de peroxidação lipídica com proteínas da medula espinal, gânglio da raiz dorsal (DRG), nervo isquiático ou do sangue de camundongos selvagens e transgênicos portadores do alelo asiático ALDH2*2;
- (c) o perfil curso-temporal do desenvolvimento de hiperalgesia de animais ALDH2*2 submetidos à cirurgia da constrição do nervo isquiático e falso operados, tratados com Alda-1 administrada por meio de mini-bomba osmótica de liberação contínua.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a apropriada realização e desenvolvimento desse projeto foram necessários determinados materiais e utilização de metodologias adequadas. Tais processos estão descritos a seguir.

4.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos em camundongos C57BL, machos, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Camundongos transgênicos portadores do alelo asiático ALDH2*2 que carregam a mutação E487K na enzima ALDH2 (Certificado de Qualidade em Biossegurança 039/98). Estes animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro-escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Utilizamos um n de 6 animais por grupo experimental. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Instituto Butantan (Protocolo nº CEAUIB 7570250716) e realizados de acordo com o guia para uso de animais de experimentação em estudos da dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP)⁶⁰.

4.2 Indução da dor neuropática

Para a indução da dor neuropática, foi realizada cirurgia no nervo isquiático, de acordo com o método descrito por BENNETT & Xie (1988)⁶¹, modificado por diversos autores⁶²⁻⁶⁴. Os camundongos selvagens ou ALDH2*2 foram anestesiados com isoflurano. O nervo isquiático foi exposto na região mediana da coxa, afastando-se o músculo bíceps femoral. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, foram realizadas 2 ligaduras (catégute cromado 4-0) frouxas ao redor deste, distantes entre si em aproximadamente 1mm. A incisão foi suturada em camadas, utilizando fio de sutura de seda número 4-0. O grupo controle foi composto por animais falso-operados, submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem ligação ou compressão do nervo.

4.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa: determinação da hiperalgesia

Para a avaliação do limiar nociceptivo em camundongos selvagens e ALDH2*2, foram utilizados filamentos de von Frey, antes, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Neste teste, os camundongos foram colocados, individualmente em gaiolas, apoiadas sobre uma prateleira, para permitir acesso às regiões plantares das patas destes animais. Foi empregada uma série logarítmica de 9 filamentos de von Frey (Aesthesiometer Semmer-Weinstein monofilamentos, Stoelting Co., E.U.A). A calibração dos filamentos é definida como $\log_{10}(\text{mg} \times 10)$, tendo os seguintes valores (o valor em gramas está entre parênteses): 2,44 (0,04), 2,83 (0,07), 3,22 (0,16), 3,61 (0,4), 3,84 (0,6), 4,08 (1,0), 4,31(2,0), 4,56 (4,0), 4,75 (6,0). Os filamentos foram aplicados de acordo com o método "up and down" descrito por Chaplan (1994), um a um, perpendicularmente, sob a área plantar da pata posterior e mantidos por um período de 3-5 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 0,6 g. Na ocorrência da retirada da pata à este filamento, foi utilizado o filamento imediatamente anterior (0,4 g). Na ausência de resposta com o filamento inicial de 0,6 g, o filamento posterior (1 g) foi aplicado, e assim sucessivamente. Os filamentos de von Frey foram aplicados por seis vezes e a retirada ou não retirada da pata foi registrada. A fórmula utilizada para avaliar o limiar 50% neste modelo (filamento de von Frey) é:

$$4.1.1.1.1 \text{ 50\% limiar} = (10^{[X_f+k.\delta]})/10000$$

Sendo que:

X_f = valor (em unidades logarítmicas) do último filamento utilizado na série de seis aplicações dos filamentos de von Frey

K = valor (tabela) para o padrão de respostas positiva/negativa

δ = média (em unidades logarítmicas) da diferença entre estímulos (filamentos)

Após a obtenção das medidas em gramas pela fórmula apresentada, realizamos uma normalização das mesmas pela medida inicial com o intuito de comparar os diferentes grupos. Sendo assim, estabeleceu-se a medida inicial como 100% e o dos seguintes pontos de avaliação nociceptiva foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$L(\%) = V \times 100 / V_0$$

Onde: L(%)=percentual do limiar de dor/hiperalgesia

V₀= valor do limiar de dor basal

V = valor do limiar de dor em gramas de acordo com o dia de avaliação⁶⁵.

4.4 Caracterização do efeito das moléculas Alda-1 e Aldi sobre a dor neuropática

Baseado nos dados anteriores mostrando que a Alda-1 é capaz de bloquear a hiperalgesia crônica induzida pela CCI (10 mg/Kg) por 2 horas e, em estudos de colaboradores mostrando que a dose de 16 mg/Kg/dia (mini-bomba osmótica) é efetiva em diminuir os sinais clínicos em animais com doença arterial periférica, iniciamos nossos estudos nesta última condição. Sendo assim, utilizamos uma mini bomba osmótica de liberação controlada (0,25ul/hora (ALZET 2004)), que é inserida subcutaneamente no dorso do animal na mesma cirurgia da CCI. A mesma dosagem e modo de administração foram utilizados para a Aldi, molécula que age inibindo a ALDH2⁶⁶.

4.5 Preparação das amostras de tecido

Os camundongos foram eutanisados por inalação de CO₂ e 7, 14, 21 e 28 dias após a CCI e a medula espinhal (L4-L6), os gânglios da raiz dorsal (DRG, L4-L6) e o nervo isquiático foram removidos, foi realizado um número experimental individual, ou seja, não foram realizados *pool* de amostras. A amostra foi homogeneizada por sonicação, em tampão contendo Hepes-NaOH (1 M, pH = 7,9), NaCl (1,54 M), EGTA (200 mM), Triton-X 100 (1 %), DTT (10mM) e inibidor de protease e fosfatase (1:300). As amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 20 min, a 4°C. A concentração de proteína foi determinada no sobrenadante pelo método de Bradford⁶⁷.

4.6 Caracterização da formação de adutos pelo 4-HNE na vigência de dor crônica causada pela CCI por Western Blot

Para a avaliação da formação de adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinhal e DRG realizamos Western Blot⁶⁸ de amostras de animais submetidos a tratamento cirúrgico ou controle, na presença ou ausência de Alda-1.

As amostras foram homogeneizadas conforme descrito no **item 4.5**. Alíquotas contendo de 15 a 30 µg de proteína total foram fervidas em tampão Laemmli e

posteriormente, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), em aparelho para minigel (Mini-Protean, Biorad, Brasil). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). A membrana foi bloqueada em TBST (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, e 0,1% Tween 20) contendo 5% de BSA por 4 horas, seguido pela incubação com anticorpo anti 4-HNE (1:1000, Calbiochem, Merck EUA) overnight, à 4°C.

Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBST e então incubada, por 2 horas, com anti-IgG coelho conjugado à peroxidase (1:2000, Amershan). A membrana foi incubada em solução ECL (Pierce) por 60s e as bandas visualizadas por meio de fotodocumentador digital (Uvitec Cambridge França). A densidade óptica das bandas foi determinada pelo programa Totallab (Nonlinear Dynamics Ltd, EUA) ou programa ImageJ. A quantidade de proteína de cada amostra foi normalizada pela incubação da membrana com anticorpo para GAPDH (1:10.000) (ABCAM, EUA) e também pela marcação do Ponceau.

4.7 Avaliação da concentração de adutos de 4-HNE no soro de animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático durante 28 dias.

O sangue foi obtido a partir do plexo orbital, utilizando-se uma pipeta Pauster de vidro sem anticoagulante. O sangue foi coletado antes, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Após a coleta, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 30-40 minutos e centrifugadas à 3000 rpm durante 15 minutos para a coleta do sobrenadante (soro), o pellet foi descartado. Os níveis de HNE foram detectados por meio de um kit da CellBioLabs (HNE AdductCompetitive ELISA- STA-838), seguindo o protocolo do mesmo⁶⁹. A análise foi realizada utilizando uma curva de polinômio 6, dados calculados pelo Excel.

4.8 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica na medula espinhal e nervo isquiático de animais submetidos à cci.

Como mencionado no item 1.4 da Introdução, o 4-HNE é um subproduto da peroxidação lipídica. Níveis aumentados de peroxidação lipídica são encontrados em pacientes portadores de inflamação e neuropatia, sendo considerados marcadores do estresse oxidativo. Assim, alteração nos níveis destes compostos

pode contribuir para a resposta inflamatória e, conseqüentemente, para a nocicepção⁴⁵.

O nível de peroxidação lipídica foi determinado pelo ensaio de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para tanto foi utilizado um kit comercial (Oxi-Tek TBARS Assay kit; Zeptometrix, Buffalo, NY, EUA). Em resumo, ao homogenato da medula ou nervo isquiático de animais submetidos a constrição do nervo isquiático ou falso operados e tratados com Alda-1 ou veículo (conforme descrito anteriormente), foi adicionado 100 µL de solução de dodecil sulfato de sódio. O tampão reagente de ácido tiobarbitúrico (TBA) foi preparado a partir da mistura de 0,5 g de TBA com 50 mL de ácido acético e 50 mL de NaOH. Este tampão foi então adicionado (2,5 mL) à 200 µL da amostra e então as amostras foram incubadas à 95°C por 60 minutos. Após este período, as amostras foram resfriadas em gelo por 10 minutos, e centrifugadas à 3000g, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e a intensidade da fluorescência foi determinada em espectrofotômetro (*Molecular Devices*, Spectramax M5e). A concentração de TBARS foi expressa em nmol/mg de proteína, por interpolação da curva de malondialdeído, nas concentrações de 0 a 200 nmol/L.

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) – que compara mais do que duas médias populacionais usando um fator - de uma via associada ao teste de Tukey⁷⁰ ou de duas vias, seguida por Bonferroni, utilizado para comparações múltiplas. O índice de significância foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos através do desenvolvimento desse estudo serão descritos nesse item, e posteriormente discutidos a seguir.

5.1 Avaliação do envolvimento da ALDH2 na sensibilidade nociceptiva de animais selvagens e transgênicos (ALDH2*2)

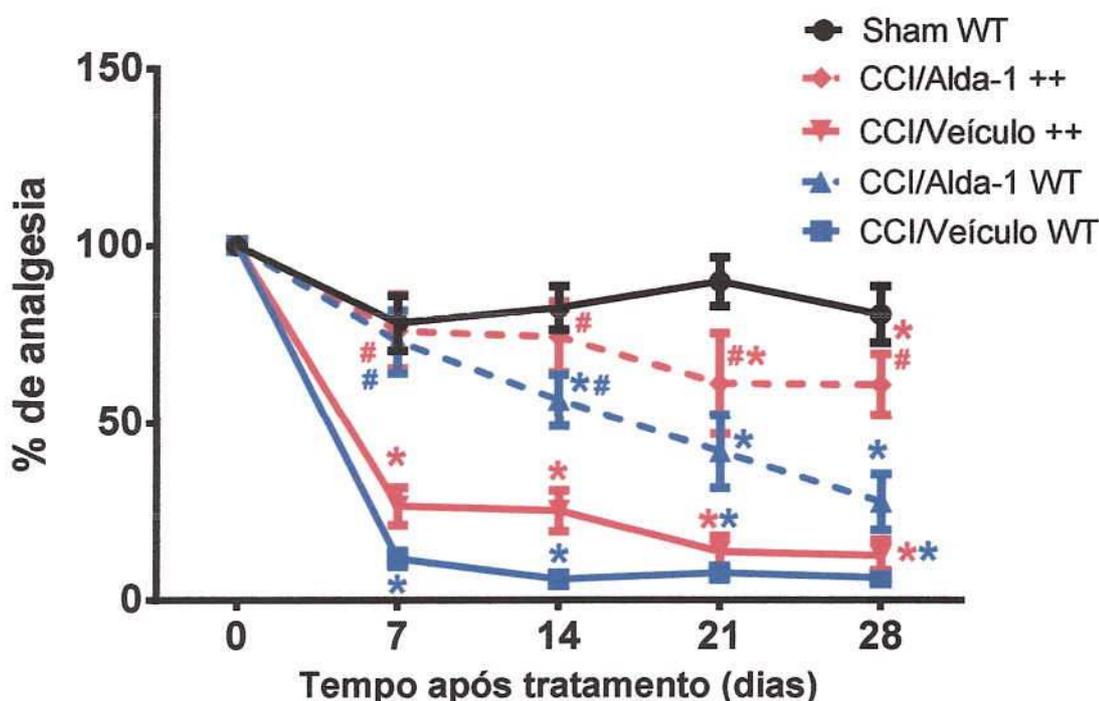
Com o intuito de caracterizar o envolvimento da enzima ALDH2 no desenvolvimento da dor neuropática induzida pela CCI, realizamos experimentos comportamentais em animais selvagens e transgênicos portadores do alelo asiático ALDH2*2. Para tanto, realizamos tratamento prolongado com a Alda-1, por meio da mini-bomba osmótica (*mini-pumps*) por 28 dias.

Como observado na Figura 6, a CCI promove diminuição no limiar nociceptivo tanto de animais selvagens (WT), quanto animais ALDH2*2 (++) em comparação com o limiar basal, quando avaliados 7 dias após a cirurgia (70 e 80%, respectivamente). Esse efeito permanece por todo o período de observação, ou seja, 28 dias. Não detectamos diferença entre o limiar nociceptivo de animais selvagens e ALDH2*2.

A administração de Alda-1 reverte totalmente a hiperalgesia induzida pela CCI em animais selvagens, quando avaliados no 7º dia após a cirurgia. O efeito analgésico da Alda-1 foi parcial no 14º dia após a CCI. Não detectamos efeito analgésico da molécula, 21 ou 28 dias após a cirurgia. Por outro lado, a Alda-1 reverte completamente a hiperalgesia em animais ALDH2*2, quando avaliados 7 e 14 dias após a CCI. Nesses animais, a Alda-1 reverte parcialmente a hiperalgesia quando avaliada no 21º e 28 dias após a cirurgia.

Os animais falso operados (*sham*) tanto selvagens quanto ALDH2*2 (dados não mostrados) não apresentaram alteração significativa do limiar nociceptivo durante todo o período de avaliação.

Figura 6: Avaliação do desenvolvimento da neuropatia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) durante 28 dias.



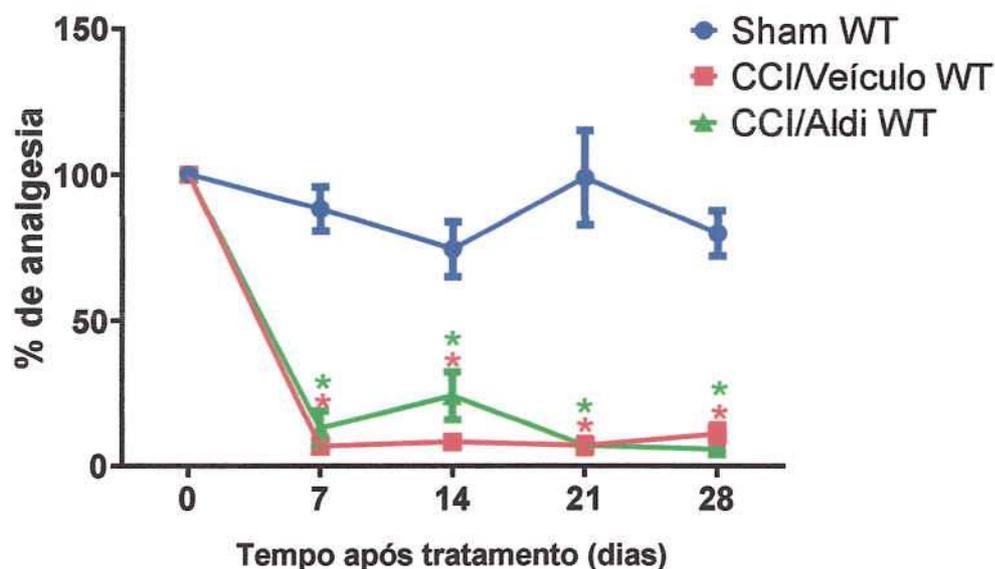
(A) Animais operados, selvagens e transgênicos submetidos ao teste dos filamentos de von Frey, utilizando-se a metodologia descrita por Chaplan 1994. O limiar nociceptivo está expresso em gramas (g). *Por comparação com medida inicial, # Por comparação com grupo CCI+veículo (correspondente à sua genotipagem), n= 10/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2018.

Uma vez que não detectamos diferença na intensidade nociceptiva entre animais selvagens e transgênicos, nosso próximo passo foi investigar se a inibição farmacológica da ALDH2 seria capaz de interferir com o limiar nociceptivo dos animais operados. Para tanto, os animais foram tratados com um inibidor dessa enzima, a Aldi.

Como observado na Figura 7 os animais operados e tratados com Aldi apresentaram hiperalgisia (80%) a partir do 7º dia após a cirurgia quando comparado com a medida basal. O mesmo comportamento foi observado nos animais tratados com veículo. Esse efeito persistiu durante os 28 dias de avaliação comportamental. Os animais falso operados não apresentaram alteração significativa no seu limiar nociceptivo por todo o período de observação.

Figura 7: Avaliação comportamental de animais tratados com inibidor farmacológico Aldi, durante 28 dias após a CCI.



(A) Animais operados, selvagens submetidos ao teste dos filamentos de von Frey, utilizando-se a metodologia descrita por Chaplan 1994. O limiar nociceptivo foi expresso em gramas (g). *Por comparação com medida basal (sham) $n = 6/\text{grupo}$, onde $p < 0,001$.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

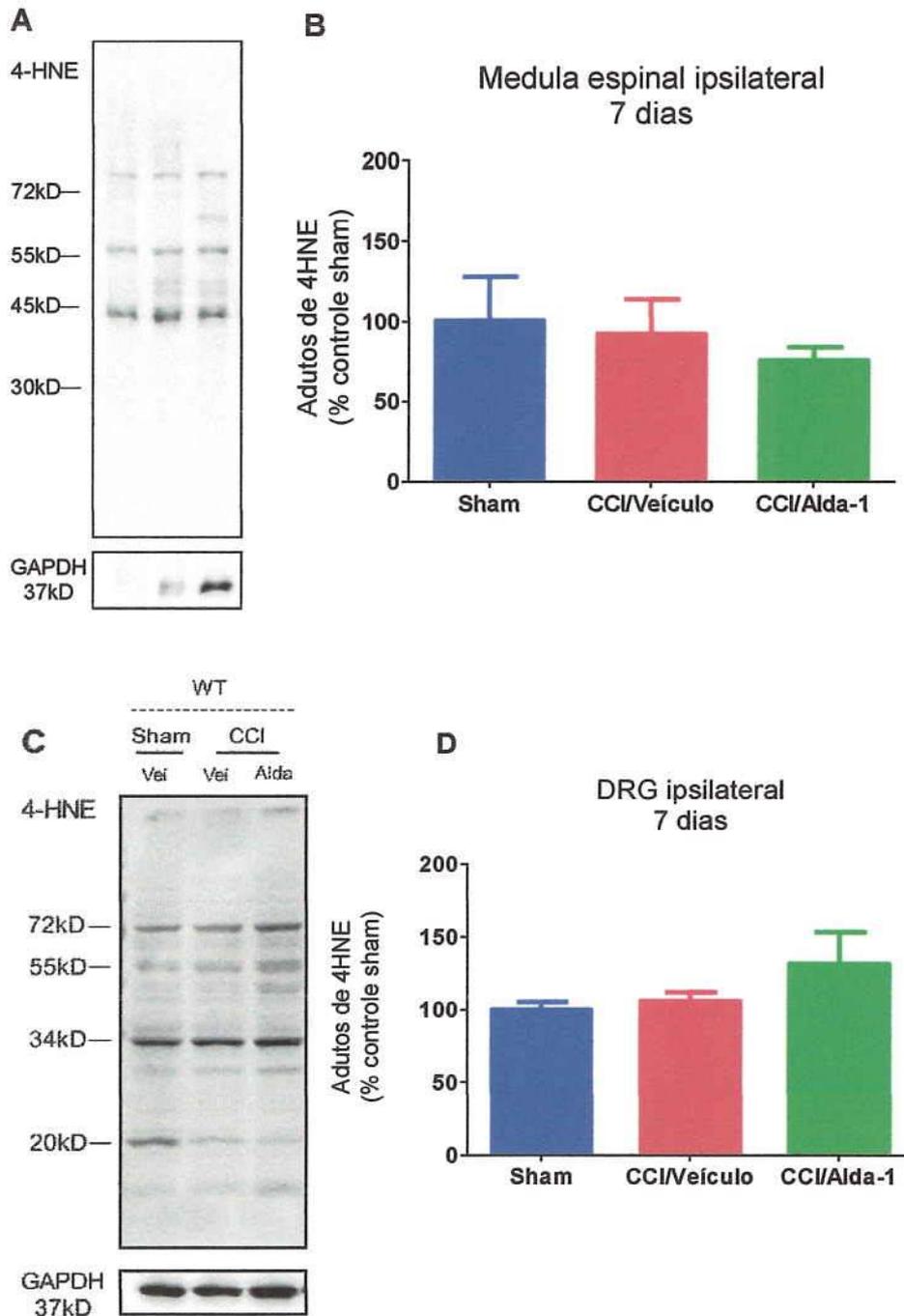
5.2 Avaliação do efeito da Alda-1 nos níveis de adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e gânglio da raiz dorsal (DRG), 7, 14 e 28 dias após a cirurgia.

Avaliamos os níveis de adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e gânglio da raiz dorsal em animais selvagens e transgênicos, tratados ou não com a Alda-1, no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a constrição crônica do nervo isquiático. Como apresentado na figura 8, a CCI não interfere com os níveis de 4-HNE na medula ou DRG ipsilateral à cirurgia, quando avaliados no 7º dia após a cirurgia. Os dados da região contralateral e também normalizados pelo Ponceau estão no anexo 1, 2 e 3.

Nas figuras 9 e 10, pode-se observar os níveis de adutos de HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral de animais selvagens e mutantes, 14 e 28 dias após a cirurgia. Não foram detectadas diferenças significantes entre os

grupos tanto no lado ipsilateral à CCI (Fig. 9 e 10), quanto contralateral (dados no item anexo 6, 7 e 8).

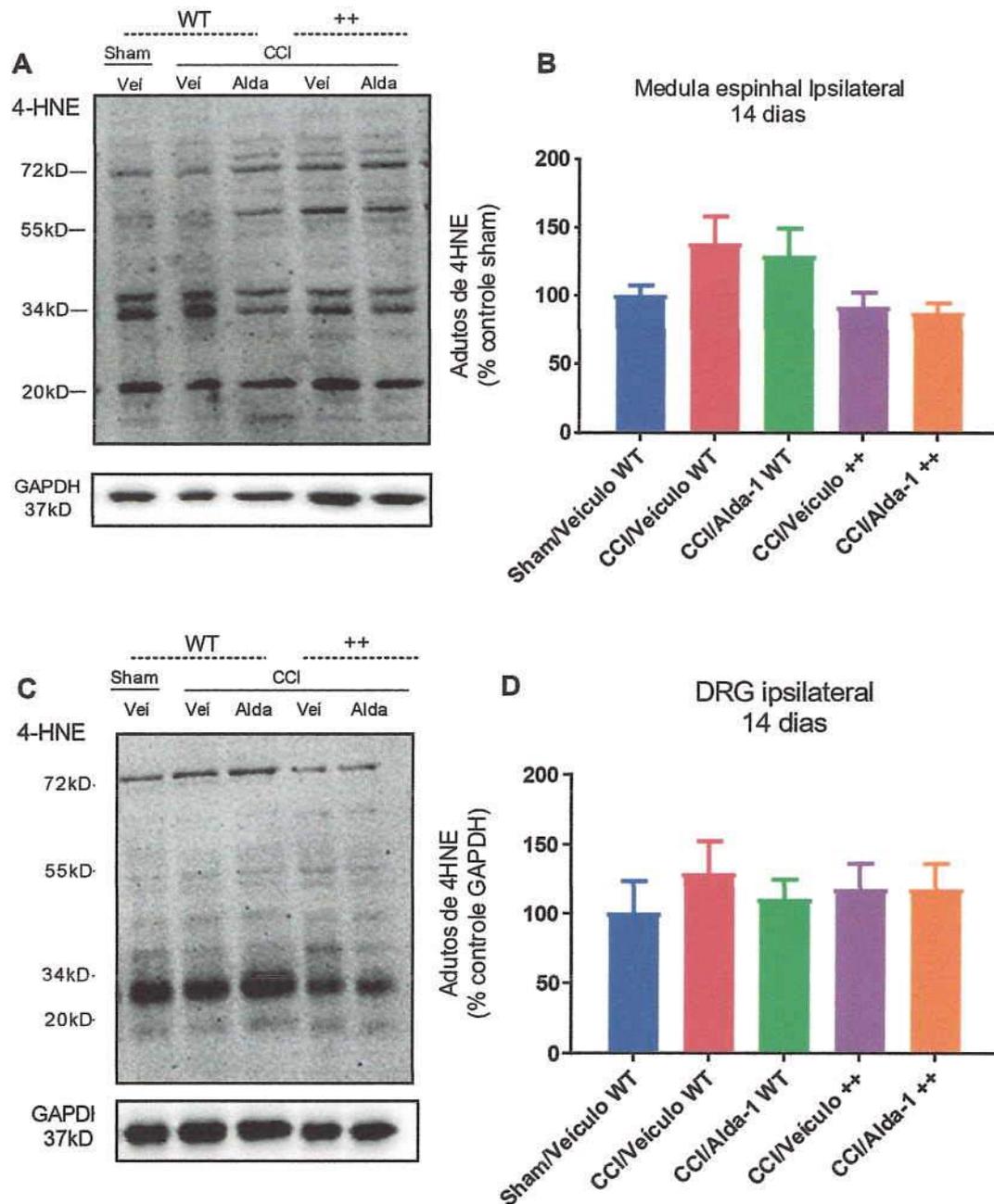
Figura 8: Efeito da Alda-1 sobre os adutos de 4- hidroxinonenal (4-HNE) na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal (DRG) ipsilateral à constrição crônica do nervo isquiático (CCI), 7 dias após a cirurgia.



(A e C) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI. (B e D) Quantificação da densidade óptica de todas as bandas. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de GAPDH e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observada diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

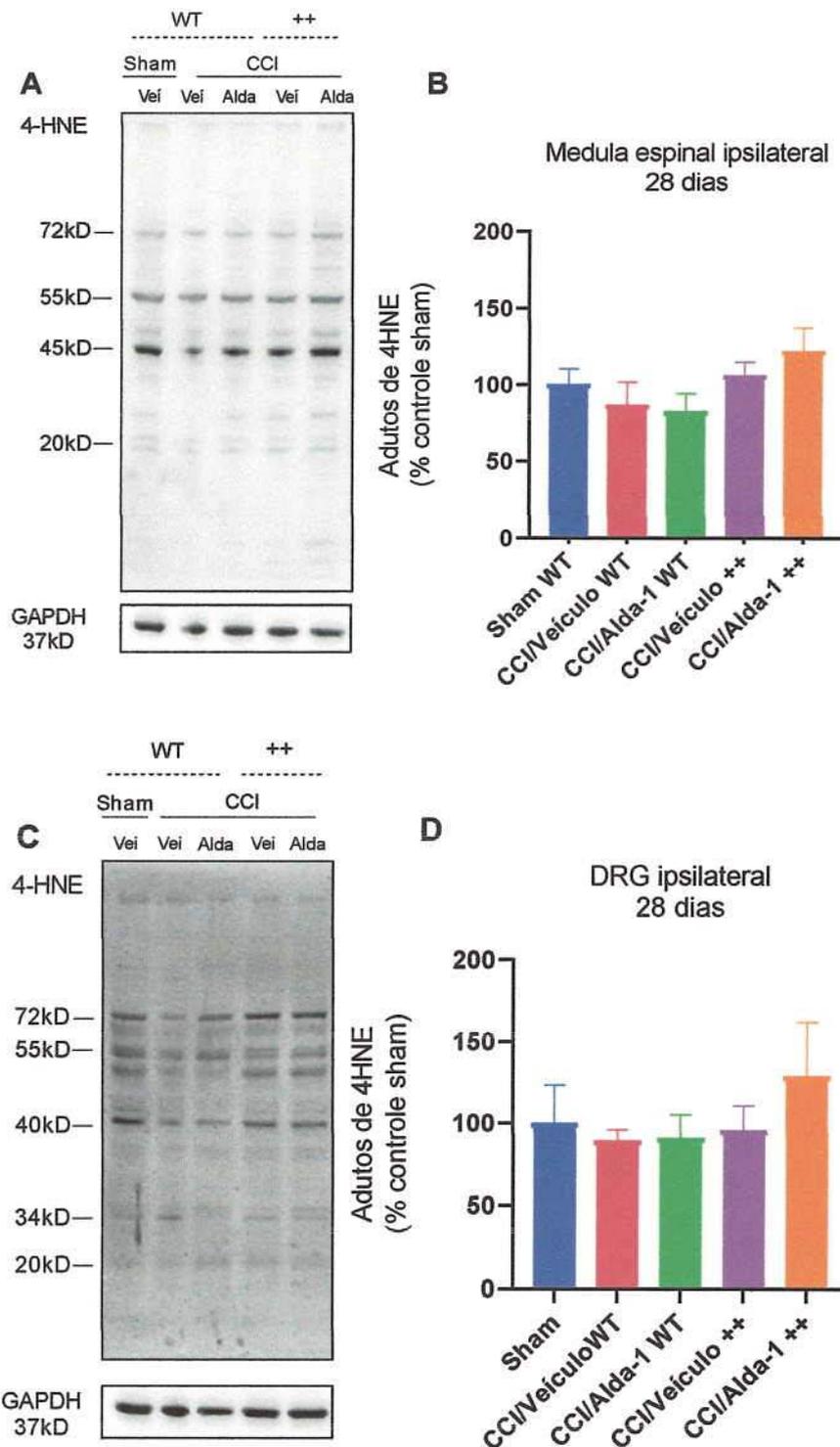
Figura 9: Efeito da Alda-1 sobre os adutos de 4- hidroxinonenal (4-HNE) na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal (DRG) ipsilateral à constrição crônica do nervo isquiático (CCI), 14 dias após a cirurgia.



(A e C) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI. (B e D) Quantificação da densidade óptica de todas as bandas. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de GAPDH e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observada diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2018.

Figura 10: Efeito da Alda-1 sobre os adutos de 4- hidroxinonenal (4-HNE) na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal (DRG) ipsilateral à constrição crônica do nervo isquiático (CCI), 28 dias após a cirurgia.



(A e C) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI. (B e D) Quantificação da densidade óptica de todas as bandas. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de GAPDH e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observada diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

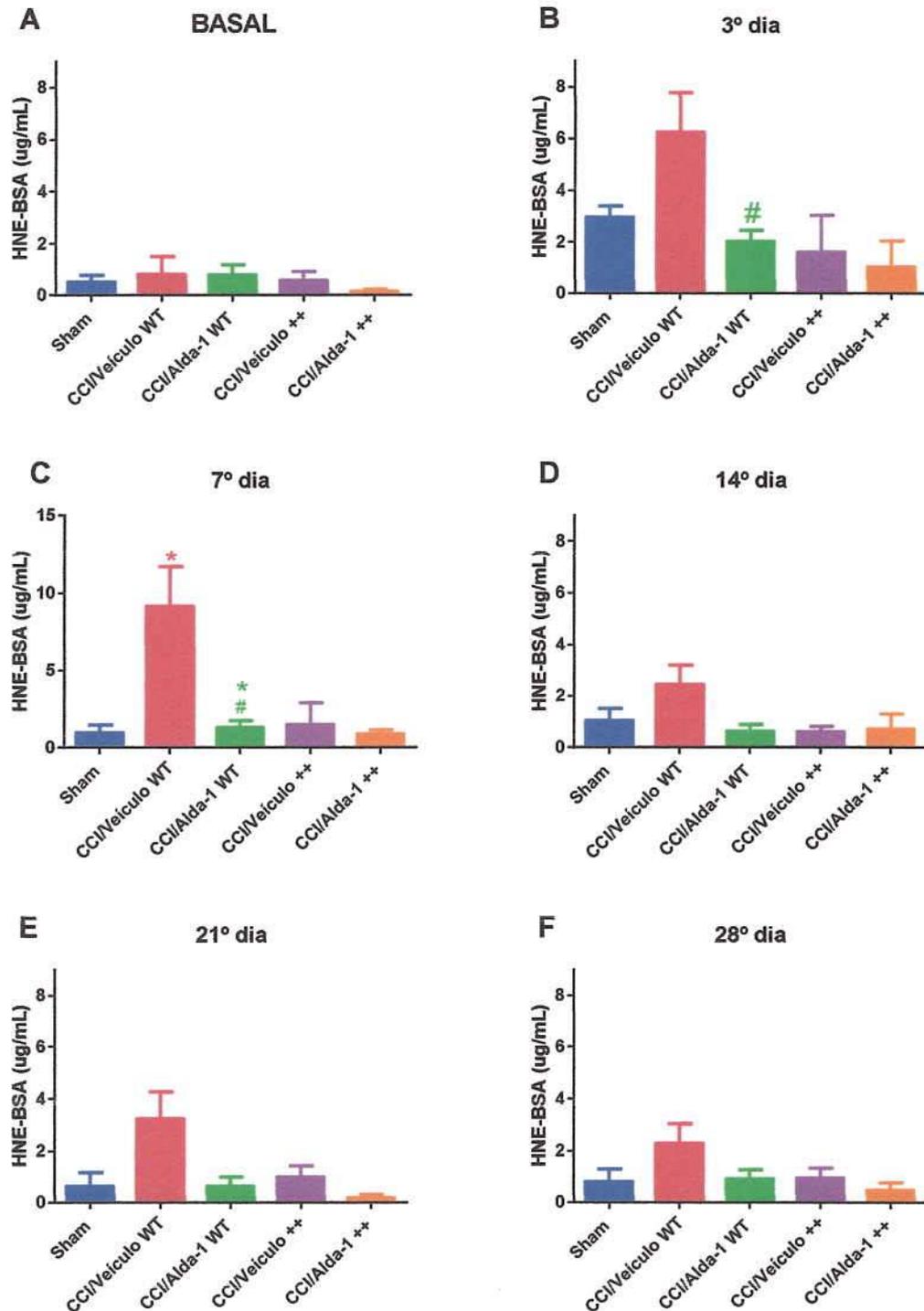
5.3 Avaliação do papel da ALDH2 nos níveis circulantes de 4-HNE de animais submetidos à CCI

Além dos níveis de 4-HNE nos tecidos envolvidos com as vias nociceptivas, avaliamos os níveis desse aldeído no sangue de animais submetidos à CCI e tratados com a Alda-1. Avaliado também os níveis circulantes desse aldeído em animais selvagens tratados com o inibidor da ALDH2, a Aldi. Para tanto, o sangue dos animais foi coletado imediatamente antes da avaliação nociceptiva. Interessantemente, no 7º dia após a cirurgia, os animais selvagens apresentam aumento nos níveis desse aldeído, e esse aumento é revertido pela Alda-1. Não foi observado diferenças significantes nos demais tempos analisados (Fig. 11).

Por outro lado, os animais transgênicos tratados com veículo não apresentaram um aumento nos níveis de 4-HNE no soro quando comparados aos animais falso operados. A Alda-1 não interfere com os níveis circulantes desse aldeído.

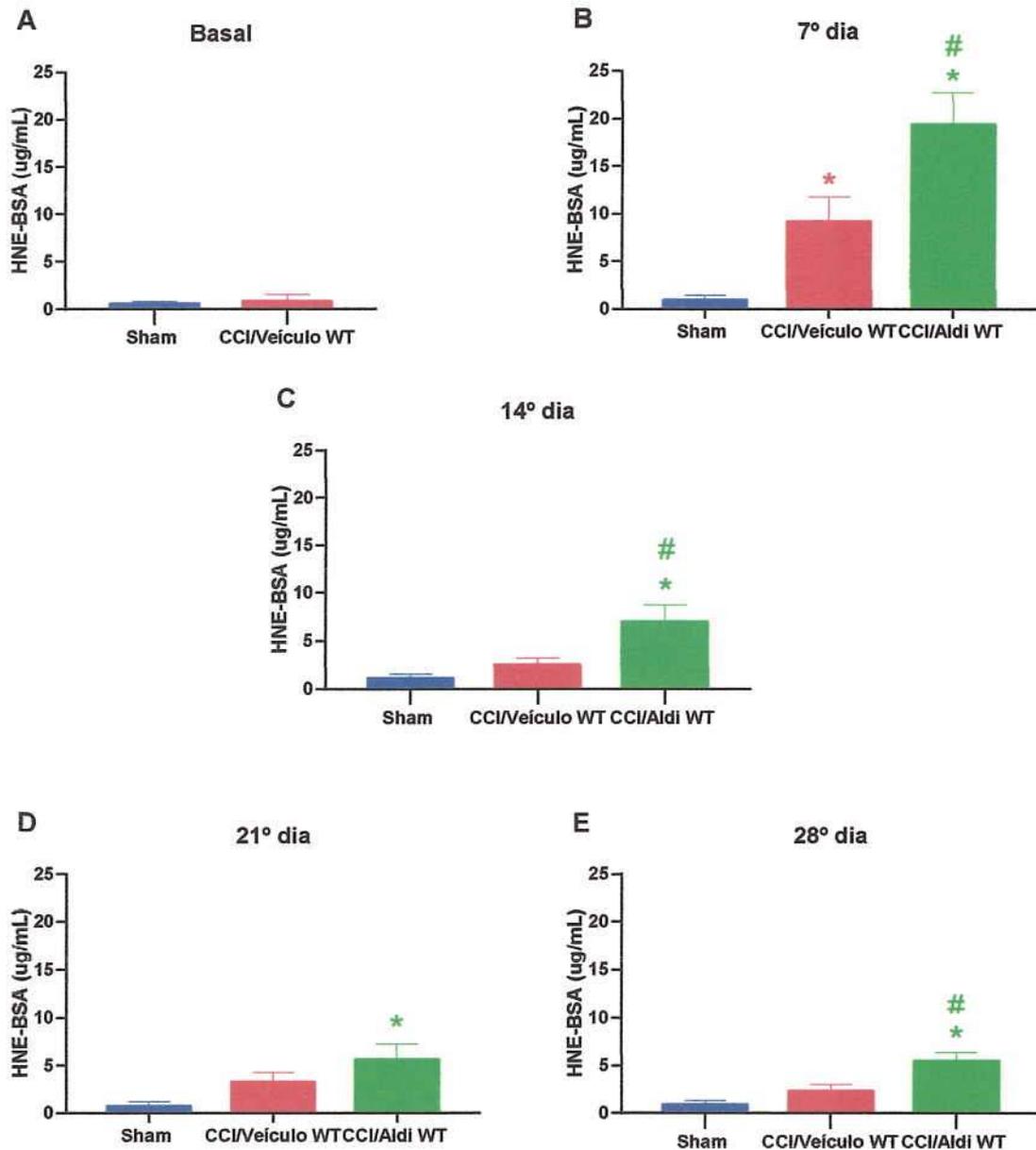
O próximo passo foi avaliar se a inibição farmacológica da ALDH2 interfere nos níveis circulantes de 4-HNE. Logo, foram coletados o soro dos animais tratados com essa molécula 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia (Fig. 12). Animais operados e tratados com Aldi apresentaram níveis aumentados de 4-HNE, quando comparados aos animais falso operados (7º dia: aumento de 20 vezes; 14º: aumento de 5 vezes; 21º: 8 vezes e 28º: aumento de 6 vezes).

Figura 11: Avaliação dos níveis circulantes de 4-HNE no soro de animais submetidos à constrictão crônica do nervo isquiático e tratados com Alda-1 durante 28 dias.



Animais submetidos à cirurgia da constrictão crônica do nervo isquiático tiveram seu sangue coletado sem a presença de anticoagulante (entre 200ul – 500ul) antes (A), 3 (B),(C) 7, (D) 14, (E) 21 e (F) 28 dias após a CCI. As amostras foram congeladas no freezer -80°C e retiradas apenas para a realização do kit de Elisa da CellBioLab, o procedimento foi feito de acordo com o protocolo padrão que acompanha o kit. **n experimental:** 6-12, onde # $p < 0,01$ por comparação com CCI Veículo WT; * $p < 0,01$ por comparação com sham. **Fonte:** Beatriz Stein, 2019.

Figura 12: Avaliação dos níveis circulantes de 4-HNE no soro de animais submetidos à constricção crônica do nervo isquiático e tratados com Aldi (inibidor ALDH2) durante 28 dias.



Animais submetidos à cirurgia da constricção crônica do nervo isquiático tiveram seu sangue coletado sem a presença de anticoagulante (entre 200ul – 500ul) (A) antes, (B) 7, (C) 14, (D) 21 e (E) 28 dias após a CCI. As amostras foram congeladas no freezer -80°C e retiradas apenas para a realização do kit de Elisa da CellBioLab, o procedimento foi feito de acordo com o protocolo padrão que acompanha o kit. *Por comparação com falso operado e # comparado com grupo operado e tratado com veículo, sendo que $p < 0,001$.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

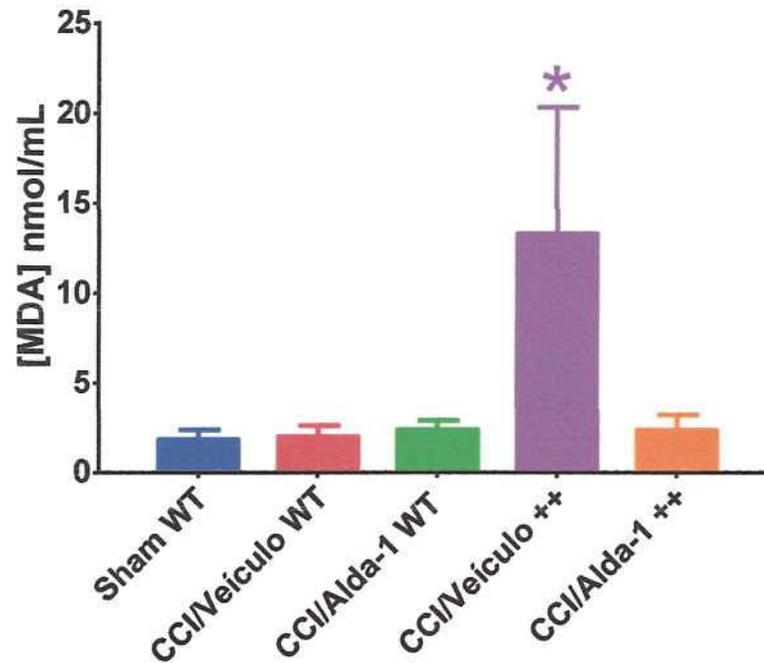
5.4 Avaliação dos níveis do aldeído MDA em proteínas do nervo isquiático e medula espinal de animais selvagens e transgênicos em animais submetidos à CCI: efeito da Alda-1 e Aldi

A próxima abordagem foi avaliar os níveis de outro aldeído, o malondialdeído ou MDA em proteínas de tecidos envolvidos com as vias nociceptivas. Os resultados apresentados na figura 13 mostram que não foram detectadas alterações significativas dos níveis de MDA na medula espinhal de animais selvagens, 14 dias após CCI. Porém, diferentemente dos selvagens, os animais ALDH2*2 apresentaram maiores níveis de MDA (aumentou em cinco vezes quando comparado ao grupo CCI veículo selvagem) após cirurgia.

O próximo passo foi avaliar os níveis periféricos desses aldeídos, nos períodos iniciais da neuropatia. Assim, quantificamos o MDA no nervo isquiático, 7 dias após a CCI. Como pode ser observado na figura 14, os animais operados apresentam aumento significativo nos níveis de MDA (147%), quando comparados aos animais falso operados. O tratamento prolongado com a Alda-1 foi capaz de reverter o acúmulo desse aldeído. Por outro lado, não detectamos alteração nos níveis de MDA no nervo isquiático de animais selvagens operados tratados com veículo ou Alda-1, 28 dias após a cirurgia.

O próximo passo foi avaliar os níveis de MDA no nervo isquiático de animais selvagens tratados com Aldi, 28 dias após a CCI. Na figura 16 é demonstrado que animais operados tratados com o inibidor apresentam aumento significativo dos níveis desse aldeído (90%) quando comparado com grupo veículo.

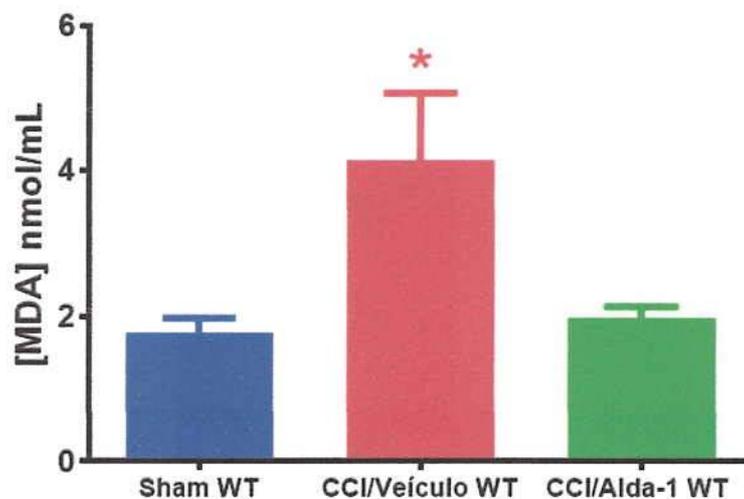
Figura 13: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) na medula espinhal ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 14 dias após à cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados (sham), tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. Quantificação da avaliação colorimétrica obtida por espectrofotômetro (comprimento de onda: 532nm). *Por comparação com grupo sham, onde $p < 0,0001$. $n = 4 - 9$ /grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2018.

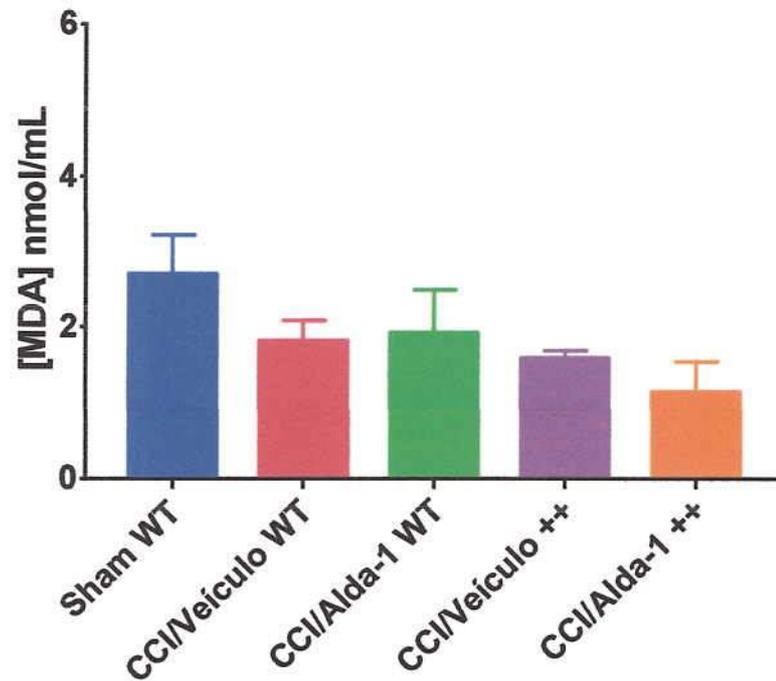
Figura 14: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) no nervo isquiático ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 7 dias após à cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados (sham), tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. Quantificação da avaliação colorimétrica obtida por espectrofotômetro (comprimento de onda: 532nm). *Por comparação com grupo operado tratado com veículo $p < 0,001$ $n = 4 - 6$ /grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2018.

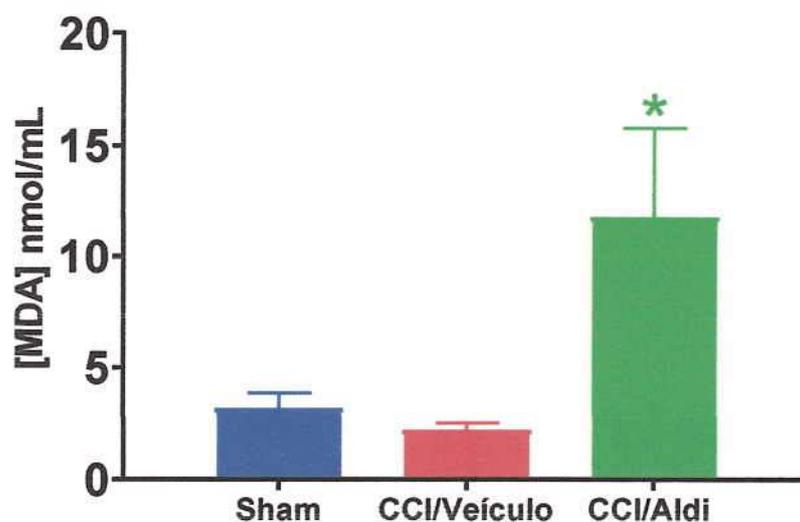
Figura 15: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) no nervo isquiático ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 28 dias após à cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados (sham), tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. Quantificação da avaliação colorimétrica obtida por espectrofotômetro (comprimento de onda: 532nm). Não foram detectadas alterações significativas. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

Figura 16: Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) no nervo isquiático ipsilateral de animais falso operados e operados (CCI), 28 dias após à cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados (sham), tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. Quantificação da avaliação colorimétrica obtida por espectrofotômetro (comprimento de onda: 532nm). *Por comparação com grupo veículo, onde $p < 0,05$ n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

6. DISCUSSÃO

Como descrito na Introdução, as neuropatias são altamente prevalentes na população mundial e podem ter diversas etiologias, como trauma, neurotoxicidade induzida por fármacos, diabetes e infecções virais. Um dos principais e mais debilitante sintoma das neuropatias é a dor crônica. O modelo da constrição crônica do nervo isquiático escolhido para este trabalho é um modelo amplamente utilizado em estudos pré-clínicos, uma vez que os animais respondem positivamente aos principais analgésicos utilizados clinicamente.

Em suma, os resultados obtidos nesse estudo indicam que a ativação persistente da ALDH2 pela Alda-1, apesar de não impedir a manifestação da dor neuropática, é capaz de retardar a sua instalação. O efeito analgésico desta molécula teve a duração de 14 dias em animais selvagens e foi mais duradouro em animais com deficiência na atividade da ALDH2, persistindo por 28 dias. O efeito analgésico da Alda-1 é acompanhado de redução nos níveis circulantes e periféricos de aldeídos, nos períodos iniciais da neuropatia.

Sabe-se que a ALDH2 está amplamente envolvida no metabolismo do acetaldeído originado a partir do consumo de álcool e também de subprodutos da degradação da dopamina e peroxidação lipídica. Nosso grupo demonstrou anteriormente que esta enzima tem um importante papel na dor aguda de origem inflamatória, uma vez que a inflamação induzida pela carragenina é acompanhada da diminuição na atividade enzimática da ALDH2 e do aumento nos níveis de aldeídos como 4-HNE, MDA e acetaldeído. Adicionalmente, a ativação da ALDH2 pela Alda-1, reduz os níveis desses aldeídos e, como consequência, a hiperalgesia inflamatória é bloqueada. Apesar dessas evidências mostrando a importância da ALDH2 na dor aguda, não sabíamos se essa enzima participava de processos crônicos. Assim, como primeira abordagem avaliamos o efeito de uma única administração da Alda-1 sobre a hiperalgesia crônica induzida pela CCI. Os resultados mostraram que a Alda-1 apresenta efeito analgésico, porém este efeito é de curta duração, persistindo por até duas horas após uma única administração subcutânea desta molécula (Stein & Zambelli, comunicação pessoal). Sabendo que a meia vida da Alda-1 é de aproximadamente 30 minutos, decidimos então administrar a Alda-1 por meio de bomba osmótica de liberação controlada. A dose presentemente utilizada foi baseada em estudos prévios demonstrando que a Alda-1

na mesma dose e via de administração deste estudo, protege o tecido cardíaco de ratos submetidos à isquemia/reperfusão por até 4 semanas após a oclusão da artéria coronária esquerda.^{71 72} De fato, os animais que receberam Alda-1 imediatamente após a cirurgia, e por todo o período de observação, apresentaram redução da hiperalgesia por 14 dias. Porém, a hiperalgesia se instalou após este período. Interessantemente, a Alda-1 induziu efeito analgésico mais duradouro em animais com deficiência na atividade da ALDH2 (ALDH2*2), quando comparado aos animais selvagens. Para a nossa surpresa, os animais ALDH2*2 não tratados com Alda-1, apresentaram hiperalgesia de mesma magnitude que as animais selvagens. É importante mencionar que os animais ALDH2*2 utilizados no presente estudo são homocigotos e, portanto, apresentam uma redução de 90% na atividade da ALDH2 (Chen e colaboradores, comunicação pessoal).

Como descrito na Introdução, Zambelli e colaboradores (2014)⁷³ mostraram que os animais ALDH2*2 são mais sensíveis à administração intraplantar de carragenina, ou seja, apresentam hiperalgesia inflamatória de maior magnitude quando comparados aos animais selvagens. No modelo inflamatório, o prejuízo na atividade da ALDH2 induz, portanto, acúmulo de aldeídos em tecidos submetidos a um estresse celular. Esse efeito não foi detectado em animais submetidos ao estresse crônico, como a CCI. Uma explicação para esses resultados é que provavelmente esses animais possuam mecanismos compensatórios, como enzimas antioxidantes mais ativas, que contrabalançam a resposta de modo que não seja tão exacerbada. Outro ponto que apoia essa hipótese é o fato da Alda-1 apresentar efeito analgésico mais duradouro nos animais ALDH2*2. Sabe-se que a Alda-1 é capaz de ativar tanto a enzima selvagem (duas vezes) quanto a enzima mutante (onze vezes). Mesmo com a ativação expressiva da enzima mutante, não era de se esperar que seu efeito analgésico fosse mais duradouro nesses animais. Assim, é possível que outros mecanismos citoprotetores estejam mais ativos nesses animais, como a glutatona, e que contribuam para um efeito aditivo ao efeito benéfico da Alda-1 nesse modelo. Essa questão deve ser melhor estudada futuramente, uma vez que não temos dados experimentais para sustentar essa hipótese.

Com objetivo de introduzir uma nova estratégia de inibição da ALDH2, decidimos inibi-la farmacologicamente. Novamente, não detectamos alteração na magnitude da hiperalgesia induzida pela CCI. Vale mencionar que nesse experimento falhamos em não trabalhar com os filamentos de von Frey menores que

2,44 gramas, o que pode ter impedido de detectar uma diminuição do limiar nociceptivo dos animais operados e tratados com Aldi. Novos experimentos serão conduzidos com o objetivo de testar essa hipótese.

O próximo passo foi avaliar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito analgésico da Alda-1 no modelo de neuropatia. Como descrito anteriormente, a ALDH2 também metaboliza aldeídos de cadeia longa a ácidos menos reativos. O acúmulo desses aldeídos, como o 4-HNE, além de induzir dor, está associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas⁴⁷. Assim, investigamos o efeito da Alda-1 sobre os níveis de 4-HNE em tecidos relacionados às vias nociceptivas, como DRG e medula espinal. Vale lembrar que os neurônios nociceptivos são pseudounipolares, contendo um axônio dirigido à periferia, um corpo celular presente no gânglio da raiz dorsal da medula espinal (DRG) e um axônio dirigido ao sistema nervoso central (medula espinal), onde ocorre a primeira sinapse do sistema de transmissão da dor. A medula espinal, especialmente o corno posterior, é o local onde as diferentes vias ascendentes e descendentes modulam, de forma facilitatória ou inibitória, a transmissão do estímulo nociceptivo entre neurônios aferentes primários e neurônios de projeção⁷⁴.

Os resultados presentemente obtidos indicam que a neuropatia não interfere nos níveis de adutos de 4-HNE com proteínas de tecidos das vias nociceptivas, quando avaliados por western blot. Apesar de amplamente aceito pela comunidade científica^{51,73,75,76,77}, pequenas alterações ou alterações localizadas em porções específicas do tecido podem passar despercebidas por essa técnica, já que os adutos são quantificados em lisado total. Para testarmos essa hipótese, Teixeira e colaboradores (comunicação pessoal) avaliaram os níveis de 4-HNE pela técnica de imunofluorescência, em cortes da medula espinal de camundongos submetidos à CCI. Interessantemente, foi detectado um aumento na imunomarcagem para 4-HNE no corno posterior da medula espinal ipsilateral à CCI. Esse estudo está sendo ampliado de modo a avaliarmos tecidos periféricos como o DRG e o nervo isquiático, neste modelo experimental. Os resultados obtidos por meio de imunofluorescência estão de acordo com outros autores que mostraram que a constrição do nervo infraorbital, um modelo de neuropatia do trigêmeo, leva ao aumento de adutos de 4-HNE com proteínas do nervo lesionado, quando avaliado por meio desta técnica⁷⁸. Esses autores não avaliaram esses adutos na medula espinal ou DRG. Em conjunto,

esses dados sugerem que o 4-HNE é uma molécula importante na indução da dor neuropática.

O próximo passo foi avaliar os níveis circulantes de 4-HNE. Nossos resultados indicam que o aumento de HNE circulante ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento da neuropatia. Contudo, ainda é possível observar uma tendência de maiores níveis de 4-HNE no 21º e 28º dias no grupo veículo e de menor concentração no grupo Alda-1, indicando o potencial envolvimento da ALDH2 na instalação da dor crônica. Para a nossa surpresa, os animais ALDH2*2 não apresentaram maiores níveis de 4-HNE, o que nos levou a avaliar os níveis desse aldeído em animais tratados com a Aldi, o inibidor da ALDH2. Interessantemente, os animais operados e tratados com a Aldi acumulam dez vezes mais 4-HNE que os animais controles, 7 dias após a CCI. Esse aumento é de cerca de 5 vezes a partir do 14 dia. Esse resultado comprova a importância da ALDH2 no controle do 4-HNE no nosso modelo experimental e sugere novamente que os animais com deficiência na atividade da ALDH2 desenvolvem mecanismos compensatórios para o *clearance* de 4-HNE. Uma limitação do nosso estudo foi a ausência de animais *naive* e tratados com Aldi. Esses experimentos serão conduzidos em um futuro próximo.

Li e colaboradores (2018) ⁷⁸ avaliaram, recentemente, os níveis de 4-HNE em animais *knockout* para a ALDH2 submetidos à oclusão crônica do gânglio da raiz dorsal (CCD), um modelo de neuropatia que consiste na exposição dos forames vertebrais na altura de L3-L4, onde uma haste de ferro em formato de L é implantada em cada forame para comprimir o DRG adjacente⁷⁹.

Os animais submetidos a esse procedimento apresentam maiores níveis plasmáticos de 4-HNE, assim como de proteínas carboniladas⁷⁸. Nesse estudo foi demonstrado que a Alda-1 reverte a nocicepção induzida pela CCD. Em contraste ao observado no nosso estudo, animais *knockout* para a ALDH2 apresentaram hiperalgesia crônica mais acentuada que em animais selvagens, 14 dias após a cirurgia. O mesmo trabalho apresenta evidências de que a Alda-1 diminui os níveis plasmáticos de 4-HNE, assim como de proteínas carboniladas⁷⁸. É importante mencionar que o nosso modelo difere do de Li e colaboradores em dois aspectos, primeiro, os nossos camundongos apresentam a mesma mutação observada na população asiática, não são *knockout* e, portanto, expressam a enzima com a atividade reduzida. Outra diferença é o modelo de neuropatia. Nosso modelo possui

um componente inflamatório importante, que deve ser considerado na interpretação dos nossos resultados.

Sabe-se que a ALDH2, apesar de ser a principal enzima envolvida no metabolismo do 4-HNE, também é modulada por este aldeído. Nesse sentido, o 4-HNE forma ligação covalente com a ALDH2, inativando-a. Isso significa que em situações em que ocorre aumento nos níveis de 4-HNE, é provável que sua atividade esteja reduzida. No presente estudo, não avaliamos o efeito da cirurgia sobre a atividade enzimática da ALDH2 em virtude das baixas concentrações proteicas nos tecidos das vias nociceptivas. Porém, considerando que detectamos aumento sistêmico de 4-HNE nos períodos iniciais da neuropatia, é possível que a ALDH2 esteja inibida, pelo menos nesse período.

Nesse sentido, como mencionado anteriormente, o 4-HNE é um subproduto da peroxidação lipídica. Logo, níveis aumentados de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas são encontrados em pacientes portadores de inflamação e neuropatia, sendo considerados marcadores do estresse oxidativo. Assim, alteração nos níveis destes compostos pode contribuir para a resposta inflamatória e, conseqüentemente, para a nocicepção. Nesse estudo, avaliamos os níveis de MDA como marcador da peroxidação lipídica. Os resultados apresentados demonstram que não foi detectada alterações significativas dos níveis de MDA na medula espinhal de animais selvagens, 14 dias após CCI. Porém, diferentemente dos selvagens, os animais ALDH2*2 apresentaram maiores níveis de MDA (cinco vezes) após cirurgia. Vale ressaltar que estudos anteriores demonstraram que esses animais produzem mais EROs após a administração de cisplatina, um quimioterápico que, sabidamente, induz prejuízo na função mitocondrial e causa neuropatia⁸⁰. Apesar dessas evidências, a maior peroxidação lipídica detectada na medula espinal 14 dias após a CCI parece não contribuir para a exacerbação da hiperalgesia nos animais transgênicos.

Um estudo recente demonstrou, em modelo de ligação parcial do nervo isquiático em camundongos, que as células de Schwann são importantes fontes de EROS. Neste modelo, a ativação de receptores TRPA1 inicia o recrutamento de macrófagos para a região perineural, e estas células contribuem para a produção exacerbada da EROs. Portanto, em nosso modelo é possível que a diminuição nos níveis de 4-HNE circulantes contribua para menor ativação de receptores TRPA1 e conseqüente produção de EROs ⁸¹

Uma vez que não observamos alterações significantes na medula espinal, decidimos avaliar os níveis desses aldeídos no tecido periférico. Interessantemente, os animais operados apresentaram um aumento significativo de MDA no nervo isquiático, no 7º dia após a cirurgia. Esse aldeído está normalizado nos animais tratados com Alda-1. Infelizmente não tínhamos animais ALDH2*2 para avaliar os níveis de MDA no nervo isquiático, contudo, a inibição farmacológica da ALDH2 foi suficiente para aumentar consideravelmente esse aldeído no 28º dia após a cirurgia, comprovando que a ALDH2 modula a peroxidação lipídica no modelo da CCI.

A ALDH2 tem sido descrita como uma enzima chave em modelos de isquemia cardíaca, cerebral e intestinal em roedores^{51,82,83}. Em alguns desses modelos, o estresse oxidativo e a produção de aldeídos citotóxicos são reduzidos pela Alda-1, que por sua vez inibe a liberação de TNF- α , IL-6, e IL-1 β e quimiocinas como MIP-2 (proteína inflamatória de macrófago), MCP-1 (proteína quimiotática de monócito) e CXCL-1. Vele mencionar que além de seu efeito benéfico em modelos de isquemia, a Alda-1 atua no sistema nervoso central, uma vez que esta molécula inibe o comportamento de depressão e ansiedade, alterando os níveis de proteínas envolvidas com a biogênese mitocondrial e citocinas, no córtex frontal e hipocampo⁸². Assim, em estudos posteriores, avaliaremos as vias “downstream” a síntese de aldeídos com o objetivo de melhor compreender seu papel na nocicepção.

O modelo de constrição crônica do nervo isquiático é um modelo clássico de neuropatia crônica. Porém, sabe-se que nos períodos iniciais após à cirurgia o componente inflamatório é importante para a diminuição do limiar nociceptivo dos animais. Estudos mostram que a administração de antiinflamatórios não esteroidais, no 7º dia após a CCI, reverte a hiperalgesia neste modelo, e esse efeito não é detectado quando esta classe de fármacos é administrada no 14º dia. Portanto, diversos autores afirmam que apenas no 14º dia a hiperalgesia é considerada de origem neuropática. Por outro lado, estudos que avaliam a plasticidade neural neste modelo apontam que as alterações espinais são mais marcantes à partir do 21º dia após a CCI e sugerem que no 14º dia a neuropatia não está completamente instalada⁸⁴. Adicionalmente, no 14º dia após a CCI os animais ainda apresentam maiores níveis de citocinas e quimiocinas, como IL-6 e CXCL-1, fenômeno que não é mais observado posteriormente⁸⁵. Desta forma, com base nos resultados obtidos, os quais mostram que a CCI induz elevação de aldeídos reativos nas etapas iniciais

da neuropatia, é possível inferir que a ALDH2 tenha maior importância nos períodos inflamatórios do desenvolvimento da dor neuropática.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que a ativação da ALDH-2 pela Alda-1 retarda o desenvolvimento da dor neuropática por reduzir os níveis de aldeídos na corrente sanguínea e tecidos periféricos nos períodos iniciais da neuropatia. A Alda-1 induz efeito antihiperálgésico mais prolongado em animais com deficiência na atividade da ALDH2. Em contrapartida, a inibição farmacológica da ALDH-2, apesar de não interferir com o limiar nociceptivo dos animais, aumenta os níveis plasmáticos e teciduais desses aldeídos.

Em conjunto, nossos dados indicam que a ALDH-2 está envolvida na instalação da dor neuropática, principalmente quando o componente inflamatório é preponderante.

REFERÊNCIAS

1. Hartley, D. P., Ruth, J. A. & Petersen, D. R. The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Arch. Biochem. Biophys.* (1995). doi:10.1006/abbi.1995.1028
2. Reichard, J. F., Vasiliou, V. & Petersen, D. R. Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in stellate cell lines derived from normal and cirrhotic rat liver. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* (2000). doi:10.1016/S1388-1981(00)00095-0
3. Luckey, S. W. & Petersen, D. R. Metabolism of 4-hydroxynonenal by rat Kupffer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* (2001). doi:10.1006/abbi.2001.2307
4. Perez-Miller, S. *et al.* Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2010). doi:10.1038/nsmb.1737
5. Joseph, E. K. & Levine, J. D. Mitochondrial electron transport in models of neuropathic and inflammatory pain. *Pain* (2006). doi:10.1016/j.pain.2005.12.010
6. Swieboda, P., Filip, R., Prystupa, A. & Drozd, M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* (2013). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
7. Bushnell, M. C., Čeko, M. & Low, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience* (2013). doi:10.1038/nrn3516
8. Ossipov, M. H., Dussor, G. O. & Porreca, F. Central modulation of pain. *Journal of Clinical Investigation* (2010). doi:10.1172/JCI43766
9. Freire, M. O. & Van Dyke, T. E. Natural resolution of inflammation. *Periodontol. 2000* (2013). doi:10.1111/prd.12034
10. Ji, R. R., Chamesian, A. & Zhang, Y. Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* (2016). doi:10.1126/science.aaf8924
11. Colloca, L. *et al.* Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 1–20 (2017).
12. Mansour, A. R., Farmer, M. A., Baliki, M. N. & Apkarian, A. V. Chronic pain: The role of learning and brain plasticity. *Restor. Neurol. Neurosci.* (2014). doi:10.3233/RNN-139003
13. Rajapakse, D., Lioffi, C. & Howard, R. F. Presentation and management of chronic pain. *Archives of Disease in Childhood* (2014). doi:10.1136/archdischild-2013-304207
14. Holmes, D. The pain drain. *Nature* (2016). doi:10.1038/535S2a
15. Kuner, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine* (2010). doi:10.1038/nm.2231
16. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* (2009). doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
17. Besson, J. M. The neurobiology of pain. *Lancet* (1999). doi:10.1016/S0140-6736(99)01313-6
18. Loeser, J. D. & Treede, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* (2008). doi:10.1016/j.pain.2008.04.025
19. Millan, M. J. The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology* (1999). doi:10.1016/S0301-0082(98)00048-3
20. Cervero, F. & Laird, J. M. A. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): A

- new model. *Pain* (1996). doi:10.1016/S0304-3959(96)03165-X
21. Julius, D. & Basbaum, A. *Julius D, Basbaum AI* Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210. *Nature* (2001). doi:10.1038/35093019
 22. Nakamura, M. & Ferreira, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* (1987). doi:10.1016/0014-2999(87)90606-6
 23. Ferreira, S. H., Romitelli, M. & de Nucci, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* (1989). doi:10.1097/00005344-198900135-00065
 24. Piovezan, A. P., D'Orleans-Juste, P., Tonussi, C. R. & Rae, G. A. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (1997). doi:10.1139/cjpp-75-6-596
 25. Schaible, H. G. & Richter, F. Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archives of Surgery* (2004). doi:10.1007/s00423-004-0468-9
 26. Hwang, S. W. & Oh, U. Current concepts of nociception: Nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Current Opinion in Anaesthesiology* (2007). doi:10.1097/ACO.0b013e3282eff91c
 27. Volkers, L., Mechoukhi, Y. & Coste, B. Piezo channels: from structure to function. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (2014). doi:10.1007/s00424-014-1578-z
 28. Dai, Y. TRPs and pain. *Semin. Immunopathol.* **38**, 277–291 (2016).
 29. Szewczyk, A. Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol. Rev.* (2002). doi:10.1124/pr.54.1.101
 30. Joseph, E. K. & Levine, J. D. Multiple PKC ϵ -dependent mechanisms mediating mechanical hyperalgesia. *Pain* (2010). doi:10.1016/j.pain.2010.02.011
 31. Joseph, E. K. & Levine, J. D. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Eur. J. Neurosci.* (2004). doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03750.x
 32. Roede, J. R. & Jones, D. P. Reactive species and mitochondrial dysfunction: Mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (2010). doi:10.1002/em.20553
 33. Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J. & Burrell, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Metab.* (2001). doi:10.1152/ajpendo.2001.280.6.E827
 34. Frayn, K. Regulation of fatty acid delivery in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1998). doi:10.1007/978-1-4899-1928-1_16
 35. Massey, K. A. & Nicolaou, A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. *Biochem. Soc. Trans.* (2011). doi:10.1042/BST0391240
 36. Massey, K. A. & Nicolaou, A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* (2013). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.565
 37. Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2014). doi:10.1155/2014/360438
 38. Yin, H., Xu, L. & Porter, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* (2011). doi:10.1021/cr200084z
 39. Volinsky, R. & Kinnunen, P. K. J. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: From biophysics to physiology and molecular

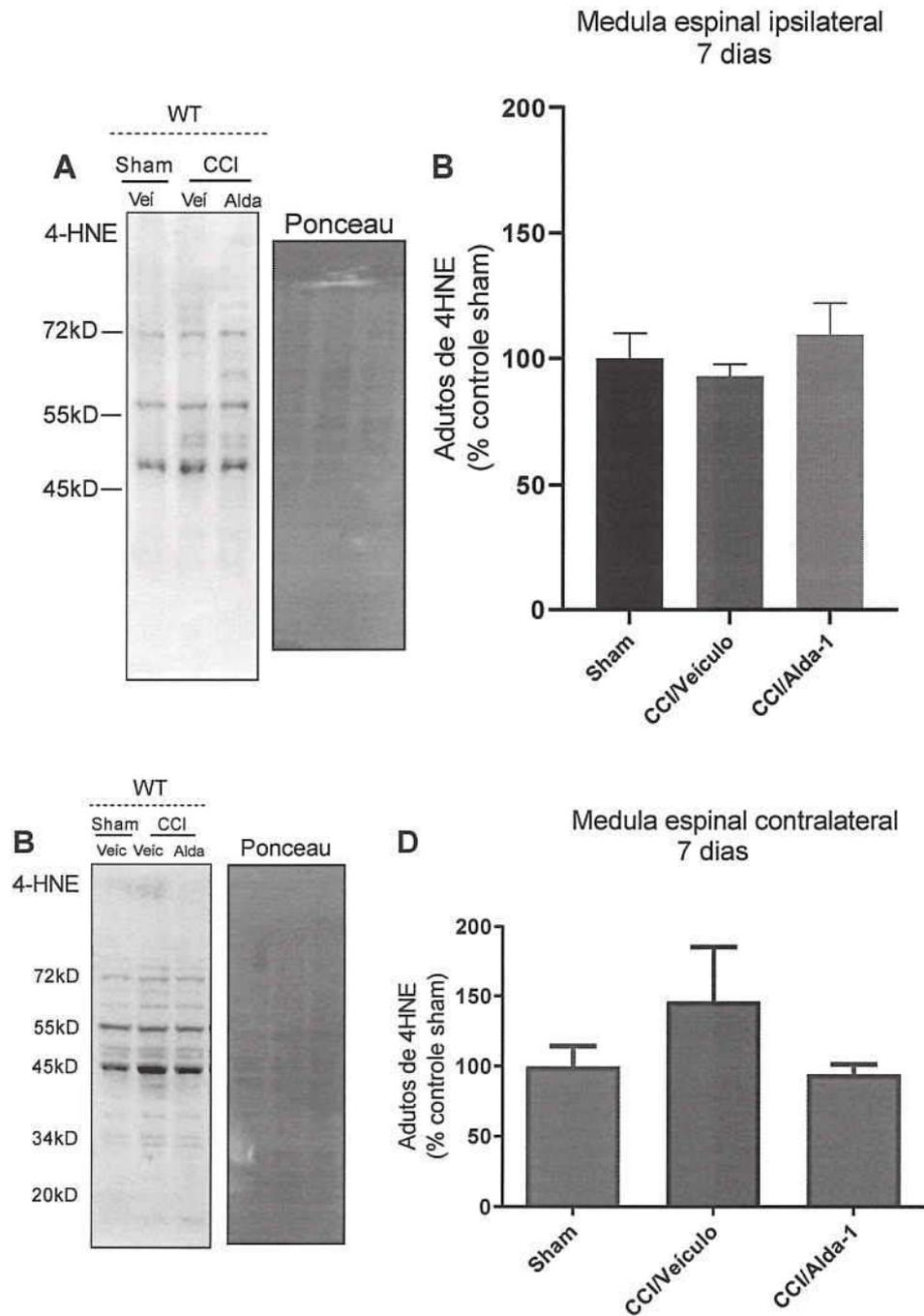
- pathology. *FEBS Journal* (2013). doi:10.1111/febs.12247
40. Kinnunen, P. K. J., Kaarniranta, K. & Mahalka, A. K. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: From biophysics to clinical correlations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (2012). doi:10.1016/j.bbamem.2012.04.008
 41. Reis, A. & Spickett, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (2012). doi:10.1016/j.bbamem.2012.02.002
 42. Fruhwirth, G. O., Loidl, A. & Hermetter, A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (2007). doi:10.1016/j.bbadis.2007.04.009
 43. Girotti, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* (1998).
 44. Kanner, J., German, J. B. & Kinsella, J. E. Initiation of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (1987). doi:10.1080/10408398709527457
 45. Poli, G., Schaur, R. J., Siems, W. G. & Leonarduzzi, G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med. Res. Rev.* **28**, 569–631 (2008).
 46. Castro, J. P., Jung, T., Grune, T. & Siems, W. 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radical Biology and Medicine* (2017). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.497
 47. Mattson, M. P. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp. Gerontol.* **44**, 625–33 (2009).
 48. Trevisani, M. *et al.* 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 13519–13524 (2007).
 49. Wu, D., Ph, D. & Cederbaum, A. I. Free Radical Damage. *Alcohol* (2003).
 50. Chen, C. H. *et al.* Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* (80-). (2008). doi:10.1126/science.1158554
 51. Chen, C. H. *et al.* Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* (80-). **321**, 1493–1495 (2008).
 52. Brooks, P. J., Enoch, M. A., Goldman, D., Li, T. K. & Yokoyama, A. The alcohol flushing response: An unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. *PLoS Med.* (2009). doi:10.1371/journal.pmed.1000050
 53. Wang, H. *et al.* Ethnic differences in pain, itch and thermal detection in response to topical capsaicin: African Americans display a notably limited hyperalgesia and neurogenic inflammation. *Br. J. Dermatol.* (2010). doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09628.x
 54. Woodrow, K. M., Friedman, G. D., Siegelau, A. B. & Collen, M. F. Pain tolerance: differences according to age, sex and race. *Psychosom. Med.* (1972). doi:10.1097/00006842-197211000-00007
 55. Aramaki, J., Kawana, S., Effendy, I., Happle, R. & Löffler, H. Differences of skin irritation between Japanese and European women. *Br. J. Dermatol.* (2002). doi:10.1046/j.1365-2133.2002.04509.x
 56. Sun, L., Ferreira, J. C. B. & Mochly-Rosen, D. ALDH2 activator inhibits increased myocardial infarction injury by nitroglycerin tolerance. *Sci. Transl. Med.* **3**, 107ra111 (2011).
 57. Zambelli, V. O. *et al.* Aldehyde dehydrogenase-2 regulates nociception in rodent models of acute inflammatory pain. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).

58. Goldberg, D. S. & McGee, S. J. Pain as a global public health priority. *BMC Public Health* (2011). doi:10.1186/1471-2458-11-770
59. Okie, S. A Flood of Opioids, a Rising Tide of Deaths. *N. Engl. J. Med.* (2010). doi:10.1056/NEJMp1011512
60. DEMKOV V. Ethical Guidelines for investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Aust. Min.* **62**, 78–79 (1970).
61. Bennett, G. J. & Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87–107 (1988).
62. Chuang, Y.-C., Lee, C.-H., Sun, W.-H. & Chen, C.-C. Involvement of advillin in somatosensory neuron subtype-specific axon regeneration and neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2018). doi:10.1073/pnas.1716470115
63. Wilkerson, J. L. *et al.* Evaluation of different drug classes on transient sciatic nerve injury-depressed marble burying in mice. *Pain* (2018). doi:10.1097/j.pain.0000000000001199
64. Ramer, M. S., French, G. D. & Bisby, M. A. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain* (1997). doi:10.1016/S0304-3959(97)00019-5
65. Carneiro, L. & Nunes, M. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HIPERALGÉSICA E EDEMATOGÊNICA INDUZIDA POR BmTx: UMA MIOTOXINA ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops moojeni* (CAIÇACA). 1–11 (2008).
66. Khanna, M. *et al.* Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* (2011). doi:10.1074/jbc.M111.293597
67. Bradford, M. M. 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 (1976).
68. Electrophoresis, B. & References, D. Western Blotting - a Beginner ' S Guide. *Abcam* (2000). doi:10.1093/innovait/inq115
69. Weber, D. *et al.* Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by ELISA-Comparison of two primary antibodies\$. *Redox Biol.* (2013). doi:10.1016/j.redox.2013.01.012
70. SNEDECOR, G. W. & HABER, E. S. Statistical methods for an incomplete experiment on a perennial crop. *Biometrics* **2**, 61–7 (1946).
71. Manuscript, A. by Nitroglycerin Tolerance. **3**, 1–14 (2013).
72. Gomes, K. M. S. *et al.* Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: Benefits of Alda-1. *Int. J. Cardiol.* **179**, 129–138 (2015).
73. Zambelli, V. O. *et al.* Aldehyde dehydrogenase-2 regulates nociception in rodent models of acute inflammatory pain. *Sci. Transl. Med.* (2014). doi:10.1126/scitranslmed.3009539
74. Basbaum, A. I. & Fields, H. L. Endogenous Pain Control Systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**, 309–338 (1984).
75. Stachowicz, A. *et al.* The impact of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activation by Alda-1 on the behavioral and biochemical disturbances in animal model of depression. *Brain. Behav. Immun.* **51**, 144–153 (2016).
76. Gomes, K. M. S. *et al.* Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: Benefits of Alda-1. *Int. J. Cardiol.* **179**, 129–138 (2015).
77. Andringa, K. K., Udoh, U. S., Landar, A. & Bailey, S. M. Proteomic analysis of 4-hydroxynonenal (4-HNE) modified proteins in liver mitochondria from chronic

- ethanol-fed rats. *Redox Biol.* (2014). doi:10.1016/j.redox.2014.09.006
78. Li, C. *et al.* Targeting ALDH2 for therapeutic interventions in chronic pain-related myocardial ischemic susceptibility. *Theranostics* **8**, 1027–1041 (2018).
 79. Wang, T. *et al.* Chronic compression of the dorsal root ganglion enhances mechanically evoked pain behavior and the activity of cutaneous nociceptors in mice. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0137512
 80. Kim, J., Chen, C.-H., Yang, J. & Mochly-Rosen, D. Aldehyde dehydrogenase 2*2 knock-in mice show increased reactive oxygen species production in response to cisplatin treatment. *J. Biomed. Sci.* **24**, 33 (2017).
 81. De Logu, F. *et al.* Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat. Commun.* (2017). doi:10.1038/s41467-017-01739-2
 82. Fu, S. H. *et al.* Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **387**, 87–94 (2014).
 83. Zhu, Q., He, G., Wang, J., Wang, Y. & Chen, W. Pretreatment with the ALDH2 agonist Alda-1 reduces intestinal injury induced by ischaemia and reperfusion in mice. *Clin. Sci.* **131**, 1123–1136 (2017).
 84. Gwak, Y. S., Kang, J., Unabia, G. C. & Hulsebosch, C. E. Spatial and temporal activation of spinal glial cells: Role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* (2012). doi:10.1016/j.expneurol.2011.10.010
 85. Bowles, R. D. *et al.* In vivo luminescent imaging of NF- κ B activity and NF- κ B-related serum cytokine levels predict pain sensitivities in a rodent model of peripheral neuropathy. *Eur. J. Pain (United Kingdom)* (2016). doi:10.1002/ejp.732

APÊNDICE

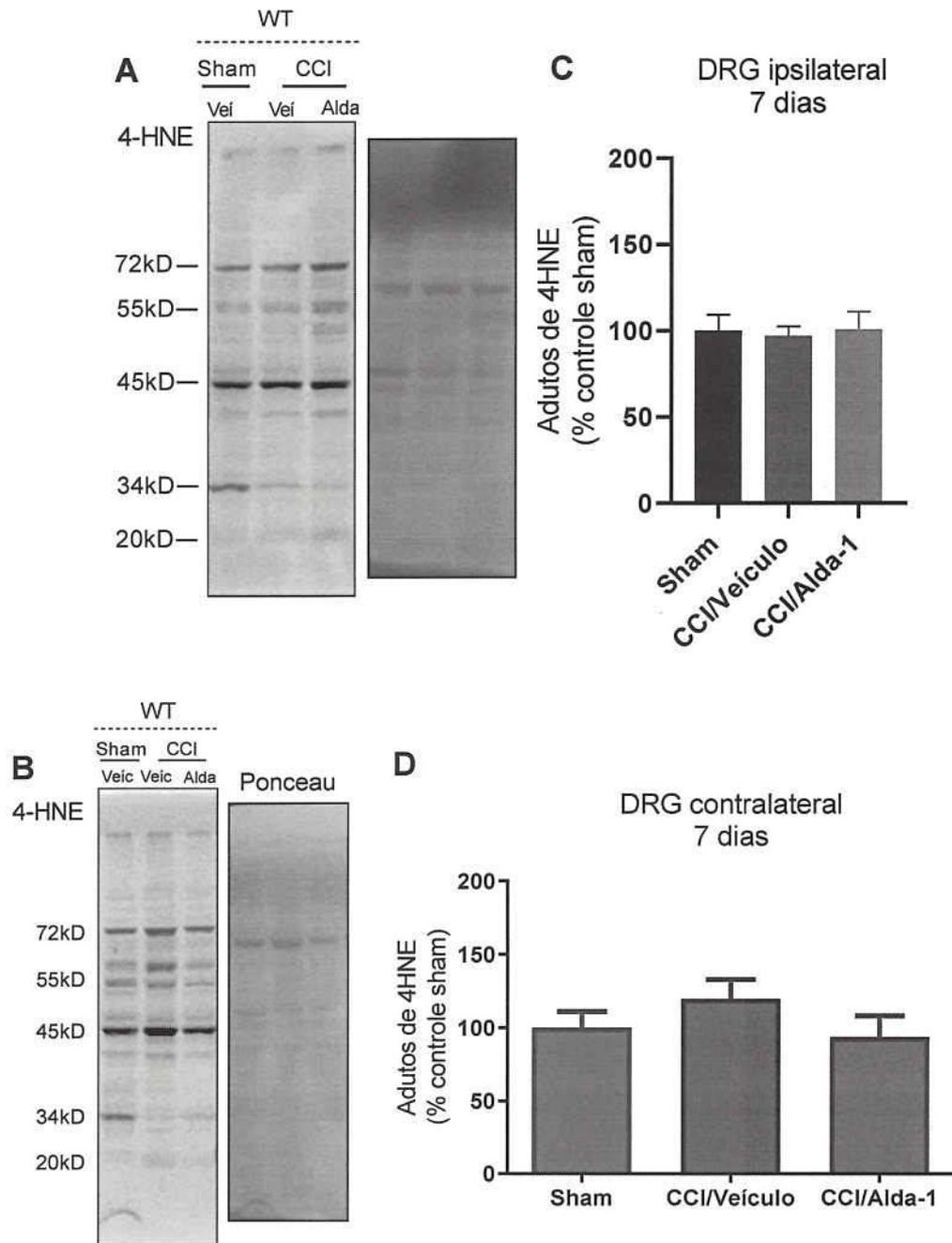
Figura 17: Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal ipsi e contra lateral à constrição crônica, 7 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A e C) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal ipsi e contra lateral à CCI (B e D) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela marcação do Ponceau e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

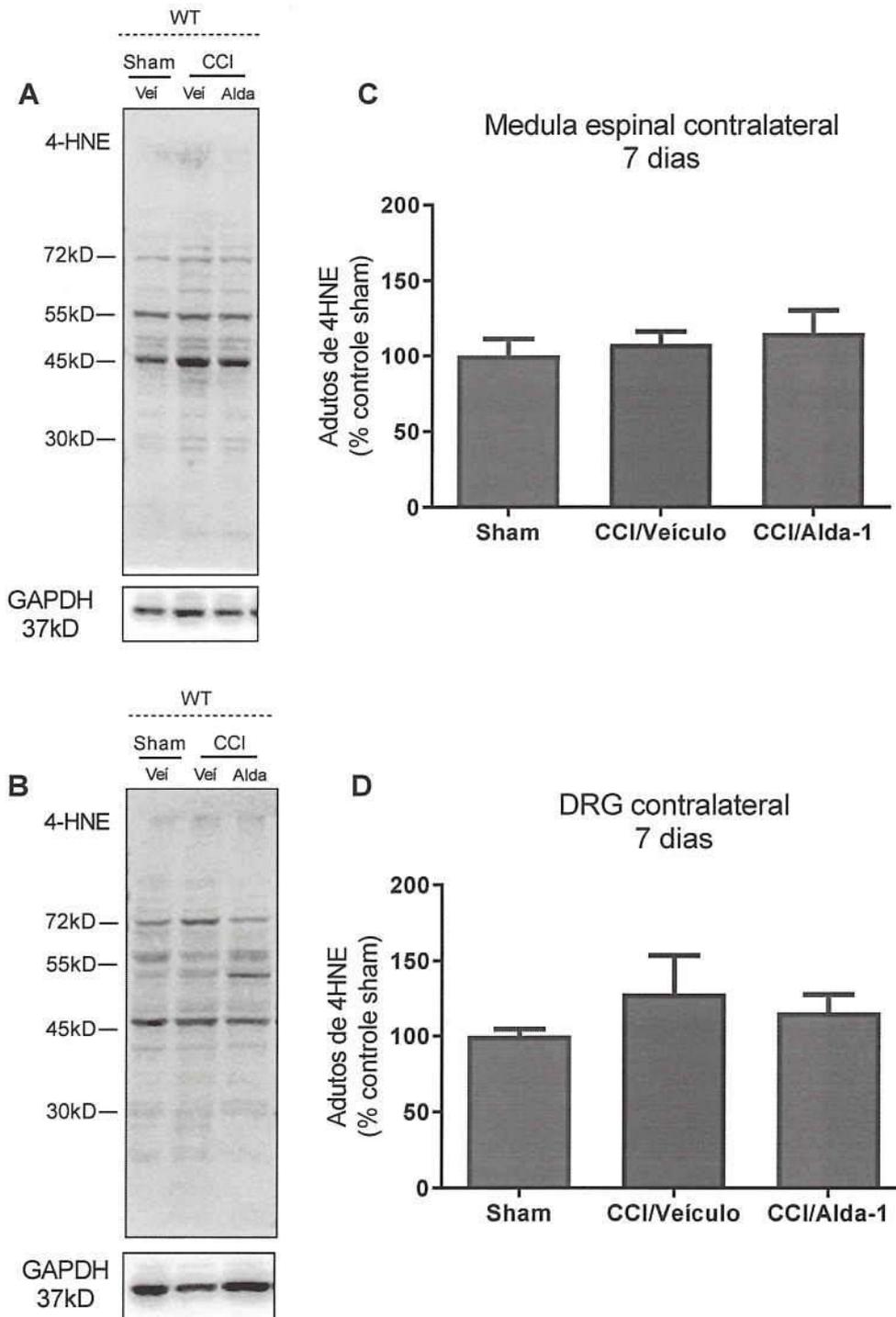
Figura 18: Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na DRG ipsi e contra lateral à constrição crônica, 7 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A e C) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsi e contra lateral à CCI (B e D) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela marcação do Ponceau e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

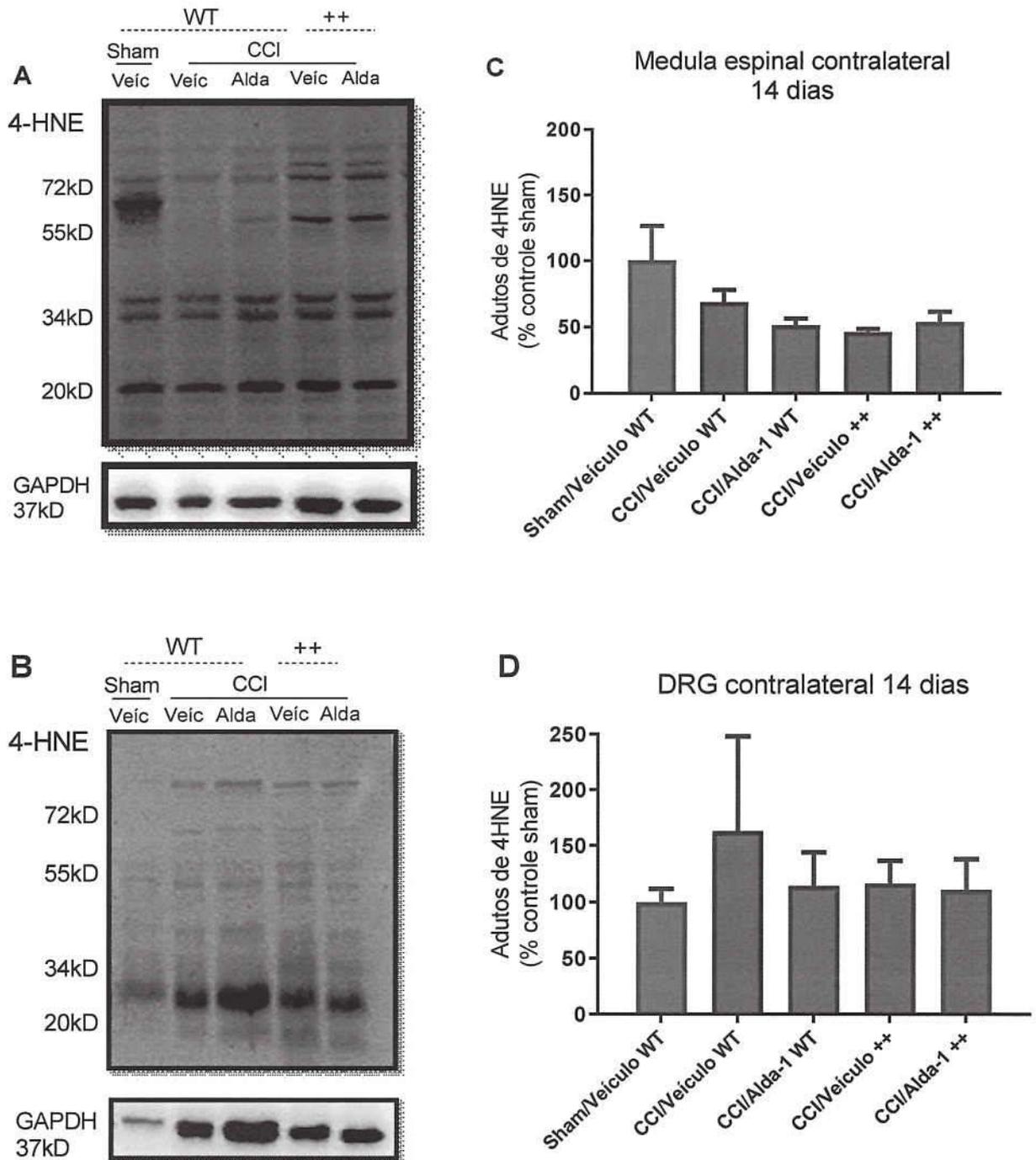
Figura 19: Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal e gânglio da raiz dorsal contra lateral à constrição crônica, 7 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A e B) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI (C e D) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão do GAPDH e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

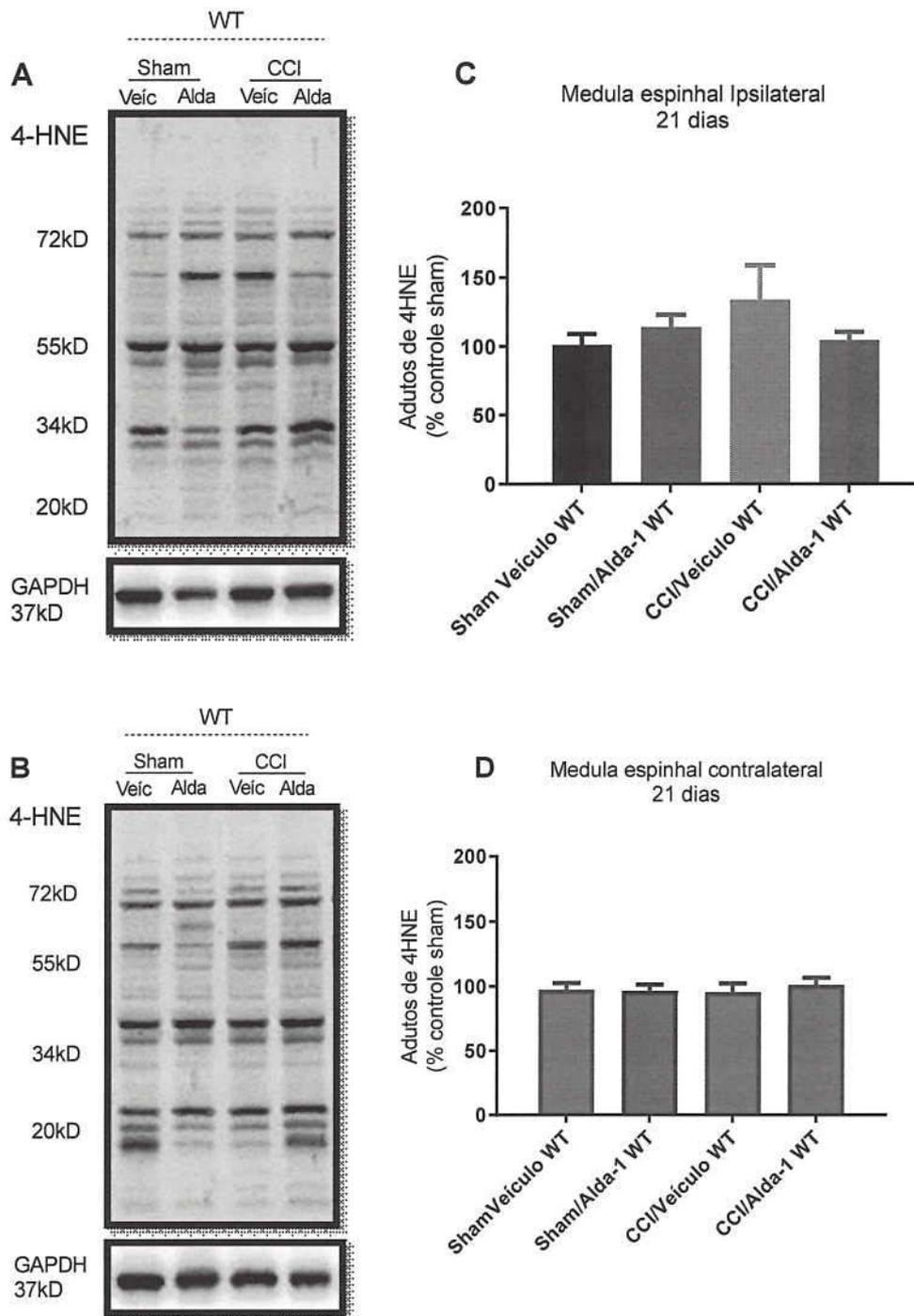
Figura 20: Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal contralateral à constrição crônica, 14 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A e B) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI (C e D) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de GAPDH e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

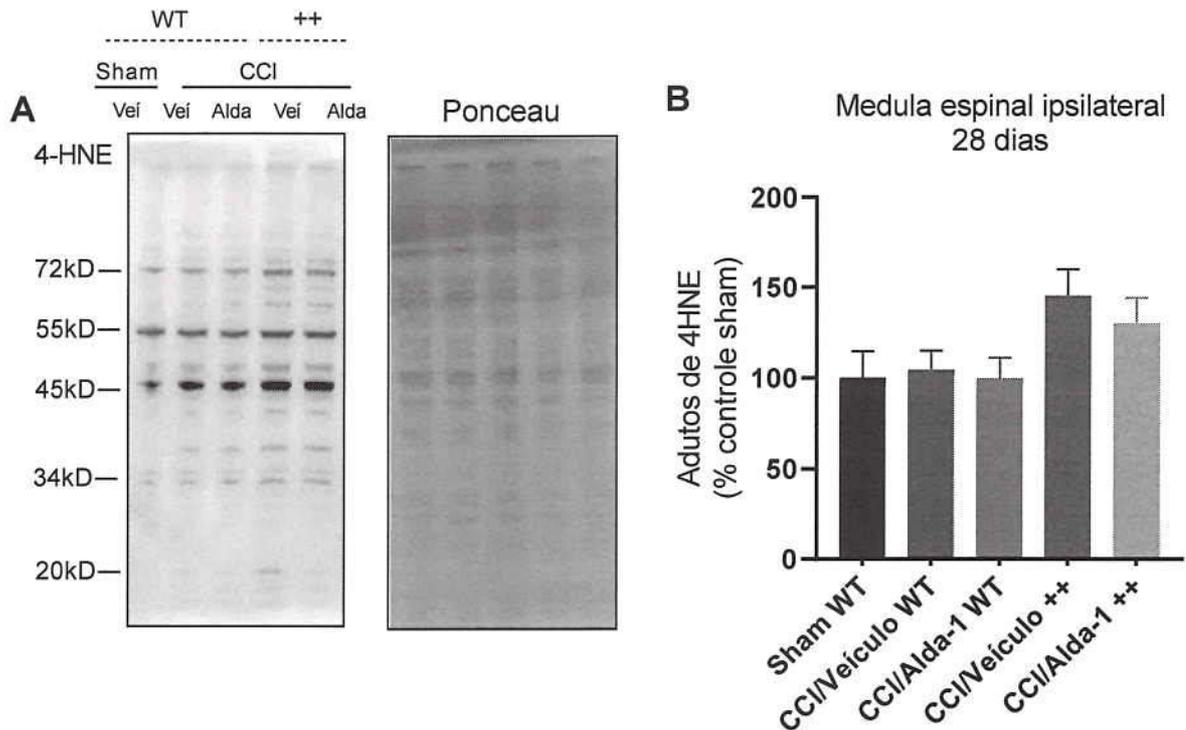
Figura 21: Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal ipsi e contra lateral à constrição crônica, 21 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A e C) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI (B e D) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão do GAPDH e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

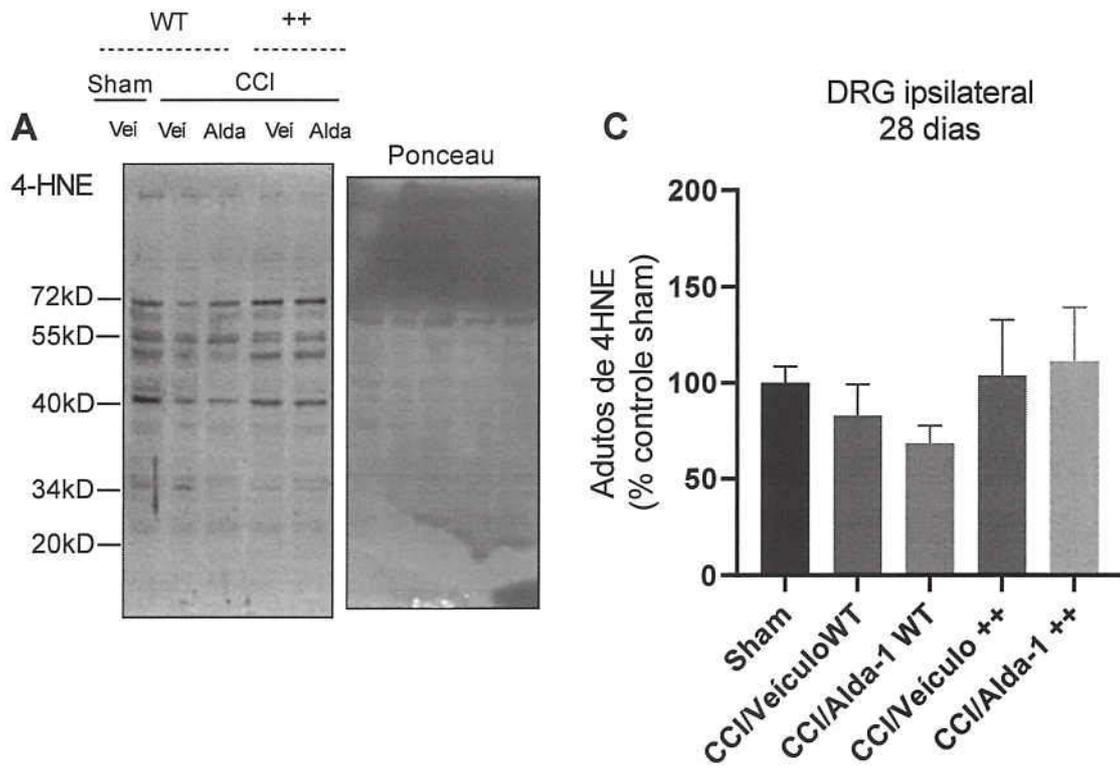
Figura 22: Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal na medula espinal ipsilateral à constrição crônica, 28 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI (B) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela marcação do Ponceau e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

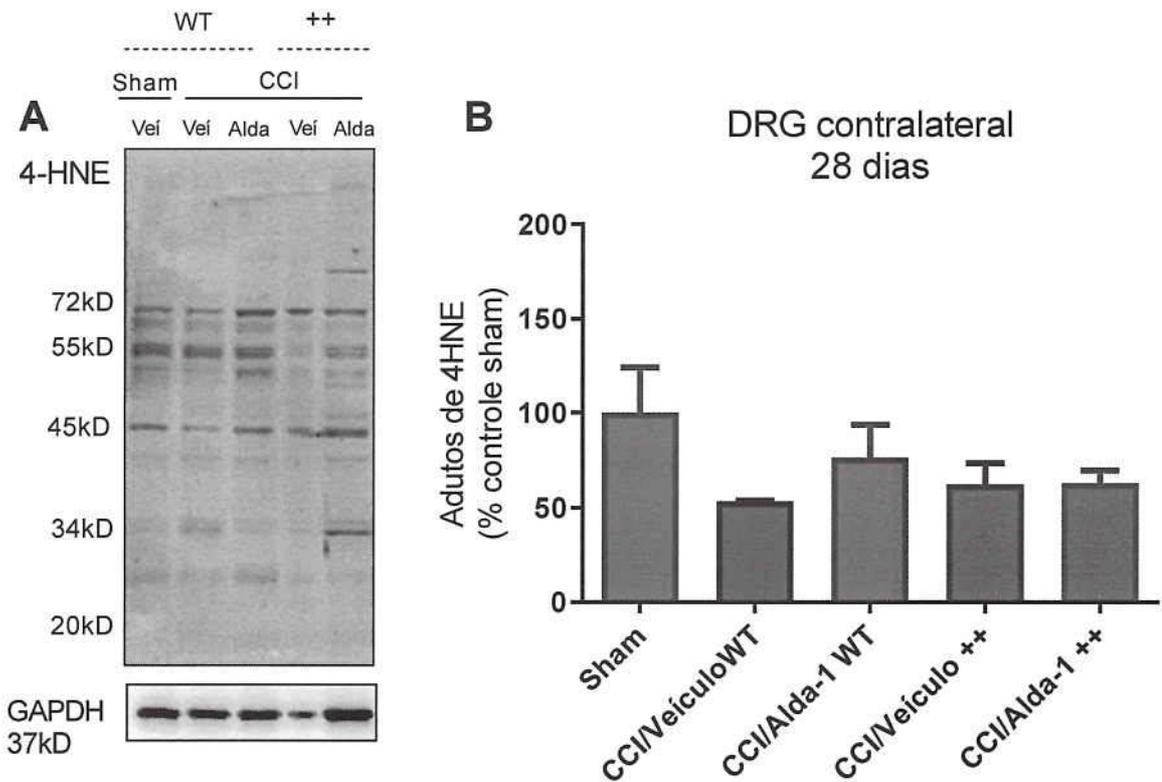
Figura 23: Efeito da Alda-1 sobre a expressão e 4- hidroxinonenal no gânglio da raiz dorsal ipsi e contra lateral à constrição crônica, 28 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A e B) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas doDRG ipsi e contra lateral à CCI (C e D) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela marcação do Ponceau e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.

Figura 24: Efeito da Alda-1 sobre a expressão de 4- hidroxinonenal no gânglio da raiz dorsal contra lateral à constrição crônica, 28 dias após a cirurgia.



Os animais foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI). Animais controles, falso operados, tiveram o nervo isquiático exposto, manipulado, mas não amarrados. (A) Imagem representativa do Western blot para adutos de 4-HNE com proteínas da medula espinal e DRG ipsilateral à CCI (B) Quantificação da densidade óptica. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de GAPDH e estão expressos como % em relação ao controle falso operado (sham) tratado com Veículo. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. n=4 – 6/grupo.

Fonte: Beatriz Stein, 2019.