

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

THAMYRIS REIS MORAES

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO HMGB1 NA ATIVAÇÃO DOS
RECEPTORES RAGE E TLR4 EM CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS DURANTE
A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL**

Alfenas/MG

2022

THAMYRIS REIS MORAES

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO HMGB1 NA ATIVAÇÃO DOS
RECEPTORES RAGE E TLR4 EM CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS DURANTE
A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.
Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

**Alfenas/MG
2022**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Moraes, Thamyris Reis.

Investigação da participação do HMGB1 na ativação dos receptores RAGE e TLR4 em células da glia espinais durante a dor neuropática induzida por Paclitaxel / Thamyris Reis Moraes. - Alfenas, MG, 2022.

89 f. : il. -

Orientador(a): Giovane Galdino de Souza.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. HMGB1. 2. Células da glia. 3. Dor neuropática. I. Souza, Giovane Galdino de, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

THAMYRIS REIS MORAES

INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO HMGB1 NA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 EM CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS DURANTE A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutora Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor

Aprovada em: 08 de setembro de 2022

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza
Instituição: Universidade federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Morgana Duarte Silva
Instituição: Profa. Dra. Morgana Duarte Silva
UFSC

Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte
Instituição: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte
UFMG

Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho
Instituição: Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho
UFRRJ

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia
Instituição: Universidade federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Tayllon dos Anjos Garcia, Professor(a) Visitante**, em 08/09/2022, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 15/09/2022, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Morgana Duarte da Silva, Usuário Externo**, em 15/09/2022, às 12:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Guimarães Marinho, Usuário Externo**, em 16/09/2022, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Igor Dimitri Gama Duarte, Usuário Externo**, em 22/09/2022, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sej.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0811054 e o código CRC 9E775D2A.

Aos que me olham lá de cima: Pai Zé Maria e Vó Tereza.

AGRADECIMENTOS

Maior que o desafio de escrever essa tese, foi o desafio de em poucas palavras agradecer aos que caminham ao meu lado.

Dou início a este texto breve, porém cheio sentimento, ao único motivo da existência de todas as coisas, Deus, que me permitiu alcançar este objetivo regado à muito aprendizado e evolução. Agradeço ao meu orientador Doutor Giovane Galdino de Souza, que por 6 longos anos me acompanhou nesta trajetória, obrigada pela oportunidade de conhecer o que é uma pesquisa séria e cheia de comprometimento, pois assim eu compreendi o que realmente quero para minha vida profissional.

Sigo agradecendo à personificação do maior amor que qualquer pessoa pode receber, minha família. Meus pais Carlos e Mara, que jamais mediram esforços para me manter de pé e sempre com muito afeto aplaudiram minhas vitórias e me acolheram em minhas lutas. Minha irmã Michele, meu cunhado/irmão Ailson e meus sobrinhos Sarah e Lucca, e a vó Cleonice, os quais fazem minha vida mais leve. Saibam que tudo em minha vida é para que eu possa ser alguém melhor pra vocês.

Todo o conhecimento e resiliência que adquiri nestes anos foram importantes, mas as amizades que construí é o que conquistei de mais valioso. Não existe uma forma de categorizar tudo o que me foi proporcionado por minha família do laboratório, mas quero em especial agradecer aos meus irmãos de caminhada Iago, Lívia, Gabriela, Bruno e Javier. Foram muitos mutirões de experimentos, muitos “podcasts” de assuntos variados e muitos abraços coletivos necessários. É clichê dizer que quero vocês pra sempre em minha vida, mas o amor que tenho por vocês ultrapassa qualquer distância, e sim, vocês são a família que Alfenas me deu.

O doutorado me trouxe um presente, que não envolve ensino técnico ou teórico, não foi por acaso nem por coincidência, mas me trouxe uma experiência nova. Esse presente se chama Werley, que se tornou meu companheiro de vida, que sempre se dispôs a estar ao meu lado e até mesmo entender os períodos em que estive mais reclusa por necessidade e ser meu ponto de paz. Está

presente em cada detalhe, me oferecendo força, carinho e o mais importante de tudo: amor. Obrigada, minha vida!

Também quero agradecer à Renata Mendes, minha amiga/irmã “Renight” por nossos dias juntas na pós-graduação e fora dela. Você foi e é essencial para meu crescimento científico e humano. Aprendi que a pós-graduação vai muito além de experimentos e que é possível formar laços eternos e reconhecer que existem conexões que são de outras vidas. Obrigada!

Aos meus amigos que mesmo eu estando distante, ocupada, estressada e com saudades sempre entenderam meu momento e estiveram ali, torcendo por cada passo e cada vitória alcançada. Ariane, meu alicerce nos momentos de paz e de caos. Dayanne e Rodrigo, meu amparo de todos os momentos, seres humanos incríveis que me motivam a nunca perder a fé. Flávia, Thayná, Karl, Virgínia, Pedrinho, Gislaine Siqueira, Gislane Helena e Maísa, obrigada por todo apoio e por me fazerem entender que o tempo e a distância não mudam as amizades verdadeiras.

Agradeço a todos os envolvidos nas colaborações do meu trabalho, sendo alunos e professores e funcionários da UNIFAL e deixo meu agradecimento em especial aos técnicos Luciana e Luiz, os quais também fazem parte desta família a qual fui presenteada.

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas e a todos que não citei mas fizeram parte deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

Eu não teria outra forma de finalizar meus agradecimentos sem mencionar as duas pessoas que me motivaram a ser quem eu sou e me manter neste caminho. Hoje eles me olham lá de cima e eu tenho certeza que me acompanham e me protegem em cada passo meu. Impossível falar de Pai Zé Maria e Vó Tereza sem me emocionar, pois durante meu doutorado, estas duas pessoas essenciais fizeram sua passagem para o outro plano, mas me deixaram aqui com a missão de orgulhá-los todos os dias. Todo esse trabalho é dedicado

a vocês, que hoje não estão mais presentes para me abraçar e me parabenizar, mas aí de cima já sabem que eu consegui e que tudo foi por vocês. Obrigada Pai, suas palavras ecoam em meu coração todos os dias e sei que você está aí tocando sua flauta doce em comemoração...e vó, eu serei pra sempre sua guerreira.

RESUMO

A dor neuropática induzida por quimioterapia é o principal efeito adverso de fármacos quimioterápicos e está relacionada à diminuição da qualidade de vida dos pacientes acometidos por câncer, podendo levar até à descontinuação do tratamento. A nível espinal, a modulação desse tipo de dor envolve não só neurônios, como também as células da glia que quando ativadas aumentam a expressão de receptores e sinalizações intracelulares resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios. A proteína de alta mobilidade do grupo box-1 (HMGB1) é liberada durante a dor neuropática e seu papel no desenvolvimento da dor consiste em sua interação com receptores ativando vias de sinalização. Deste modo, o presente estudo investigou o papel do HMGB1 em células da glia, nos receptores RAGE e TLR4 e na sinalização de MAPK p38 e NFκB, bem como o envolvimento destas vias na dor neuropática induzida por paclitaxel. Para tal, foram utilizados camundongos machos C57BL/6 e C57BL/6 TLR4^(-/-) pesando entre 20 e 25g. Foi utilizado o aparato von Frey filamentos para avaliação do limiar nociceptivo. Para a indução da dor neuropática foi utilizado o agente quimioterápico paclitaxel, o qual foi administrado em dias alternados por 6 dias. A proteína recombinante HMGB1 foi administrada i.t. para investigar o efeito da mesma sobre o limiar nociceptivo. A participação dos receptores RAGE e TLR4 foi investigada por meio dos respectivos antagonistas FPS-ZM1 e LPS-RS administrados via intratecal (i.t.). A participação de micróglia, astrócitos, da MAPK p38 e do NFκB foi avaliada utilizando os inibidores minociclina, fluorocitrato, SML0540 e PDTC, respectivamente, também por via i.t. Foi feito o ensaio de Western blot para avaliar os níveis proteicos de HMGB1, RAGE, TLR4, Iba1 e GFAP e o ensaio de Elisa para avaliação dos níveis de HMGB1, TNF-α e IL1-β. Os resultados indicam a participação dos receptores RAGE e TLR4, da micróglia, astrócitos e da sinalização MAPK p38 e NFκB tanto na nocicepção induzida por HMGB1 como na dor neuropática induzida por paclitaxel. Também foi observado o aumento dos níveis proteicos de HMGB1 na gênese da dor neuropática, e o envolvimento dos receptores TLR4 na ativação microglial. O bloqueio dos receptores RAGE e TLR4 levou à diminuição das citocinas pró-inflamatórias. Os

resultados indicam que o HMGB1 liberado na fase inicial da do tratamento com paclitaxel ativa receptores RAGE e TLR4 na micróglia, aumentando níveis de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a dor neuropática.

Palavras-chave: HMGB1; células da glia; dor neuropática;

ABSTRACT

Chemotherapy-induced neuropathic pain is the main adverse effect of chemotherapeutic drugs and is related to a decrease in the quality of life of cancer patients, which can even lead to treatment discontinuation. At the spinal level, the modulation of this type of pain involves not only neurons but also glial cells that, when activated, increase the expression of receptors and intracellular signaling, resulting in the release of pro-inflammatory mediators. The high-mobility box-1 protein (HMGB1) is released during neuropathic pain and its role in pain development consists of its interaction with receptors activating signaling pathways. Therefore, the present study investigated the role of HMGB1 in glial cells, RAGE, and TLR4 receptors, and MAPK p38 and NFkB signaling, as well as the involvement of these pathways in paclitaxel-induced neuropathic pain. For this, C57BL/6 and C57BL/6 TLR4^(-/-) male mice weighing between 20 and 25g were used. The von Frey filaments apparatus was used to assess the nociceptive threshold. For the induction of neuropathic pain, the chemotherapy agent paclitaxel was used, which was administered every other day for 6 days. Recombinant HMGB1 protein was administered i.t. to investigate its effect on the nociceptive threshold. The participation of RAGE and TLR4 receptors was investigated using the respective antagonists FPS-ZM1 and LPS-RS administered intrathecally. The participation of microglia, astrocytes, MAPK p38 and NFkB was evaluated using the inhibitors minocycline, fluorocitrate, SML0540, and PDTC, respectively, also by i.t. The Western blot assay was performed to assess the protein levels of HMGB1, RAGE, TLR4, Iba1, and GFAP and the Elisa assay to assess the levels of HMGB1, TNF- α , and IL1- β . The results indicate the participation of RAGE and TLR4 receptors, microglia, astrocytes, and MAPK p38 and NFkB signaling in both HMGB1-induced nociception and paclitaxel-induced neuropathic pain. It was also observed an increase in HMGB1 protein levels in the genesis of neuropathic pain, and the involvement of TLR4 receptors in microglial activation. Blockade of RAGE and TLR4 receptors led to a decrease in pro-inflammatory cytokines. These results indicate that HMGB1 released in the initial paclitaxel treatment activates RAGE and TLR4 receptors in

microglia, increasing levels of pro-inflammatory cytokines and contributing to neuropathic pain.

Keywords: HMGB1; glial cells; neuropathic pain;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da via ascendente e descendente da dor..	28
Figura 2 -	Kit com os diferentes filamentos utilizado no Teste de von Frey.....	40
Figura 3 -	Aparato para realização do teste de Von Frey.....	41
Figura 4 -	Modelo esquemático da periodicidade da administração de Paclitaxel/Veículo e avaliação do limiar nociceptivo	42
Figura 5 -	Esquema da periodicidade das administrações do paclitaxel/veículo seguida dos antagonistas e inibidores e avaliações do limiar nociceptivo.....	43
Figura 6 -	Esquema da periodicidade das avaliações do limiar nociceptivo e administração dos antagonistas e inibidores seguida da administração de HMGB1 recombinante.....	44
Figura 7 -	Delineamento experimental para o ensaio de dosagem de citocinas pró-inflamatórias pelo ensaio de ELISA.....	45
Figura 8 -	Delineamento experimental para o ensaio de Western Blot para marcações de Iba1 e GFAP.....	48
Figura 9 -	Delineamento experimental para o ensaio de Western Blot para marcações de HMGB1, RAGE e TLR4.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Nocicepção induzida por HMGB1 recombinante	50
Gráfico 2 -	Participação de RAGE na nocicepção induzida por HMGB1	52
Gráfico 3 -	Participação de TLR4 na nocicepção induzida por HMGB1	53
Gráfico 4 -	Participação de TLR4 utilizando animais TLR4(-/-) na nocicepção induzida por HMGB1	54
Gráfico 5 -	Participação da micróglia na nocicepção induzida por HMGB1	55
Gráfico 6 -	Participação dos astrócitos na nocicepção induzida por HMGB1	56
Gráfico 7 -	Sinalização da MAPK p38 na nocicepção induzida por HMGB1	57
Gráfico 8 -	Ativação do NFkB na nocicepção induzida por HMGB1	58
Gráfico 9 -	Avaliação do limiar nociceptivo na dor neuropática induzida por paclitaxel.....	59
Gráfico 10 -	Participação dos receptores RAGE na dor neuropática induzida por paclitaxel.	60
Gráfico 11 -	Participação dos receptores TLR4 na dor neuropática induzida por paclitaxel	61
Gráfico 12 -	Participação da micróglia na dor neuropática induzida por paclitaxel.....	62
Gráfico 13 -	Participação dos astrócitos na dor neuropática induzida por paclitaxel.....	63
Gráfico 14 -	Participação MAPK p38 na dor neuropática induzida por paclitaxel.....	64
Gráfico 15 -	Participação do NFkB na dor neuropática induzida por paclitaxel.....	65
Gráfico 16 (a-d) -	Avaliação dos níveis proteicos HMGB1 pelo ensaio de Western Blot.....	66

Gráfico 17 -	Dosagem dos níveis de HMGB1 pelo método de ELISA no 21° após o início da indução da dor neuropática	67
Gráfico 18 (a-b) -	Avaliação dos níveis proteicos RAGE pelo ensaio de Western Blot.....	68
Gráfico 19 (a-b) -	Avaliação dos níveis proteicos TLR4 pelo ensaio de Western Blot.....	68
Gráfico 20 (a-b) -	Avaliação dos níveis proteicos de Iba1 e GFAP pelo ensaio de Western Blot	69
Gráfico 21 (a-d) -	Participação dos receptores TLR4 e RAGE na liberação de TNF- α e IL-1 β na neuropatia induzida por paclitaxel	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Anticorpos utilizados para o ensaio de Western Blot e suas especificações	47
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca²⁺	Íon Cálcio
CDME	Corno dorsal da medula espinal
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DN	Dor neuropática
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HMGB1	Proteína de alta mobilidade grupo box 1
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBA1	Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase
jNK	Cinase N-terminal c-jun
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MB	Medida basal
Na⁺	Sódio
NFκB	Fator nuclear kappa B

NGF	Fator de crescimento do nervo
NPIQ	Neuropatia periférica induzida por quimioterapia
PAG	Periaquedotal grey matter
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
RAGE	Receptores de produtos glicação avançada
SNC	Sistema nervoso central
TIR	Toll/IL1- R
TLRs	Receptores do tipo Toll
TLR4	Receptores do tipo Toll 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral - alfa
XAMPs	Padrões moleculares associados aos xenobióticos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1	DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	26
2.2	DOR NEUROPÁTICA.....	29
2.3	CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA.....	30
2.4	DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA.....	31
2.5	HMGB1, RAGE E TLR4	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ANIMAIS.....	37
4.2	DROGAS.....	37
4.3	VIAS DE ADMINISTRAÇÃO	38
4.3.1	Via intraperitoneal	38
4.3.2	Via intratecal	38
4.4	MODELO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA.....	39
4.5	INDUÇÃO DA NOCICEPÇÃO PELA PROTEÍNA HMGB1 RECOMBINANTE.....	39
4.6	AVALIAÇÃO DO LIMAR NOCICEPTIVO MECÂNICO	39
4.8	DELINEAMENTO DOS ENSAIOS COMPORTAMENTAIS	41
4.7	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E DA LIBERAÇÃO DE HMGB1 DURANTE A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL	44

4.8	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELA ANÁLISE DE WESTERN BLOT	45
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS	50
5.1	PARTICIPAÇÃO ESPINAL DO HMGB1 NA NOCICEPÇÃO.....	50
5.2	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR HMGB1 RECOMBINANTE	51
5.3	PARTICIPAÇÃO DE MICRÓGLIA E ASTRÓCITOS ESPINAIS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR HMGB1	54
5.4	SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DE MAPK p38 E NFkB ESPINAIS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR HMGB1	56
5.5	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL	58
5.3	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL	59
5.2	ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DA GLIA NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL	61
5.5	PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MAPK p38 e NFkB NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL.....	63
5.5	ENVOLVIMENTO DO HMGB1 NA FASE INICIAL DA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL	65
5.5	INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS DE RAGE E TLR4 ESPINAIS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE AS CÉLULAS DA GLIA DURANTE A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL.....	67
5.4	ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DURANTE A NEUROPATIA	69
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A dor neuropática é conceituada como uma dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (SCHOLZ *et al.*, 2019). É um tipo de dor que pode resultar em alterações complexas em funções cerebrais cognitivas e emocionais além de estar associada a problemas de saúde em geral e diminuição da qualidade de vida e sono (COHEN; MAO, 2014).

As lesões ou disfunções no sistema somatossensorial fazem com que os sinais de dor sejam transmitidos erroneamente para diversos centros de dor. No caso da dor neuropática, ocorrem mudanças na função do nervo e na área ao seu redor. Na periferia, medula espinhal e cérebro, as vias sensoriais tornam-se hiper excitadas, contribuindo para que o estado de dor neuropática se torne crônico (CLARK *et al.*, 2013).

A dor neuropática induzida por quimioterapia é o principal efeito adverso de muitos agentes quimioterápicos e está relacionada à drástica diminuição da qualidade de vida dos pacientes e pode levar até mesmo à descontinuação do tratamento (FARQUHAR-SMITH ; BROWN, 2016). Estima-se que aproximadamente 68% dos pacientes que recebem quimioterapia apresentam sintomas como formigamento, parestesias, alodínia e hiperalgesia no primeiro mês de tratamento, cujo desenvolvimento está relacionado tanto a doses únicas como cumulativas (SERETNY *et al.*, 2014; STAROBOVA *et al.*, 2017).

Dentre os quimioterápicos relacionados à este tipo de dor, destaca-se o paclitaxel, que pertence à família dos taxanos e atua inibindo a desmontagem da tubulina do polímero de microtúbulos, mas também pode levar a processos imunomediados, perda de fibras periféricas, desmielinização e degeneração axonal, que contribuem para a neuropatia (STAROBOVA *et al.*, 2017).

Durante a dor neuropática induzida por quimioterapia ocorre o processo de neuroinflamação, com ativação de astrócitos espinais e o envolvimento significativo de micróglia (MAKKER *et al.*, 2017; MILLIGAN; WATKINS, 2009; ZIMMERMANN, 2001). As células da glia foram reconhecidas como moduladores da dor, uma vez que participam da amplificação das respostas dolorosas oriundas da lesão periférica que chegam até a medula espinhal e quando ativadas, essas células liberam mediadores como citocinas, quimiocinas e padrões moleculares associados ao dano, como o a

proteína de alta mobilidade do grupo box-1 (HMGB1), que contribuem para a sensibilização central e potencialização de descargas elétricas que geram hiperalgesia e alodinia (MILLIGAN;WATKINS, 2009; WATKINS;MAIER, 2003).

O HMGB1, é uma proteína nuclear de ligação ao DNA, que atua como cofator estrutural e regula as atividades transcricionais em células de mamíferos e pode ser secretada passivamente de células que estão morrendo, desempenhando papéis pró-inflamatórios como um dos padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou ativamente durante processos inflamatórios (SONG *et al.*, 2014).

Estudos demonstram o papel nociceptivo do HMGB1 em modelos de dor inflamatória, além de participar a nível periférico na dor neuropática induzida pelo paclitaxel (NISHIDA *et al.*, 2016). As maneiras que o HMGB1 pode contribuir para a patogênese da dor incluem a promoção da produção de citocinas, a quimiotaxia e proliferação e diferenciação de células imunes (LI, XIANGNAN *et al.*, 2016).

A síntese e a liberação de HMGB1 é aumentada quando há lesão nervosa, promovendo a atividade de diversos tipos de células, incluindo micróglia, astrócitos e neurônios, resultando em neurodegeneração (HM *et al.*, 2011; Y *et al.*, 2008). A nível periférico, HMGB1 liga-se aos receptores de produtos glicação avançada (RAGE), ativando vias de sinalização intracelular e à translocação do fator nuclear kappa B (NFkB), resultando na regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias (SONG *et al.*, 2014).

O receptor RAGE tem sua expressão aumentada durante a dor neuropática em gânglio da raiz dorsal, com conseqüente hiperalgesia mecânica, a qual está relacionada à sua ligação com o HMGB1, além do aumento da expressão proteica de interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e NFkB (LI, XIANGNAN *et al.*, 2016).

Além da ligação ao receptor RAGE, a literatura também aponta que o HMGB1 se liga aos receptores do tipo Toll 4 (TLR4). Esta ligação promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β em modelo de constrição do nervo ciático (ZHAO *et al.*, 2020).

Embora existam estudos que demonstraram o papel nociceptivo de HMGB1/RAGE e HMGB1/TLR4, nenhum estudo demonstrou a participação dos receptores RAGE E TLR4 ativados pelo HMGB1 em células da glia. Deste modo, o presente estudo visa investigar a participação desta via na dor neuropática induzida pelo paclitaxel. A dor neuropática induzida por quimioterápicos é um grave efeito

adverso e as abordagens analgésicas comuns são muitas vezes insatisfatórias apesar dos avanços crescentes sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes deste tipo de dor, fazendo com que seu desenvolvimento atualmente seja inevitável, levando até mesmo à cessação da terapia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A dor é um processo fisiológico adaptativo e protetor essencial para sobrevivência. Um exemplo de sua importância é o aumento de lesões a órgãos e tecidos em pacientes com insensibilidade congênita a dor (RINGKAMP *et al.*, 2018). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor pode ser conceituada como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos de tal lesão” (DESANTANA *et al.*, 2020; RAJA *et al.*, 2020). Ela é sempre uma experiência pessoal subjetiva influenciada por fatores biológicos, psicológicos e sociais, condicionada no decorrer de vivências (RAJA *et al.*, 2020).

A dor é um mecanismo complexo, a qual remete tanto à transdução do estímulo como ao processamento cognitivo e emocional, tendo como característica a subjetividade. Já o termo utilizado para designar a ativação fisiológica das vias neurais por estímulos que geram danos reais ou potenciais para que sejam evitados é denominado nocicepção (JULIUS;BASBAUM, 2001; SNEDDON, 2018).

Existem neurônios sensoriais periféricos dotados de terminações nervosas livres denominados nociceptores, os quais expressam diferentes receptores e canais iônicos que são ativados por estímulos térmicos, mecânicos e químicos nocivos (JULIUS; BASBAUM, 2001; LEE; NEUMEISTER, 2020). Os nociceptores possuem limiares de ativação específicos e quando ativados transformam o estímulo em sinais elétricos desencadeando potenciais de ação, processo denominado transdução, assim o estímulo é transmitido por meio de fibras aferentes até o corno dorsal da medula espinal (CDME), onde faz sinapse com neurônios de segunda ordem (SNEDDON, 2018).

As fibras aferentes primárias que transmitem o estímulo são divididas em três tipos de acordo com suas características anatômicas e funcionais, sendo elas: fibras do tipo A β , altamente mielinizadas e de grande diâmetro, que conduzem estímulos inócuos táteis. Fibras do tipo A δ , que possuem médio calibre e uma delgada camada

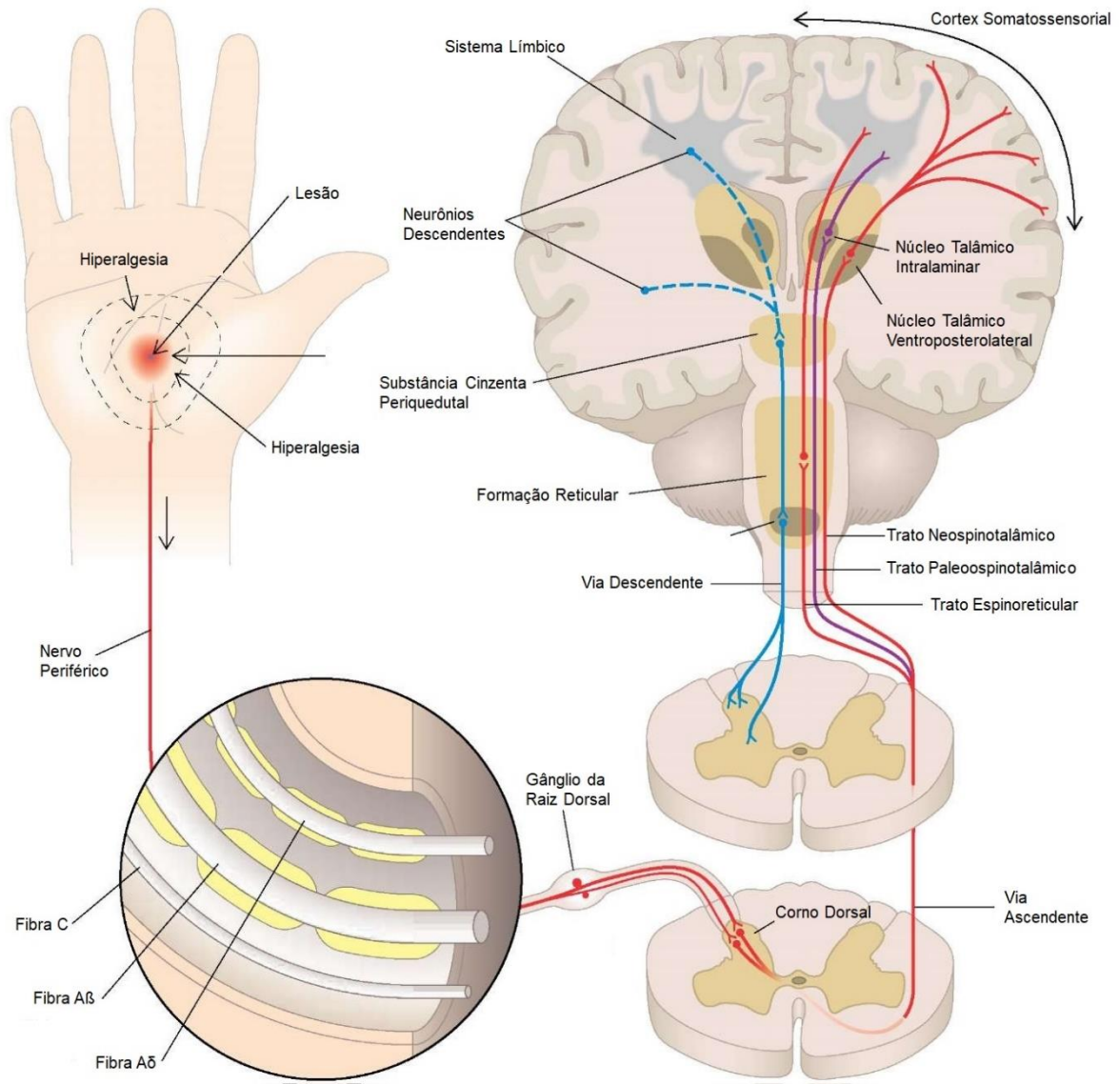
de bainha de mielina, transmitindo os impulsos térmicos e mecânicos de alta intensidade a uma velocidade de 30 m/s. Fibras do tipo C, com pequeno diâmetro e amielinizadas, conduzindo os impulsos mais lentamente, aproximadamente 2 m/s (ALMEIDA *et al.*, 2004; SNEDDON, 2018; YAM *et al.*, 2018). Além disso, as fibras C são consideradas polimodais, uma vez que respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, o que as diferencia da natureza mecanotérmica das fibras A δ (SNEDDON, 2018; WOOLF;MA, 2007; YAM *et al.*, 2018).

O estímulo é então transmitido por meio das fibras aferentes até os corpos celulares dos nociceptores localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD) e posteriormente as fibras A δ fazem sinapse com neurônios de segunda ordem nas lâminas I e V e as fibras C com os das lâminas I e II do (CDME), uma vez que liberam mediadores excitatórios como substância P e glutamato que sensibilizam os neurônios de segunda ordem (LEE; NEUMEISTER, 2020; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

A transmissão prossegue por meio dos neurônios de segunda ordem que decussam contralateralmente e conduzem o impulso pelo trato espinotalâmico lateral e medial até o tálamo, onde estão presentes neurônios de terceira ordem que se projetam para regiões corticais específicas que medeiam a interpretação da dor (ALMEIDA *et al.*, 2004; MILLIGAN;WATKINS, 2009).

A modulação da dor está relacionada à ativação dos receptores opioides presentes na medula espinal e substância cinzenta periaquedutal (PAG – do inglês, “*periaquedutal grey matter*”), ao sistema inibitório descendente, o qual atua via serotonina e norepinefrina, e a ativação de fibras mecânicas não nociceptivas chamadas A β , a qual suprime o sinal de dor e é chamada “teoria do portão”, postulada por Melzack e Wall em 1965 (LEE;NEUMEISTER, 2020; MELZACK;WALL, 1965). Na Figura 1, observa-se a representação da via fisiológica da dor:

Figura 1 - Representação da via ascendente e descendente da dor



Fonte: adaptado de http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp5F44_thumb.jpg

Diferente da dor aguda, a qual tem como objetivo afastar o indivíduo do dano para que haja recuperação, a excitação contínua dos neurônios nociceptivos tanto periféricos como centrais, resultam em dor crônica que pode ser do tipo neuropática, considerada patológica e que não leva a nenhum benefício ao paciente (CROFFORD, 2015; KUNER, 2010).

2.2 DOR NEUROPÁTICA

De acordo com a IASP, a dor neuropática (DN) é definida como “dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial” (SCHOLZ *et al.*, 2019). O conhecimento sobre os mecanismos ainda são incompletos, o que faz com que seja de difícil diagnóstico e os tratamentos disponíveis sejam limitados e ineficientes (COHEN;MAO, 2014; SCHOLZ *et al.*, 2019). A DN acomete cerca de 6,9% a 10% da população e dos pacientes portadores de dor crônica, acomete até 25%, sendo altamente relacionada à diminuição da qualidade de vida (Clark *et al.*, 2013; Van Hecke *et al.*, 2014).

A etiologia da dor neuropática pode ser decorrente de lesões diretas da medula espinal, ou secundária como em casos de infecções virais, diabetes mellitus, câncer e quimioterapia, levando a alterações complexas em funções cerebrais cognitivas (déficits no aprendizado e memória) e emocionais (ansiedade e depressão) (BREWER *et al.*, 2016; BUSHNELL *et al.*, 2013; SCHOLZ *et al.*, 2019).

Mecanismos periféricos e centrais estão relacionados ao desenvolvimento da DN, sendo que na periferia envolvem danos às fibras A δ e C que resultam em aumento da excitabilidade, danos axonais que geram descargas ectópicas devido à alteração na expressão de canais e, sinalização inapropriada nas sinapses no GRD (GRACE *et al.*, 2014). Já no sistema nervoso central (SNC), a sensibilização da via espinal e supraespinal ocorre devido ao aumento da expressão dos canais iônicos para sódio (Na⁺) e cálcio (Ca²⁺), ativação de células gliais e mudanças neuroplásticas ao longo das vias nociceptivas tanto na medula espinal quanto em várias regiões do cérebro, associadas a desequilíbrio entre mecanismos facilitatórios e inibitórios (COHEN;MAO, 2014; COLLOCA *et al.*, 2017; MEACHAM *et al.*, 2017; MORAES *et al.*, 2020; VICARIO *et al.*, 2020).

Diferente da dor nociceptiva, a qual ocorre devido a estimulações excessivas dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos, a dor neuropática é uma síndrome complexa resultante da lesão de fibras nervosas (COLLOCA *et al.*, 2017). Estímulos espontâneos, ou seja, não evocados, levam a sintomas como queimação e choque, além de estímulos evocados resultarem em hiperalgesia (aumento da sensibilidade a um estímulo nocivo), alodínia (dor devido a um estímulo

normalmente inócuo, como calçar uma meia), parestesia e coceira (GIERTHMÜHLEN; BARON, 2016; SMITH, 2018).

2.3 CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA

Durante o processo da DN ocorre uma amplificação das respostas oriundas da lesão periférica que chegam até a medula espinhal, onde é realizada a primeira sinapse nociceptiva. Esse fenômeno era considerado uma resposta puramente neuronal; no entanto, atualmente sabe-se que as células da glia, principalmente micróglia e astrócitos, também contribuem para a patologia da DN oriunda de diversas etiologias, como por exemplo a neuropatia induzida por quimioterapia (JI *et al.*, 2017; MILLIGAN; WATKINS, 2009; ZIMMERMANN, 2001).

As células da glia compreendem cerca de 70% das células do sistema SNC e superam o número de neurônios. São divididas em: astrócitos, micróglia residente, micróglia perivascular e oligodendrócitos; sendo que, micróglia e astrócitos têm sido as principais células envolvidas na modulação neuroimune da dor (JI *et al.*, 2013; MIKA *et al.*, 2013). Como parte do sistema imune inato, a micróglia tem função imune, com rápida ativação em resposta até mesmo à pequenas alterações do SNC (JI *et al.*, 2017). Em condições fisiológicas, a micróglia representa cerca de 5-20% de todas as células da glia e em condições patológicas, como a dor neuropática, são as primeiras a se tornarem ativas em casos de lesão do nervo e se proliferam contribuindo para a modulação neuronal (MIKA *et al.*, 2013).

Quando não está ativada, a micróglia tem morfologia ramificada, pouca ou nenhuma expressão de receptores e marcadores de superfície celular e atuam no desenvolvimento cerebral a partir de interações com as sinapses (COSTIGAN *et al.*, 2009; JI *et al.*, 2013). Em estado ativado, estas células sofrem alterações morfológicas, sendo elas: hipertrofia, proliferação, aumento de alguns marcadores de superfície celular, como a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (IBA1) e de receptores acompanhados pela ativação de proteínas cinases e consequente liberação de substâncias pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , e interleucina 6 (IL-6) que sensibilizam o neurônio de segunda ordem, favorecendo a alodínia e hiperalgesia durante a dor neuropática (MIKA *et al.*, 2013; WATKINS; MAIER, 2003).

Além da micróglia, os astrócitos são as células mais abundantes e tem como principal função o fornecimento de suporte aos neurônios, além da formação da barreira hematoencefálica, regulação da concentração de íons extracelulares e modulação da transmissão sináptica para promover homeostase (MIKA *et al.*, 2013; MILLIGAN;WATKINS, 2009). Quando ativados, sofrem hipertrofia, aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e também ativação da sinalização de vias intracelulares, como a da cinase regulada por sinal extracelular (ERK), cinase N-terminal c-jun (jNK), dentre outras, levando ao aumento da produção substâncias pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β a nível espinal, facilitando a sensibilização do neurônio de segunda ordem (JI *et al.*, 2019; MIKA *et al.*, 2013; MOLOFSKY e DENEEN, 2015).

2.4 DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA

Uma das principais causas de dor em pacientes com câncer é a neuropatia periférica induzida por quimioterapia (NPIQ), um efeito adverso de muitos agentes quimioterápicos que pode ocorrer desde uma única dose ou por doses cumulativas destes fármacos (TANAY *et al.*, 2017). Esse tipo de dor apresenta alta relevância clínica; uma vez que, as abordagens farmacológicas comuns são pouco efetivas para o seu tratamento, podendo gerar sua descontinuação (FARQUHAR-SMITH; BROWN, 2016; SAŁAT, 2020).

Sua prevalência tem aumentado devido ao aumento da incidência de câncer, com a melhor sobrevida e cura da doença. Pode ocorrer de forma aguda, cessando após o fim do tratamento ou de forma crônica e resistente podendo iniciar-se após o fim do tratamento (COLVIN, 2020). De modo geral, aproximadamente 68,1% dos pacientes que recebem quimioterapia desenvolvem NPIQ no primeiro mês de tratamento, 60% em três meses e 30% em 6 meses ou mais (BREWER *et al.*, 2016; SAŁAT, 2020).

Diferentes agentes quimioterápicos podem induzir a NPIQ, causando danos aos neurônios sensoriais periféricos e motores. Sintomas sensoriais geralmente desenvolvem-se primeiro nos pés e nas mãos (efeito “meia-luva”) por afetar grandes fibras mielinizadas primeiramente de axônios longos, mas as funções autonômica e

motora também podem ser afetadas e se manifestam como dormência, formigamento, parestesias e disestesias induzidas por toque, temperaturas quentes ou frias, além de alodínia, hiperalgesia e fraqueza na extremidade distal (STAROBOVA *et al.*, 2017).

Em relação aos mecanismos envolvidos em seu desenvolvimento, atualmente sabe-se que apoptose, remodelamento da membrana, mudanças nos canais iônicos dos neurônios, disfunções mitocondriais, bem como, mecanismos não neuronais que envolvem a ativação de células da glia ocorrem (COLVIN, 2020). A ativação glial durante esse tipo de lesão causada por quimioterápicos, aumenta a liberação de mediadores, como o fator de crescimento do nervo (do inglês *NGF*) e de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para uma sinalização celular anormal e resultam na interrupção do sistema de transporte axonal, levando à morte neuronal e desenvolvimento de neuropatia (FARQUHAR-SMITH; BROWN, 2016; SAŁAT, 2020; STAROBOVA *et al.*, 2017).

Muitos agentes quimioterápicos, como derivados de platina, taxanos, alcalóides da vinca, talidomida, epotilonas, eribulina, ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab e bortezomib estão relacionados à NPIQ e dentre a classe dos taxanos, destaca-se o paclitaxel (SAŁAT, 2020).

O paclitaxel, comercializado como TAXOL® (Bristol-Myers Squibb, EUA), é utilizado no tratamento de tumores sólidos como câncer de mama, pulmão e ovário (STAROBOVA *et al.*, 2017). Estudos mostram que a neuropatia periférica causada pelo paclitaxel ocorre em cerca de 60%-70% dos pacientes que o utilizam de forma dose e tempo dependentes e que seus efeitos são agudos, iniciando-se aproximadamente após 3 dias da infusão do fármaco (SAŁAT, 2020). Este fármaco atua como estabilizador dos microtúbulos celulares, ligando-se ao lúmen dessas estruturas, interrompendo o ciclo de mitose celular, o que resulta em morte das células por apoptose (KNUTIE *et al.*, 2020). Os neurônios são suscetíveis a este mecanismo de ação, mesmo que o intuito do fármaco seja atingir somente células cancerosas e estudos "*in vitro*" e "*in vivo*" demonstraram alterações nos microtúbulos axonais de neurônios sensoriais interagindo com células da glia; bem como, alterações na regulação de Ca^{2+} intracelular, função mitocondrial e liberação de mediadores pró-inflamatórios (SAŁAT, 2020; STAROBOVA *et al.*, 2017; TOMA *et al.*, 2017).

2.5 HMGB1, RAGE E TLR4

Quando ocorre lesão de nervos, diversos mediadores pró-inflamatórios são liberados e desempenham papel central na patogênese da dor crônica. Dentre os mediadores liberados destacam-se os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), os quais contribuem para este processo ligando-se a receptores presentes nas células imunes e desencadeando cascatas de sinalização intracelular que resultam na liberação de citocinas e outros mediadores (WILSON, 2015).

Um dos DAMPs associados ao processo inflamatório é a HMGB1, uma proteína nuclear de ligação ao DNA, que atua como cofator estrutural e regula as atividades transcricionais e expressão gênica em células de mamíferos. Primeiramente, foi associado à membrana por regular o crescimento de neuritos durante o desenvolvimento e atualmente sabe-se que ele tem um papel crucial em respostas inflamatórias durante a lesão tecidual e contribui para a dor neuropática (WILSON, 2015; YANG;ZENG e SILVERMAN;GUNASEKARAN;GEORGE, 2021). O HMGB1, pode ser secretado passivamente por células em necrose e também ativamente por células como macrófagos, células endoteliais e células da glia (NISHIDA *et al.*, 2016; WILSON, 2015; YANG;ZENG e SILVERMAN; GUNASEKARAN;GEORGE, 2021).

Estudos têm demonstrado o papel nociceptivo do HMGB1 em modelos de dor inflamatória, além de seus mecanismos periféricos na dor neuropática induzida pelo paclitaxel (NISHIDA *et al.*, 2016). Os mecanismos que a HMGB1 pode contribuir para a patogênese da dor incluem a ligação aos receptores RAGE e aos receptores do tipo Toll 2, 4 e 9 (TLRs), além da promoção da produção de citocinas e do recrutamento de células imunes. Porém, essa participação ainda não foi demonstrada em células da glia durante a dor neuropática induzida por paclitaxel (AGALAVE;SVENSSON, 2014).

Dentre os receptores para a HMGB1, incluem os receptores para produtos de glicação avançada (RAGE, do inglês, *receptor of advanced glycation end-products*), que são ligados à membrana e pertencem aos membros da superfamília de imunoglobulinas (SONG *et al.*, 2014). Uma vez ativados, uma cascata de sinalização intracelular é iniciada, como das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e do NFkB, que leva à geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e à

regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias. O RAGE atua como um receptor de reconhecimento de padrões e participa da resposta imune inata (LI, Xiangnan *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2014). Em um modelo de dor neuropática, um estudo demonstrou um aumento da expressão deste receptor em GRD com consequente hiperalgesia mecânica, além do aumento da expressão proteica de IL-1 β , TNF- α e NF κ B (LI, XIANGNAN *et al.*, 2016).

Por meio da ligação ao RAGE, o HMGB1 acelera e contribui para as suas respostas, podendo regular a produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ), IL-6, TNF- α e IL-1 β em monócitos e macrófagos (WILSON, 2015). Além disso, a interação entre RAGE e HMGB1 regula a produção de quimiocinas para ativar células do sistema imunológico, como monócitos e células dendríticas, ativando diversas vias de sinalização, como as vias JNK e ativação do NF κ B, durante a inflamação (LI, XIANGNAN *et al.*, 2016). Os estudos demonstram que a síntese e a liberação de HMGB1 é aumentada quando há lesão nervosa a nível periférico resultando em sintomas de dor neuropática, porém a nível central ainda não foi avaliado. Além disso, os receptores RAGE estão relacionados à dor neuropática, uma vez que estão suprarregulados durante este processo e sua ligação com HMGB1 está relacionada à alodinia mecânica (NISHIDA *et al.*, 2016).

Além dos receptores RAGE, os receptores TLR4 também são ativados durante a dor neuropática (ZHAO *et al.*, 2020). Estes receptores são classificados como receptores de reconhecimento de padrões transmembrana e possuem papel fundamental no reconhecimento bacteriano, em respostas inflamatórias e lesão tecidual, sendo ativados por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), padrões moleculares associados aos xenobióticos (XAMPs) e DAMPs (AKIRA;TAKEDA, 2004).

O TLR4 participa da primeira linha de defesa da resposta imune inata. Sua estrutura consiste em um domínio extracelular com repetições ricas em leucina, um domínio transmembranar composto de uma hélice e um domínio extracelular Toll/IL1-R (TIR). A porção extracelular TIR recruta moléculas adaptadoras como a MyD88 para iniciar cascatas que resultarão na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. São expressos em células imunes e células da glia (AKIRA;TAKEDA, 2004; ZHAO *et al.*, 2020).

A ligação do HMGB1 ao TLR4 leva a liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β por meio do NF κ B e estudos apontam que a ativação de TLR4 na micróglia espinal leva à nocicepção em ratos com lesão do nervo ciático e a deleção do gene para este receptor diminui a ativação glial e liberação de citocinas pró-inflamatórias, consequentemente diminuindo a nocicepção (ZHAO *et al.*, 2020). Na dor neuropática induzida por quimioterapia, o TLR4 tem sua expressão aumentada em células da glia, bem como a ativação de cascatas intracelulares de MAPK e ERK, porém um estudo demonstrou que a administração do antagonista para TLR4 reverte este efeito, reforçando seu papel na gênese da dor neuropática induzida por quimioterapia (LI *et al.*, 2015).

Deste modo, o objetivo do presente estudo é investigar a participação dos receptores RAGE e TLR4 ativados por HMGB1 em células da glia a nível espinal durante a dor neuropática induzida pelo paclitaxel, uma vez que sua participação ainda não foi demonstrada a nível espinal e a participação das células da glia neste processo ainda não está clara.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a envolvimento do HMGB1 na ativação dos receptores RAGE e TLR4 em células da glia espinais na dor neuropática induzida pelo paclitaxel.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a participação espinal dos receptores RAGE e TLR4 na nocicepção induzida por HMGB1 e na dor neuropática induzida pelo paclitaxel;
- b) Avaliar a participação espinal das células da glia na nocicepção induzida por HMGB1 e na dor neuropática induzida pelo paclitaxel;
- c) Avaliar o envolvimento da MAPK p38 e do NFkB durante a dor neuropática induzida por paclitaxel e na nocicepção induzida por HMGB1;
- d) Avaliar o envolvimento dos receptores RAGE e TLR4 na produção espinal de citocinas pró-inflamatórias durante a dor neuropática induzida por paclitaxel;
- e) Avaliar a liberação de HMGB1 na dor neuropática induzida por paclitaxel;
- f) Avaliar os níveis proteicos de HMGB1, RAGE e TLR4 na dor neuropática induzida por paclitaxel;
- g) Avaliar a participação dos receptores RAGE e TLR4 nos níveis proteicos de Iba1 e GFAP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 e C57BL/6 geneticamente modificados, deficientes para o receptor TLR4. Ambos os animais tinham idade média de 7 semanas, pesando entre 20 e 25 g, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), respectivamente. Os animais foram alocados sob condições controladas de temperatura ($22,1 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$), de ciclo claro/escuro (12h/12h), de umidade relativa do ar a 65% e com livre acesso a ração e água até o início de cada experimento. Ao longo dos experimentos os animais foram alojados em caixas de polipropileno, sendo 6 animais por caixa mantidas dentro de uma estante ventilada (Alesco, BR). Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação, recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL (CEUA). O projeto foi aprovado pelo CEUA sob o número de protocolo 52/2018.

4.2 DROGAS

- **Paclitaxel** (Cayman Chemical Company/EUA): agente quimioterápico, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 5 mg/mL e em solução salina estéril (0,9%) e administrado por via intraperitoneal (*i.p.*) na dose de 1 mg/kg (SEKIGUCHI *et al.*, 2018).

- **FPS-ZM1** (Cayman Chemical Company/EUA): antagonista para os receptores RAGE, diluído em DMSO e em solução salina estéril (0,9%) e administrado por via intratecal (*i.t.*) nas doses 25 µg, 50 µg e 100 µg (ZHANG, 2017).

- **LPS-RS** (Invivogen/EUA): antagonista para o TLR4, diluído em solução salina estéril (0,9%) e administrado por via *i.t.* nas doses 0,5 µg e 1 µg (ELISEI *et al.*, 2020)

- **Minociclina** (Sigma-Aldrich/EUA): inibidor seletivo de micrógliã, diluída em solução salina estéril (0,9 %) e administrada por via *i.t.* nas doses 5 µg e 10 µg (CHEN *et al.*, 2018).

- **Fluorocitrato** (Invivogen/EUA): inibidor de astrócitos, diluído em solução salina estéril (0,9 %) e administrado por via *i.t.* nas doses 150 pmol e 300 pmol (ELISEI *et al.*, 2020).

- **SML0543** (Sigma-Aldrich/EUA): inibidor da via MAPK p38 diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 5 mg/mL e em solução salina estéril (0,9 %) e administrado por via *i.t.* nas doses 1,5 nmol e 3 nmol (WU *et al.*, 2006)

- **PDTC** (Sigma-Aldrich/EUA): inibidor de NFκB, diluído em salina estéril (0,9 %) nas doses 30 µg e 60 µg e administrado por via *i.t.* (BORGHI *et al.*, 2022).

- **Proteína HMGB1 recombinante** (Sigma-Aldrich/EUA): diluída em solução salina estéril (0,9%) e administrada por via *i.t.* nas doses 50 ng e 100 ng (MORIOKA, 2019) .

4.3 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

4.3.1 Via Intraperitoneal

As injeções intraperitoneais foram realizadas no quadrante inferior esquerdo anterior do abdome do animal. O animal foi contido pelo experimentador na região do dorso e a substância foi injetada em um volume de 10 mL/Kg na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais.

4.3.2 Via Intratecal

Antes das injeções *i.t.*, os animais foram anestesiados com isoflurano (2%) (Cristália/BR) e O₂ (2 L / min). Em seguida, a região lombar foi tricotomizada e foi feita a assepsia com álcool 70%. Os animais foram posicionados em decúbito ventral para facilitar a palpação dos espaços intervertebrais L4-L5. A injeção *i.t.* foi realizada nesse espaço intervertebral para acesso da região subaracnóide usando uma agulha de 13 x 0,3 mm e volume de 5 µL. O movimento da cauda foi considerado indicativo da administração correta (HYLDEN e WILCOX, 1980). Para a padronização da técnica, a solução de lidocaína 2% (Densply Pharmaceutical/EUA) foi administrada *i.t.* a um grupo de animais de teste, admitindo a paralisia temporária dos membros posteriores como ponto final para confirmar a eficácia da técnica de injeção (HYLDEN; WILCOX, 1980).

4.4 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA

Para indução do modelo de dor neuropática induzida por quimioterapia, foi utilizado o fármaco paclitaxel, administrado por via *i.p.* em dias alternados na dose 1 mg/kg. Ao todo foram 4 injeções com uma dose final cumulativa de 4 mg/kg, de acordo com o protocolo experimental descrito na Figura 4. Os animais do grupo controle receberam veículo do paclitaxel (SEKIGUCHI *et al.*, 2018). Os animais que receberam paclitaxel serão nomeados como DN (dor neuropática) e os que receberam veículo serão nomeados controle.

4.5 INDUÇÃO DA NOCICEPÇÃO PELA PROTEÍNA HMGB1 RECOMBINANTE

Com o intuito de verificar o envolvimento espinal da HMGB1 na indução de nocicepção e investigar os mecanismos envolvidos nesse processo, a proteína HMGB1 recombinante foi administrada por via *i.t.* nas doses de 50 ng e 100 ng e os animais controle receberam o respectivo veículo (n=6) (MORIOKA, 2019).

4.6 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

Os experimentos para a avaliação comportamental do limiar nociceptivo foram efetuados dentro do ciclo circadiano dos animais, respeitando o ciclo claro, dentre o período de 7:00 horas da manhã e 18:00 horas da tarde. Primeiramente, os animais foram colocados em caixas individuais de vidro sobre uma grade de metal que dá acesso a pata e mantidos por 30 minutos para a aclimação ao ambiente para que então fosse dado início ao experimento. A avaliação do limiar foi feita por meio do aparato von Frey filamentos (Anesthesio/EUA), o qual considera uma resposta referente à alodinia mecânica o momento em que o camundongo retira e/ou lambe e/ou agita a pata avaliada. O kit contém vários filamentos de diferentes espessuras, nas qual cada espessura corresponde à uma pressão em gramas aplicada pelo experimentador na pata do animal. Os filamentos utilizados durante o nosso teste foram os seguintes: 0,16 g, 0,4 g, 0,6 g, 1 g, 1,4 g e 2 g. Esses filamentos foram aplicados perpendicularmente à superfície plantar da pata traseira direita do animal, iniciando-se pelo filamento de menor espessura. Três medições, intervaladas em no

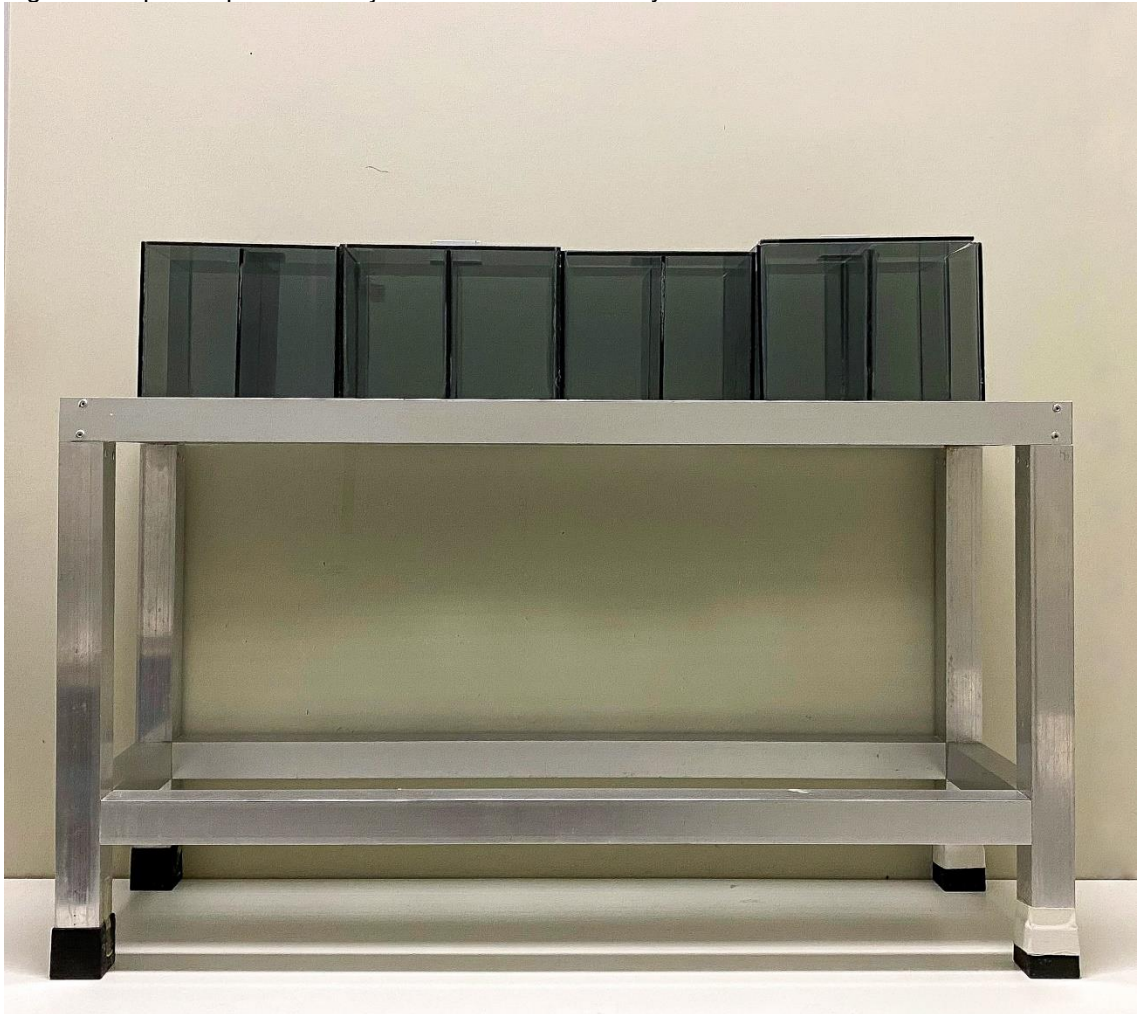
mínimo três minutos cada foram realizadas e a média dos valores (em gramas de cada filamento no momento da resposta) foi considerada como o valor do limiar nociceptivo mecânico (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Kit com os diferentes filamentos utilizado no Teste de von Frey



Fonte: da autora.

Figura 3 - Aparato para realização do teste de Von Frey

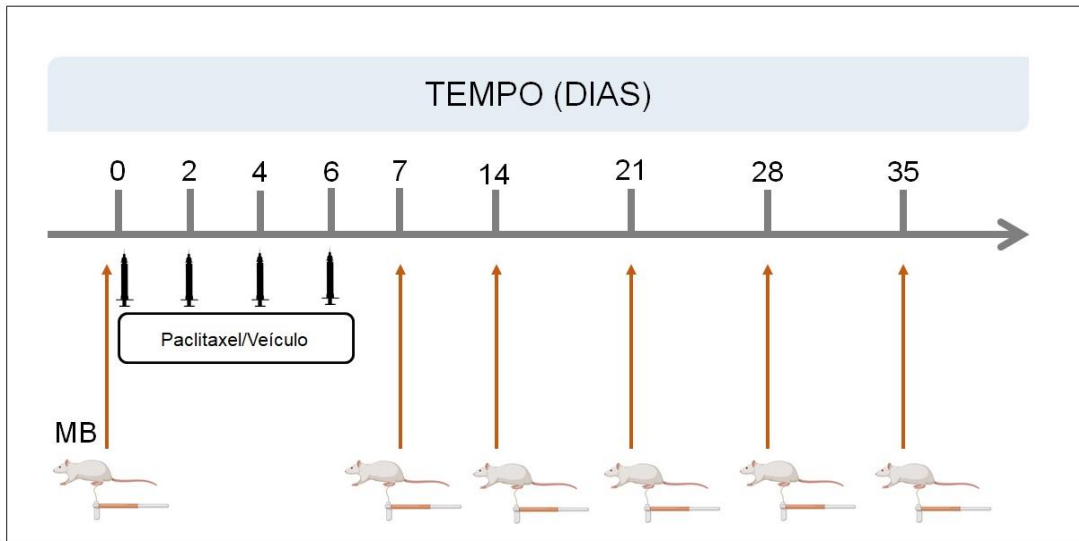


Fonte: da autora.

4.8 DELINEAMENTO DOS ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Para avaliar o efeito do tratamento com paclitaxel, foi feita a avaliação da medida basal (MB) do limiar nociceptivo no dia 0. Os animais foram tratados com o respectivo quimioterápico ou seu veículo *via i.p.* em dias alternados (dias 0, 2, 4 e 6), recebendo 4 injeções (n=6) e novas medidas do limiar nociceptivo foram realizadas nos dias 7, 14, 21, 28 e 35, conforme indicado na Figura 4.

Figura 4 - Modelo esquemático da periodicidade da administração de Paclitaxel/Veículo e avaliação do limiar nociceptivo

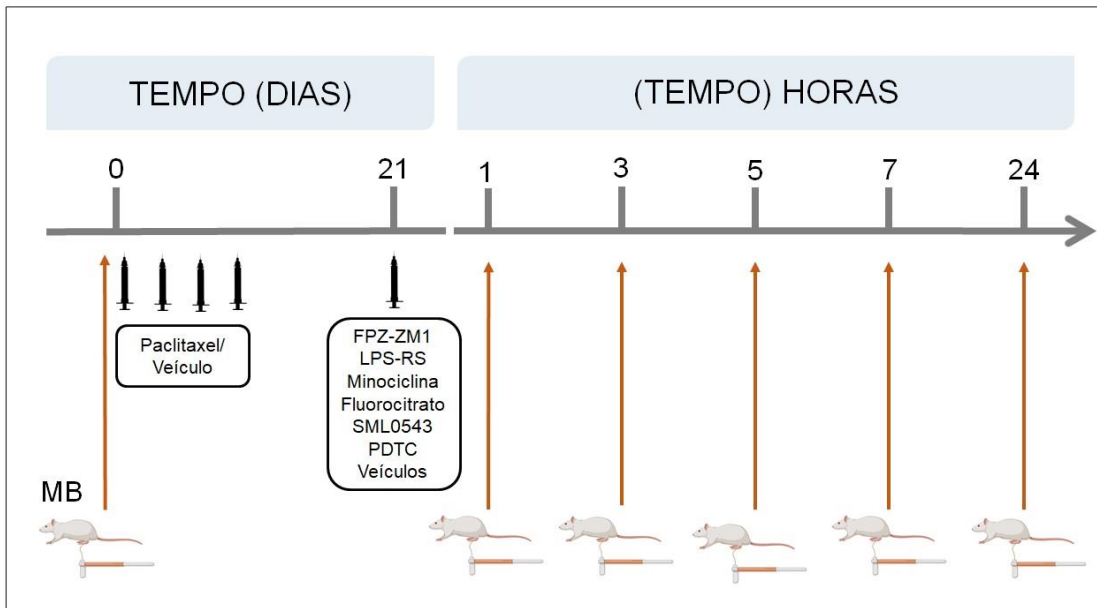


Fonte: da autora.

Nota: As setas laranja indicam os dias de avaliação pelo método de Von frey filamentos.

Após avaliar o efeito nociceptivo do paclitaxel, foi investigada a participação dos receptores RAGE e TLR4 por meio da administração *i.t.* dos antagonistas FPS-ZM1 nas doses 25 µg, 50 µg e 100 µg e LPS-RS nas doses 0,5 µg e 1 µg, respectivamente. Além disso, o envolvimento das células da glia, da via de sinalização intracelular MAPK p38 e do NFκB foram investigadas por meio de inibidores específicos, sendo eles: minociclina (inibidor de micróglia) nas doses 5 µg e 10 µg, fluorocitrato (inibidor de astrócitos) nas doses 150 pmol e 300 pmol e SML0543 (inibidor da via MAPK p38) nas doses 1,5 nmol e 3 nmol e o PDTC (inibidor de NFκB), nas doses de 30 µg e 60 µg. Todos os antagonistas e inibidores foram administrados por via *i.t* no 21º dia após o início do tratamento com paclitaxel ou seu respectivo veículo e o limiar nociceptivo foi avaliado antes de qualquer injeção para obtenção da MB e após 1, 3, 5, 7 e 24 horas dos tratamentos (FIGURA 5). Os experimentos ocorreram de maneira independente, ou seja, para cada grupo de tratamento foram utilizados animais diferentes.

Figura 5 - Esquema da periodicidade das administrações do paclitaxel/veículo seguida dos antagonistas e inibidores e avaliações do limiar nociceptivo



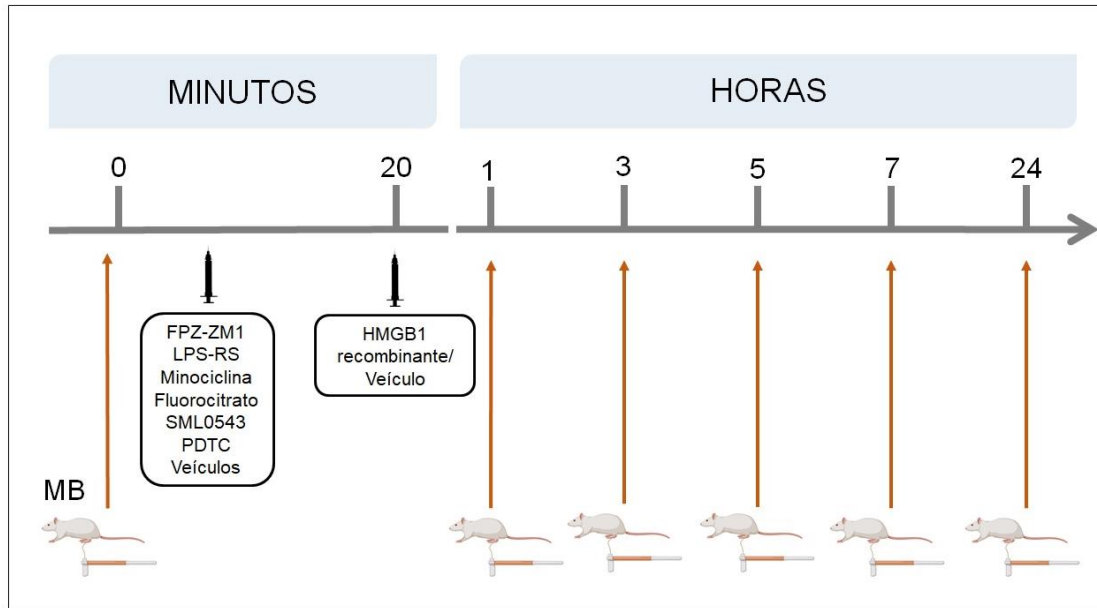
Fonte: da autora.

Nota: As setas laranja indicam os dias de avaliação pelo método de Von frey filamentos.

Para a avaliação da nocicepção induzida pela proteína HMGB1 recombinante, os animais primeiramente passaram por uma avaliação do limiar nociceptivo basal e logo em seguida receberam o HMGB1 via *i.t.* nas doses 50 ng e 100 ng ou seu veículo e então o limiar nociceptivo foi avaliado na 1^o, 3^o, 5^o e 24^o hora de acordo com a Figura 6.

A participação dos receptores RAGE e TLR4, das células da glia, MAPK p38 e NFkB também foram investigadas na nocicepção induzida por HMGB1. Para isso, foram injetados os respectivos antagonistas e inibidores na menor dose efetiva de acordo com as curvas dose-resposta estabelecidas no modelo de nocicepção por paclitaxel e após 20 minutos foi administrada a HMGB1 recombinante na dose de 50 ng, todos por via *i.t.* O teste de von Frey foi feito antes das injeções e após 1, 3, 5, 7 e 24 horas (FIGURA 6).

Figura 6 - Esquema da periodicidade das avaliações do limiar nociceptivo e administração dos antagonistas e inibidores seguida da administração de HMGB1 recombinante



Fonte: da autora.

Nota: As setas laranja indicam os dias de avaliação pelo método de Von frey filamentos.

4.7 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E DA LIBERAÇÃO DE HMGB1 DURANTE A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

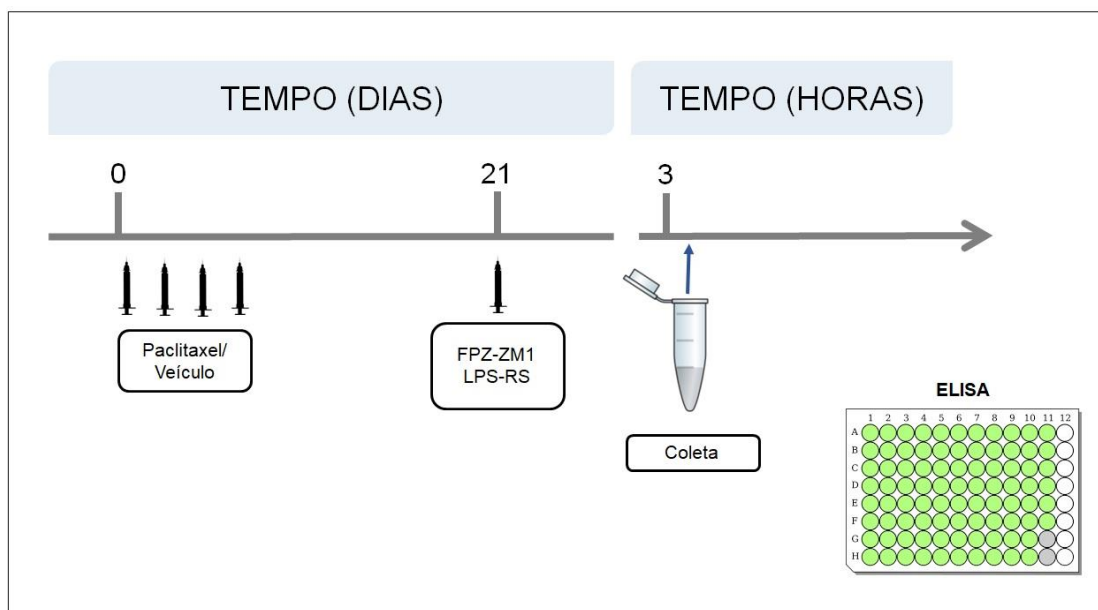
Para avaliar a participação espinal dos receptores RAGE e TLR4 na produção das citocinas IL-1 β , TNF- α e a liberação de HMGB1 durante a dor neuropática induzida por paclitaxel, foi realizado o ensaio de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Para verificar a produção das citocinas, imediatamente após último dia do experimento, após 3 horas da administração dos antagonistas, os segmentos L4 a L6 da medula espinal de cada grupo de animais (n=6) tratados com paclitaxel (DN), veículo (controle), paclitaxel+FPS-ZM1 (DN+FPS-ZM1) e paclitaxel+LPS-RS (DN+LPS-RS) foram removidos e posteriormente colocados em microtubos contendo uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M (pH=7.4). A avaliação da liberação de HMGB1 foi realizada em dois grupos (n=6), sendo eles: animais que receberam paclitaxel (DN) e animais que receberam veículo (controle) e a coleta dos tecidos foi realizada no 21º dia. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados e o homogenato foi centrifugado a 3,000rpm por 10 minutos em uma temperatura de 4°C e então os

sobrenadantes foram retirados e armazenados em criotubos em um biofreezer a uma temperatura de -80°C até o momento da análise.

No dia da análise, os níveis espinais de IL- 1β , TNF- α e HMGB1 foram dosados por meio de kits específicos (Peprotech/EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise, microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura *overnight* e posteriormente tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com solução de albumina bovina por 2 horas. Após lavagem, as amostras ou padrões foram incubadas com o anticorpo de detecção, com a solução de avidina-peroxidase e posteriormente adicionada uma solução cromogênica para as leituras das reações colorimétricas, as quais foram realizadas a 405nm de comprimento em um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Os cálculos foram realizados a partir da curva padrão para determinação das concentrações das amostras. O modelo esquemático do delineamento do ensaio segue na Figura 7.

Figura 7 - Delineamento experimental para o ensaio de dosagem de citocinas pró-inflamatórias pelo ensaio de ELISA



Fonte: da autora.

Nota: FPS-ZM1: antagonista para o receptor RAGE; LPS-RS: antagonista para o receptor TLR4.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELA ANÁLISE DE WESTERN BLOT

A técnica de Western Blot foi utilizada para avaliação dos níveis proteicos de HMGB1, dos marcadores de ativação de micróglia e astrócitos, Iba1 e GFAP respectivamente, e dos receptores RAGE E TLR4.

A avaliação dos níveis de HMGB1, RAGE e TLR4 foram efetuadas a partir do tecido medular lombar (segmentos L4-L6) para os grupos paclitaxel (DN) e veículo (controle), para os dias 1, 7, 14 e 21 para HMGB1 e 14 e 21 para RAGE e TLR4. Já para Iba1 e GFAP, as análises foram conduzidas para os grupos paclitaxel (DN), veículo (controle), paclitaxel+FPS-ZM1 (DN+FPS-ZM1) e paclitaxel+LPS-RS (DN+LPS-RS) no 21º dia com coletas após a 3ª hora da administração dos antagonistas nas doses 100 µg para FPS-ZM1 e, 1 µg para LPS-RS.

Para a coleta dos segmentos medulares, os animais foram eutanasiados, os tecidos retirados e armazenados em biofreezer a -80°C até o dia do experimento. Os tecidos foram processados em homogeneizador específico de tecidos em solução contendo tampão RIPA (do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*) associado à inibidores de protease (10%) e fosfatase (1%) (Sigma-Aldrich/EUA). Foi utilizada a proporção de aproximadamente de 0,04 g de tecido medular (região L4/L6) para 200 µl de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e 4°C e o sobrenadantes armazenados em biofreezer a -80°C para posterior utilização.

Foi feita a dosagem de proteínas pelo método de Bradford para posterior diluição das amostras afim de alcançar 30 µg de proteína cada. Posteriormente, as amostras foram então diluídas em tampão de amostra (4X TRIS HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 10% β-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) e fervidas em banho seco a 95°C por 5 minutos. Para o gel de separação, foi utilizado poliacrilamida em concentração de 10% e a eletroforese foi conduzida por meio do aparato Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-rad/ EUA) com corrente de 80 V para a passagem das proteínas no gel de entrada e 120 V no gel de corrida. Após a conclusão da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore/EUA) com poro de 0,45 µm de diâmetro, por meio do sistema Trans-Blot Turbo (Bio-rad/EUA). A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em solução TBS-Tween (TBS-T) até que a solução Ponceau fosse totalmente eliminada e colocada em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado), por 2

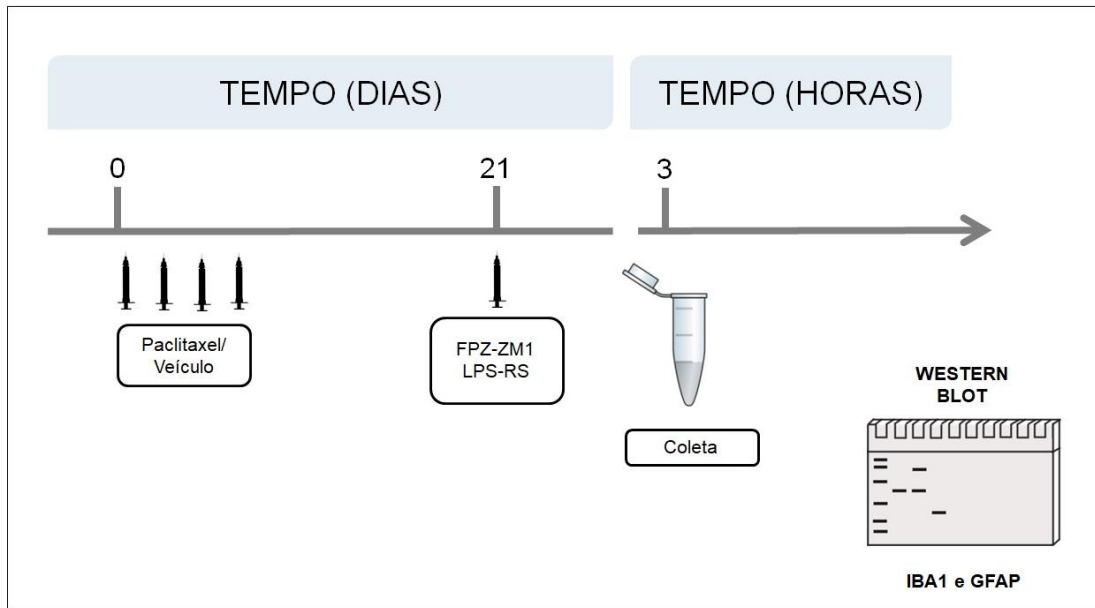
horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T por cinco minutos (por cinco vezes) e incubada durante a noite com o anticorpo primário específico. No dia seguinte, ela foi lavada com TBS-T por 5 minutos (por 5 vezes) e incubada com o respectivo anticorpo secundário por 2 horas. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (cinco minutos por cinco vezes). Então, as bandas proteicas de interesse, foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio do kit ECL Clarity (Bio-rad/EUA), de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade e analisadas pelo software ImageLab (Bio-rad/EUA). A Tabela 1 contém as informações dos anticorpos utilizados e suas especificações e os modelos esquemáticos de delineamento estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para o ensaio de Western Blot e suas especificações

AB PRIMÁRIO					AB Secundário		
Código	Marca	Alvo	Diluição	Peso molecular	Código	Marca	Diluição
016-200001	Wako	Iba-1	1:500	17 kDa	sc-2004 anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich	1:2000
PA1239	Boster	GFAP	1:500	49 kDa	A9044 anti-mouse IgG-HRP	Sigma-Aldrich	1:2000
D8L5W	Cell Signalling	TLR4	1:400	100 kDa	sc-2004 anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich	1:2000
sc-80652	Santa Cruz	RAGE	1:500	46 kDa	A9044 anti-mouse IgG-HRP	Sigma-Aldrich	1:2000
11512	Cayman	HMGB1	1:500	31 kDa	A9044 anti-mouse IgG-HRP	Sigma-Aldrich	1:2000
A2228	Sigma-Aldrich	β -actina	1:5000	41 kDa	A9044 anti-mouse IgG-HRP	Sigma-Aldrich	1:2000

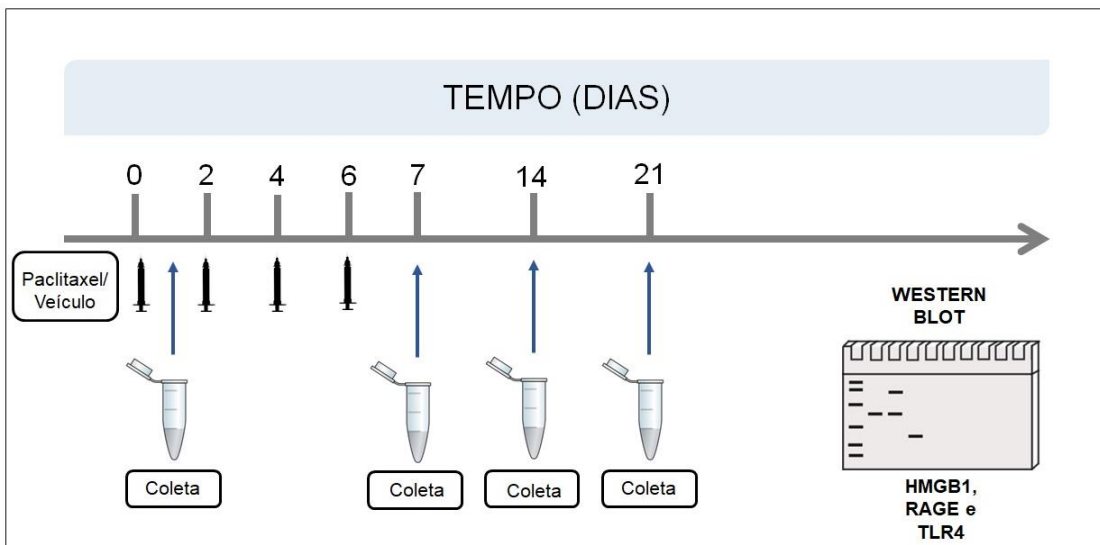
Fonte: da autora.

Figura 8 - Delineamento experimental para o ensaio de Western Blot para marcações de Iba1 e GFAP



Fonte: da autora.

Figura 9 - Delineamento experimental para o ensaio de Western Blot para marcações de HMGB1, RAGE e TLR4



Fonte: da autora.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como a média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA) para os testes comportamentais e análise de variância de uma via (ANOVA) e teste t *student* para o ensaio de ELISA e Western Blot. As análises foram

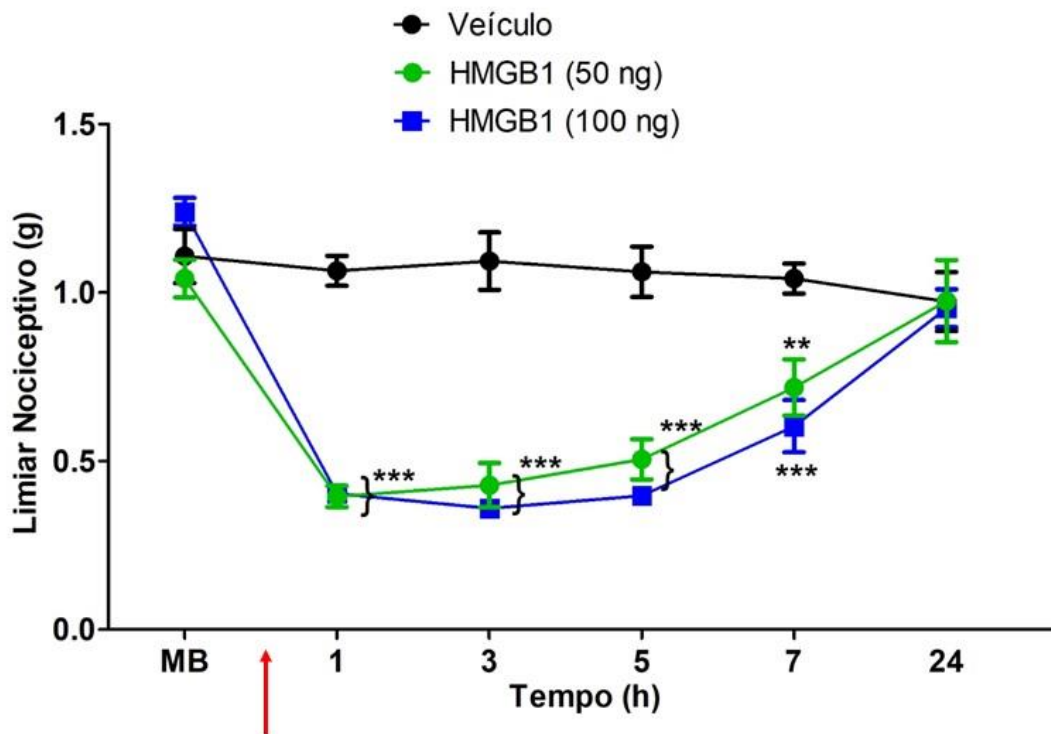
seguidas pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas e elaboração de figuras foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad/EUA).

5 RESULTADOS

5.1 PARTICIPAÇÃO ESPINAL DO HMGB1 NA NOCICEPÇÃO

O HMGB1 é uma proteína presente no núcleo das células com funções estruturais, porém quando liberado para o meio extracelular tem relação com o desenvolvimento da nocicepção por desempenhar papel pró-inflamatório (NISHIDA *et al.*, 2016). Sendo assim, inicialmente foi avaliado o efeito da administração intratecal da proteína HMGB1 recombinante em duas diferentes doses (50 e 100 ng). Os resultados apresentados no Gráfico 1 indicam que a proteína recombinante promoveu uma redução significativa do limiar nociceptivo mecânico na 1^o, 3^o, 5^o ($p < 0,001$; $f_{2,15} = 11,20$) e 7^o hora ($p < 0,01$; $f_{2,15} = 11,20$) para a dose de 50 ng e da 1^o a 7^o hora ($p < 0,001$; $f_{2,15} = 11,20$) para a dose de 100 ng em comparação com o grupo que recebeu apenas o veículo.

Gráfico 1 - Nocicepção induzida por HMGB1 recombinante



Fonte: da autora

Fonte: da autora.

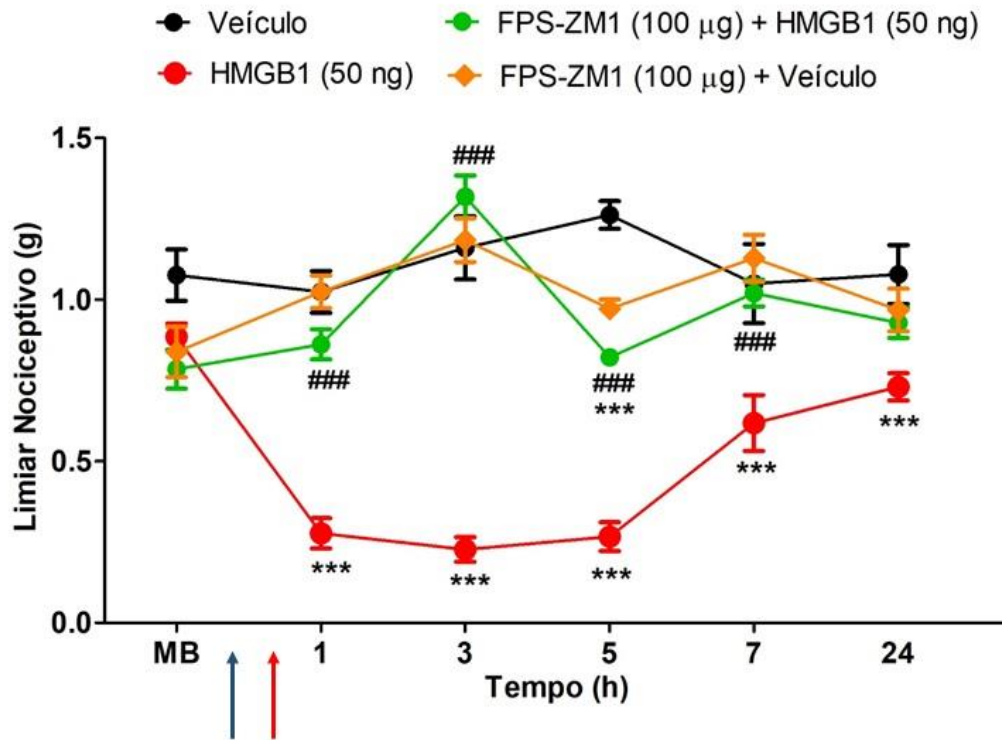
Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Veículo; $n=6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em vermelho indica o momento da injeção intratecal da proteína recombinante ou veículo.

5.2 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR HMGB1 RECOMBINANTE

Quando liberado para o meio extracelular, o HMGB1 liga-se a receptores e desempenha papel pró-inflamatório. De acordo com a literatura, os principais receptores os quais o HMGB1 se liga são RAGE e TLR4. Sendo assim, observamos que estes receptores participam da nocicepção induzida pela proteína HMGB1 recombinante por meio da administração *i.t.* de seus respectivos antagonistas, seguida da administração da proteína recombinante (50 ng).

A participação do RAGE pode ser observada no Gráfico 2, na qual a administração de seu antagonista FPS-ZM1 (100 μ g) reverteu a nocicepção da 1° à 7° hora ($p < 0,001$; $f_{3,18} = 15,78$). Além disso, um similar efeito foi encontrado pelo antagonista para os TLR4, LPS-RS (1 μ g), o qual promoveu um significativo aumento do limiar nociceptivo após a 1°, 3° ($p < 0,001$; $f_{3,18} = 8,29$) e 5° hora ($p < 0,01$; $f_{3,18} = 8,29$) após sua administração (GRÁFICO 3). Animais TLR4^{-/-} receberam a injeção intratecal da proteína recombinante. Os animais WT + HMGB1 apresentaram redução significativa do limiar nociceptivo da 1° à 7° hora ($p < 0,001$; $f_{3,18} = 12,30$) em relação ao grupo WT veículo, enquanto o grupo TLR4^{-/-} + HMGB1 não apresentou redução do limiar nociceptivo em nenhum dos tempos avaliados (GRÁFICO 4). Estes dados sugerem a participação dos receptores RAGE e TLR4 a nível espinal durante a nocicepção induzida por HMGB1.

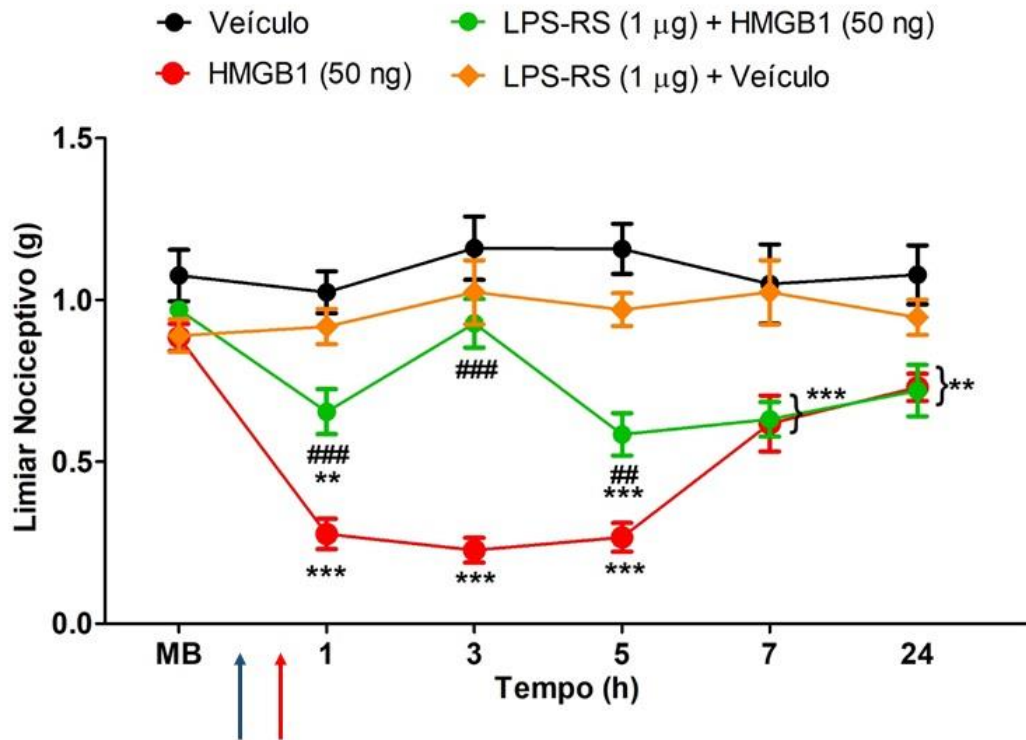
Gráfico 2 - Participação de RAGE na nociceção induzida por HMGB1



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo Veículo, ### $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo HMGB1 (50ng). $n=6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em azul indica a injeção intratecal do antagonista e a seta em vermelho a injeção da proteína recombinante.

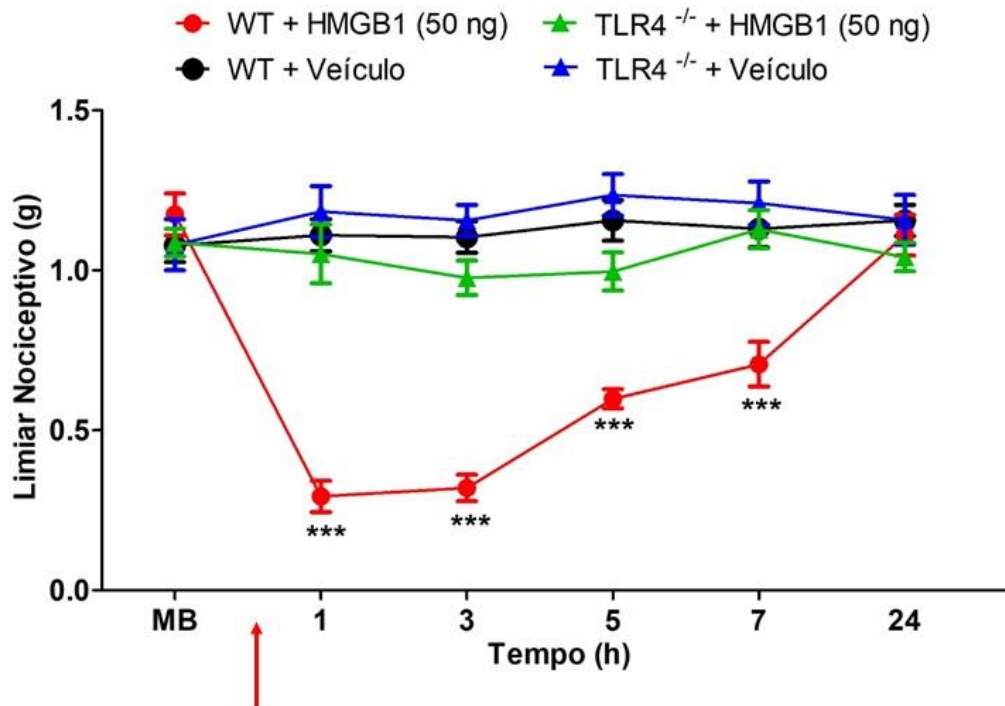
Gráfico 3 - Participação de TLR4 na nociceção induzida por HMGB1



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ indicam significância estatística em relação ao grupo Veículo, ### $p < 0,001$ e ## $p < 0,01$ indicam significância estatística em relação ao grupo HMGB1 (50ng). $n=6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em azul indica a injeção intratecal do antagonista e a seta em vermelho a injeção da proteína recombinante.

Gráfico 4 - Participação de TLR4 utilizando animais TLR4(-/-) na nocicepção induzida por HMGB1



Fonte: da autora.

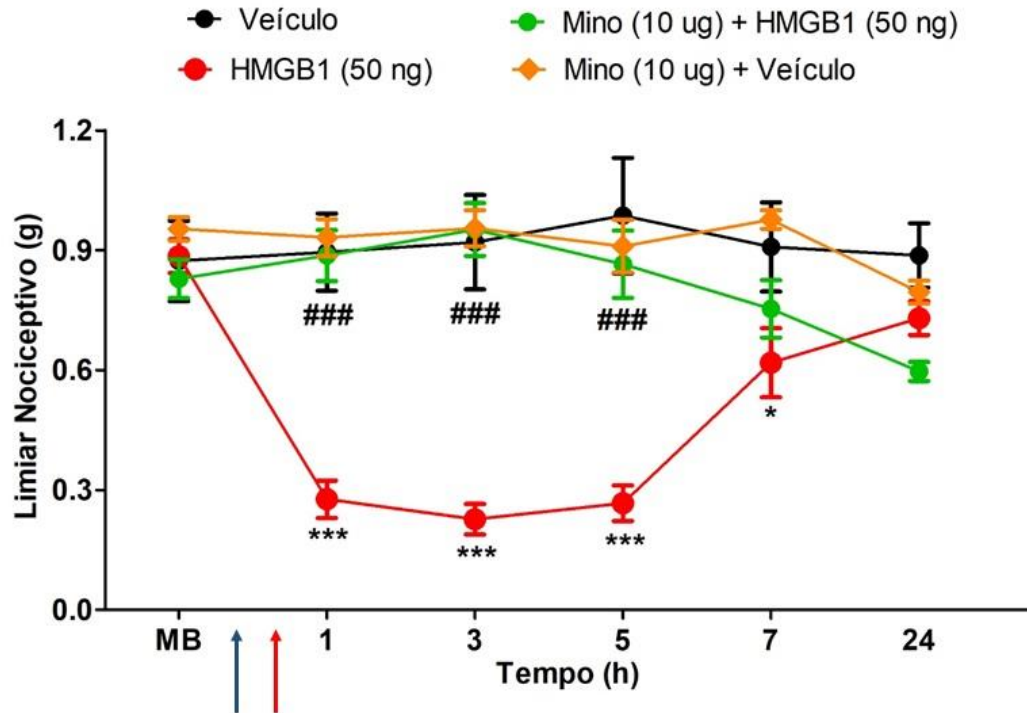
Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo WT + Veículo. $n=6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em vermelho indica o momento da injeção intratecal da proteína recombinante ou veículo.

5.3 PARTICIPAÇÃO DE MICRÓGLIA E ASTRÓCITOS ESPINAIS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR HMGB1

Visto que durante o desenvolvimento da nocicepção ocorre a participação dos receptores RAGE e TLR4 e que a literatura aponta que estes receptores são expressos por células da glia, este estudo avaliou a participação de micróglia e astrócitos a nível espinal na nocicepção induzida pela proteína HMGB1 recombinante. O Gráfico 5 indica a participação da micróglia, pois os animais que receberam HMGB1 recombinante (50ng) apresentaram redução significativa do limiar nociceptivo em comparação ao grupo veículo na 1^o, 3^o, 5^o ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 11,21$) e 7^o hora ($P < 0,01$; $f_{3,20} = 11,21$), porém animais tratados com o inibidor de micróglia, (minociclina 10 μ g) apresentaram aumento significativo do limiar nociceptivo em relação ao grupo HMGB1 da 1^o à 5^o hora ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 11,21$). De modo semelhante a participação dos astrócitos é demonstrada no Gráfico 6, pois os animais que receberam HMGB1

recombinante apresentaram redução do limiar nociceptivo da 1° à 7° hora ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 6,73$), porém quando tratados com fluorocitrato (inibidor de astrócitos, 300 pmol), houve aumento significativo na 1° ($p < 0,01$; $f_{3,20} = 6,73$) 3° e 5° hora ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 6,73$).

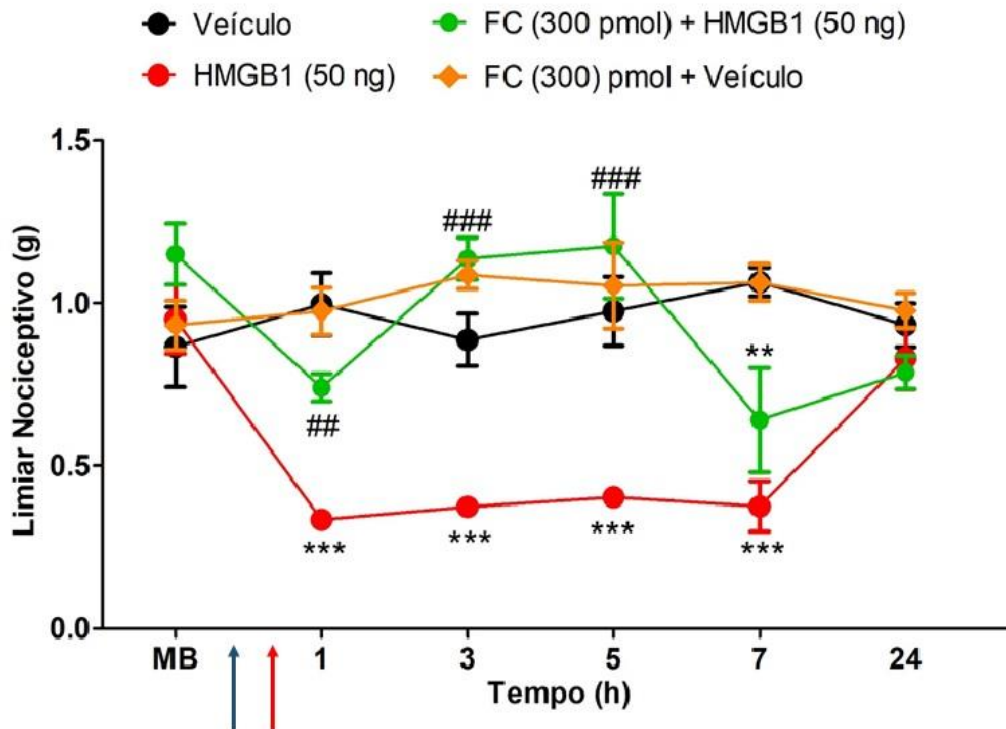
Gráfico 5 - Participação da micróglia na nocicepção induzida por HMGB1



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Veículo e ### $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo HMGB1 (50 ng). $n = 6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. Mino: minociclina. A seta em azul indica a injeção intratecal do inibidor e a seta em vermelho a injeção da proteína recombinante.

Gráfico 6 - Participação dos astrócitos na nocicepção induzida por HMGB1



Fonte: da autora.

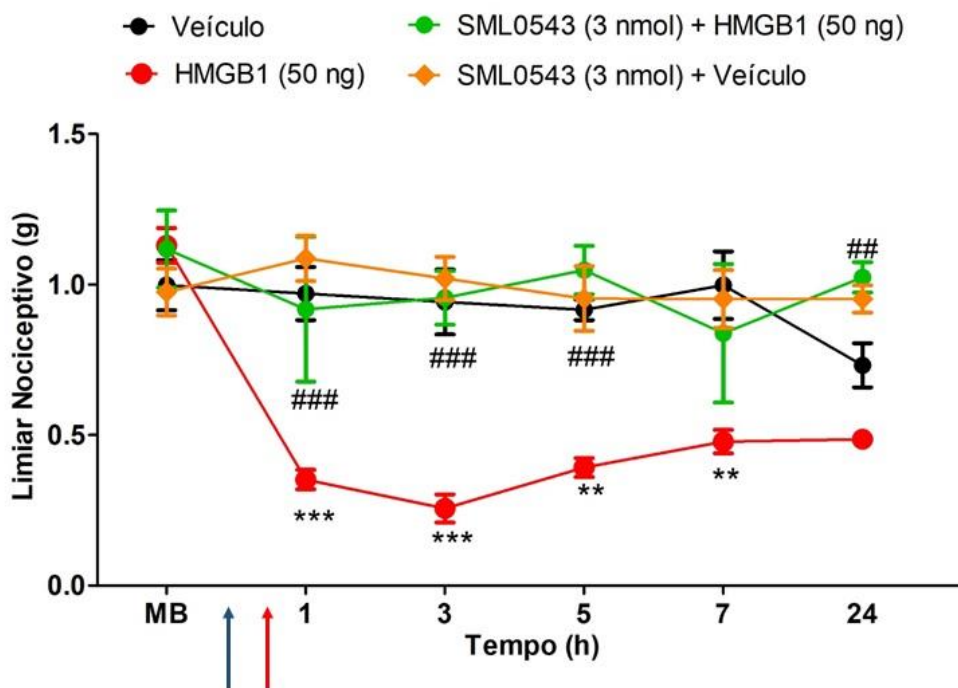
Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo Veículo e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo HMGB1 (50 ng). $n = 6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. FC: fluorocitrato. A seta em azul indica a injeção intratecal do inibidor e a seta em vermelho a injeção da proteína recombinante.

5.4 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DE MAPK p38 E NFkB ESPINAIS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR HMGB1

A ativação de receptores em células da glia, ativa cascatas de sinalização intracelulares, como as MAPK; que por sua vez, ativam fatores de transcrição para citocinas pró-inflamatórias, como o NFkB, os quais contribuem para a nocicepção. O envolvimento da MAPK p38 e do NFkB foi avaliado durante a nocicepção induzida por HMGB1 por meio da injeção intratecal de seus inibidores. O Gráfico 7 indica que durante a nocicepção induzida por HMGB1 ocorre a ativação da sinalização de p38, pois animais que foram pré-tratados com seu inibidor SML0543 (3 nmol) tiveram aumento significativo do limiar na 1, 3°, 5° ($p < 0,001$; $f_{3,17} = 6,20$) e 24° hora ($p < 0,01$; $f_{3,17} = 6,20$) quando comparados ao grupo que recebeu HMGB1 (50ng).

A sinalização do NFkB na nocicepção induzida por HMGB1 é demonstrada no Gráfico 8, de modo que os animais que receberam a proteína recombinante apresentaram diminuição significativa do limiar nociceptivo em relação ao grupo veículo da 1° a 7° hora ($p < 0,001$; $f_{3,18} = 7,36$) e o grupo pré-tratado com o inibidor de NFkB, o PDTC, apresentou aumento significativo do limiar na 1° ($p < 0,05$; $f_{3,18} = 7,36$), 3°, 5° e 7° hora ($p < 0,001$; $f_{3,18} = 7,36$).

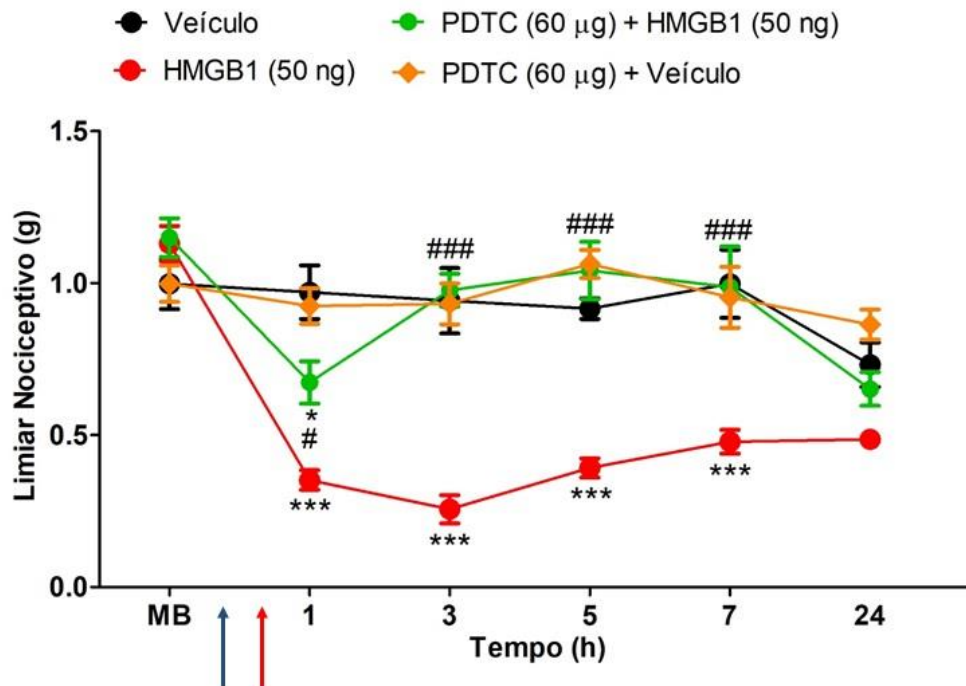
Gráfico 7 - Sinalização da MAPK p38 na nocicepção induzida por HMGB1



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Veículo e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo HMGB1 (50 ng). $n = 6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. SML0543: inibidor de MAPK p38. A seta em azul indica a injeção intratecal do inibidor e a seta em vermelho a injeção da proteína recombinante.

Gráfico 8 - Ativação do NFκB na nocicepção induzida por HMGB1



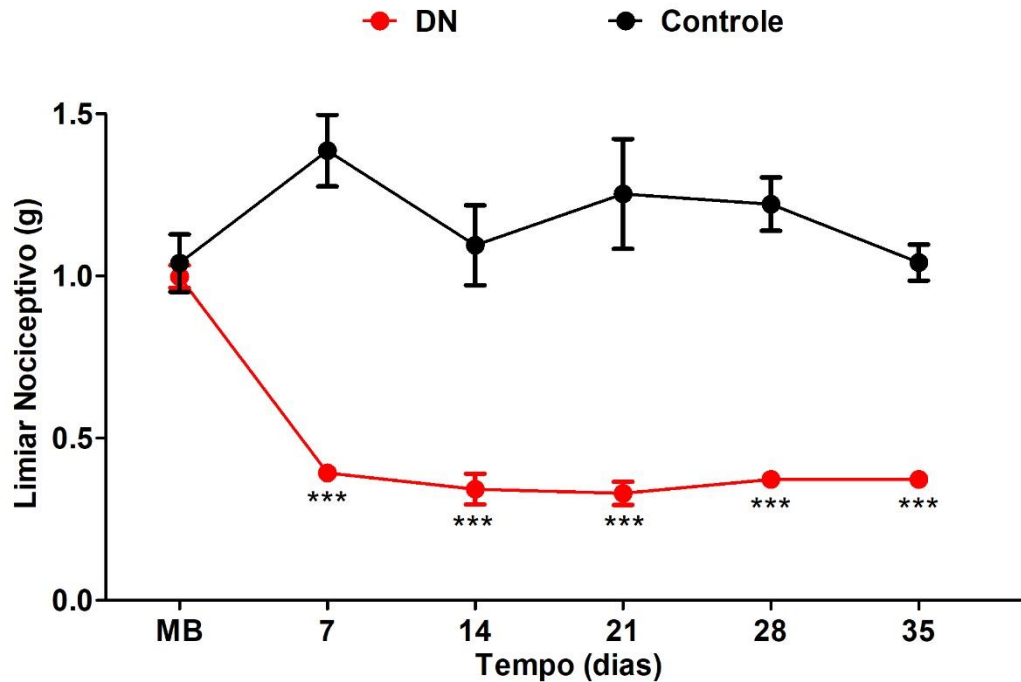
Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, * $P < 0,05$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Veículo e # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo HMGB1 (50 ng). $n=6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. PDTC: inibidor de NFκB. A seta em azul indica a injeção intratecal do inibidor e a seta em vermelho a injeção da proteína recombinante.

5.5 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

Para que o modelo de dor neuropática fosse padronizado, os animais foram divididos em 2 grupos, sendo 6 animais que receberam paclitaxel (DN) e 6 animais que receberam o respectivo veículo (Controle), ambos em dias alternados, sendo eles: 0, 2, 4 e 6, por via *i.p.* Como pode ser observado no Gráfico 9, a partir da 1ª avaliação (dia 7), os animais DN apresentaram diminuição significativa do limiar nociceptivo, indicando alodínia mecânica, que perdurou até o 35º dia ($p < 0,001$; $f_{1,10} = 11,64$) quando comparados ao grupo veículo.

Gráfico 9 - Avaliação do limiar nociceptivo na dor neuropática induzida por paclitaxel



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle, $n=6$ por grupo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; DN: dor neuropática.

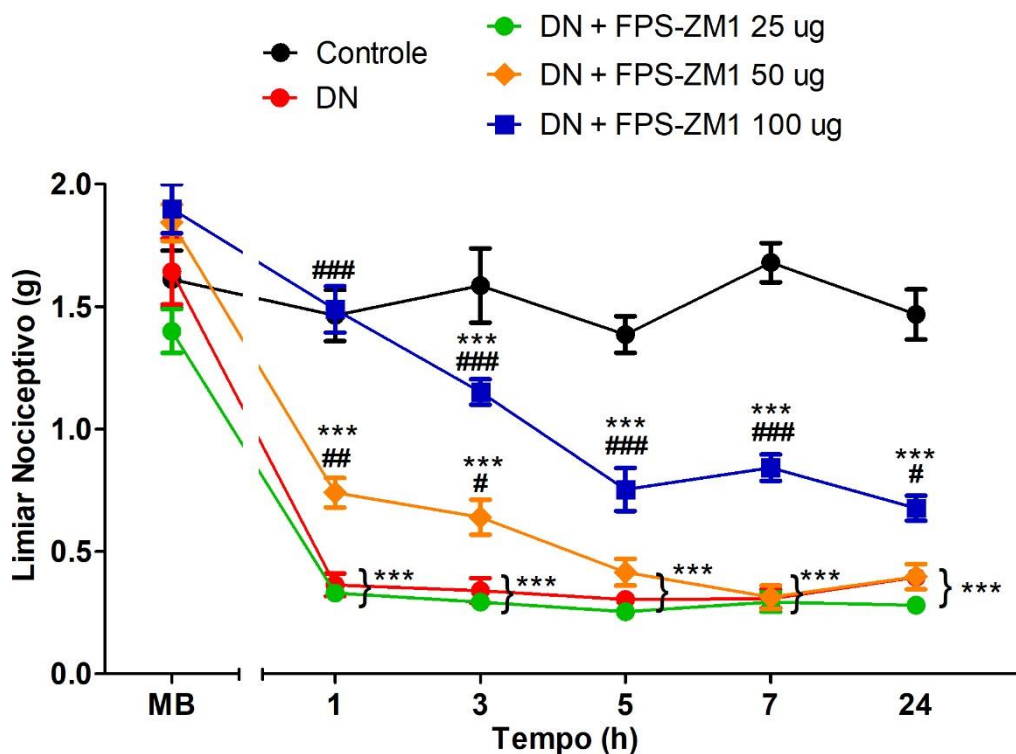
5.3 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

A participação dos receptores RAGE e TLR4 foi observada na nocicepção induzida pela proteína recombinante HMGB1. Deste modo, avaliamos a participação destes receptores a nível espinal na dor neuropática induzida pelo paclitaxel, por meio da administração de seus respectivos antagonistas FPS-ZM1 e LPS-RS.

O Gráfico 10 demonstra os efeitos causados pelo antagonista do receptor RAGE (FPS-ZM1), em que em sua menor dose (25 μg) não foi capaz ($p > 0,05$) de alterar a alodinia mecânica dos animais DN, porém a dose de 50 μg reduziu a alodínia mecânica após a 1ª ($p < 0,01$; $f_{4,24} = 16,66$) e 3ª hora ($p < 0,05$; $f_{4,24} = 16,66$) de sua administração. Já a maior dose utilizada de FPS-ZM1 (100 μg) produziu uma significativa antinocicepção da 1ª a 7ª hora ($p < 0,001$, $f_{4,24} = 16,66$).

A participação dos receptores TLR4 neste processo foi avaliada por meio da injeção do antagonista LPS-RS nas doses de 0,5 e 1 µg. O Gráfico 11 indica que a menor dose (0,5 µg) promoveu redução da alodínia mecânica na 1^o e 3^o hora ($p < 0,01$; $f_{3,20} = 11,90$), enquanto a maior dose (1 µg) teve efeito significativo na 3^o e 5^o hora ($p < 0,01$; $f_{3,20} = 11,90$) em comparação ao grupo DN, sugerindo a participação dos receptores RAGE e TLR4 neste modelo (GRÁFICOS 10 e 11).

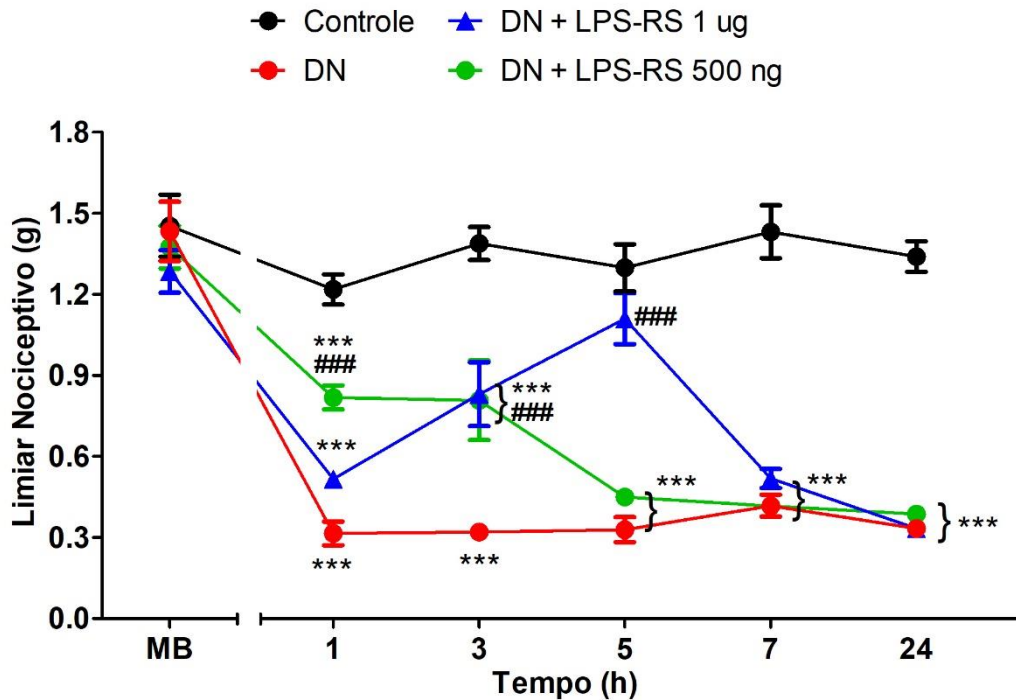
Gráfico 10 - Participação dos receptores RAGE na dor neuropática induzida por paclitaxel.



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística entre os grupos DN e Controle, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo DN, $n = 6$ por grupo. A quebra no eixo "x" no gráfico indica o intervalo de tempo entre o início dos tratamentos com paclitaxel ou veículo e a administração do antagonista (21 dias).

Gráfico 11 - Participação dos receptores TLR4 na dor neuropática induzida por paclitaxel



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle, ### $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo DN, $n=6$ por grupo. A quebra no eixo "x" no gráfico indica o intervalo de tempo entre o início dos tratamentos com paclitaxel ou veículo e a administração do antagonista (21 dias).

5.2 ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DA GLIA NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

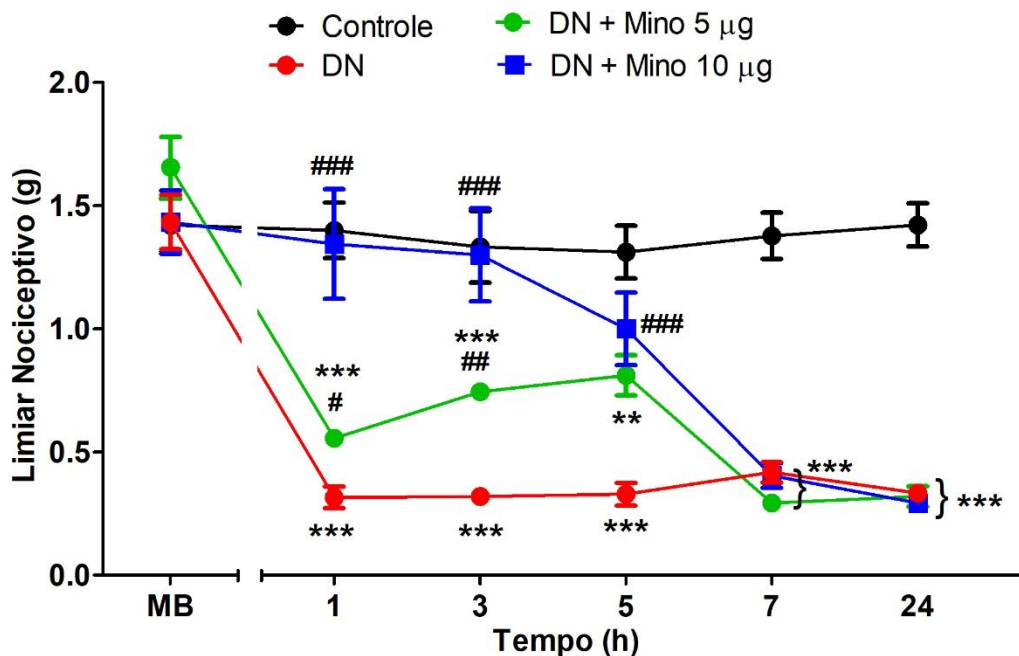
Visto que a ativação de células da glia está envolvida na gênese e manutenção da dor neuropática (MILLIGAN; WATKINS, 2009) e que também observamos sua participação na nocicepção induzida por HMGB1, foi avaliada a participação espinal de microglia e astrócitos na dor neuropática induzida por paclitaxel por meio da administração *i.t.* de seus respectivos inibidores: minociclina (5 e 10 μg) e fluorocitrato (150 e 300 pmol), com intuito de posteriormente avaliar a interação entre o HMGB1 e as células da glia espinais durante a DN.

O Gráfico 12 demonstra a participação da micróglia, uma vez que a menor dose gerou reversão da alodínia mecânica nos grupos tratados com minociclina 5 μg tanto na 3^o ($p < 0,05$; $f_{3,20} = 15,37$) como na 5^o hora ($p < 0,01$; $f_{3,20} = 15,37$) quando

comparados ao grupo DN. A dose de 10 μg também reverteu a alodínia mecânica na 1^o e 3^o e 5^o hora ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 15,37$).

A participação dos astrócitos foi demonstrada no Gráfico 13, indicando diminuição da alodínia mecânica na 1^o hora para a dose de 150 pmol de fluorocitrato ($p < 0,01$; $f_{3,20} = 13,39$) e na 3^o e 5^o hora para a dose de 300 pmol ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 13,39$) em relação ao grupo DN. Sendo assim, os dados indicam a participação espinal das células da glia na dor neuropática induzida pelo paclitaxel.

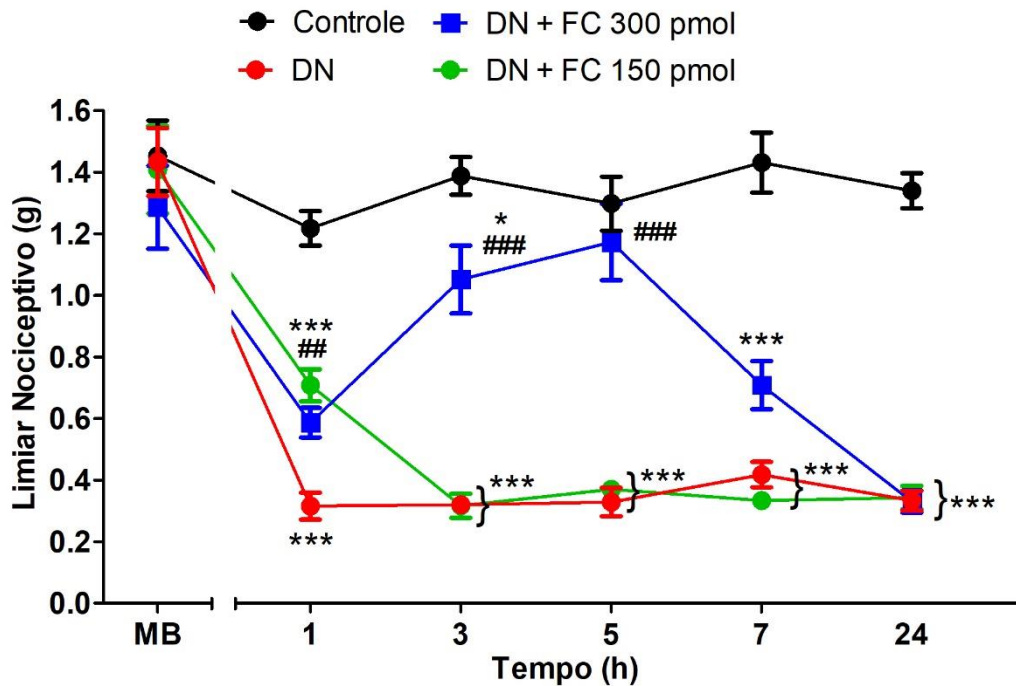
Gráfico 12 - Participação da micróglia na dor neuropática induzida por paclitaxel



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo DN, $n = 6$ por grupo. A quebra no eixo "x" no gráfico indica o intervalo de tempo entre o início dos tratamentos com paclitaxel ou veículo e a administração do inibidor (21 dias). Mino: minociclina.

Gráfico 13 - Participação dos astrócitos na dor neuropática induzida por paclitaxel



Fonte: da autora.

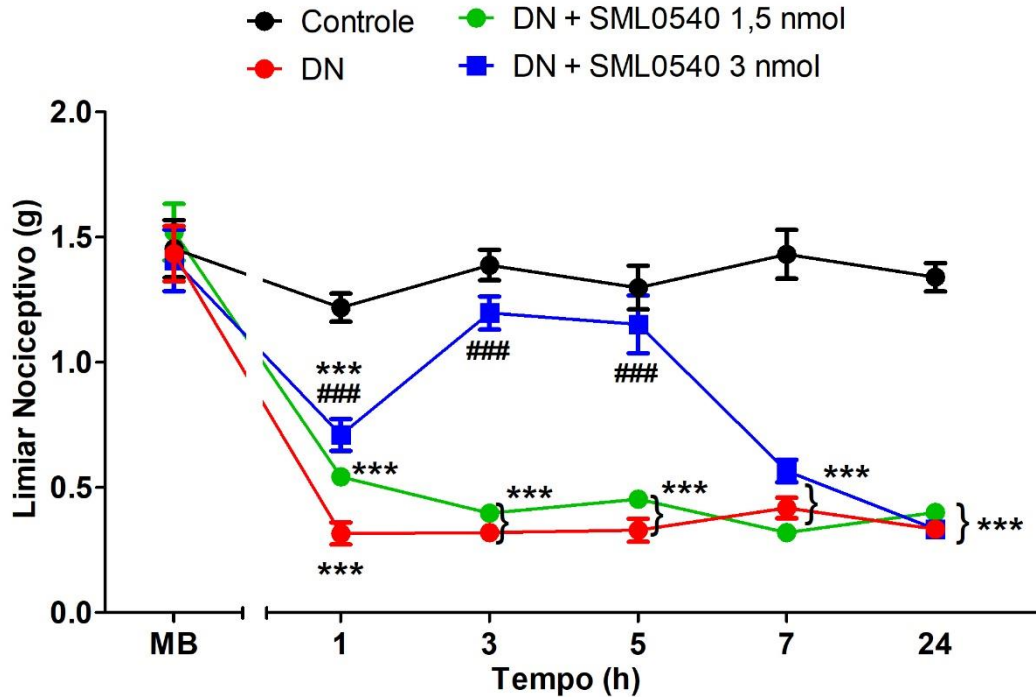
Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo DN, $n=6$ por grupo. A quebra no eixo "x" no gráfico indica o intervalo de tempo entre o início dos tratamentos com paclitaxel ou veículo e a administração do inibidor (21 dias). FC: fluorocitrato.

5.5 PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MAPK p38 e NFkB NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

Durante a dor neuropática, a ativação da sinalização da MAPK p38 leva à translocação do NFkB que resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Visto que a proteína recombinante HMGB1 ativou tal sinalização, bem como os receptores RAGE e TLR4 e células da glia, a participação dessa via de sinalização foi avaliada por meio da inibição tanto de p38 como do NFkB em nosso modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. Para avaliação da participação de p38, foi utilizado seu inibidor SML0543 nas doses de 1,5 e 3 nmol. O Gráfico 14 indica a participação desta via no modelo de dor neuropática utilizado, uma vez que a maior dose foi capaz de aumentar significativamente o limiar nociceptivo mecânico na 1^o, 3^o e 5^o hora ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 14,33$) de sua administração. Já a participação do NFkB está demonstrada no

Gráfico 15, o qual indica que a maior dose de seu inibidor PDTC (60 μ g), promoveu aumento do limiar nociceptivo da 1^o a 7^o hora; $f_{3,20}=4,12$).

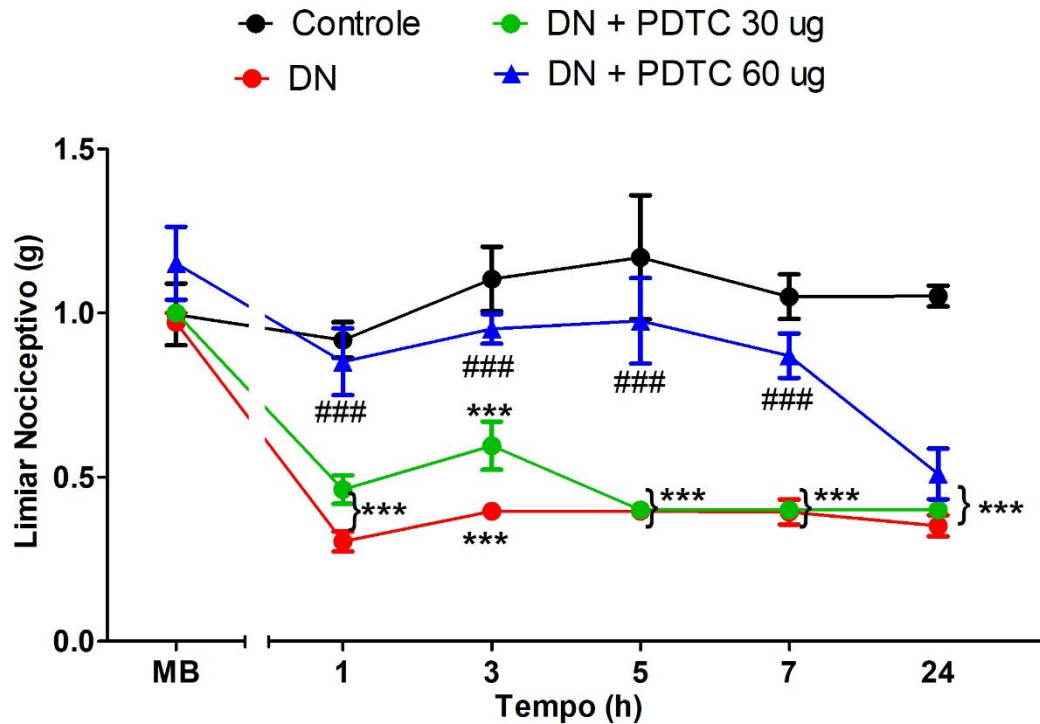
Gráfico 14 - Participação MAPK p38 na dor neuropática induzida por paclitaxel



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle e ### $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo DN, $n=6$ por grupo. A quebra no eixo "x" no gráfico indica o intervalo de tempo entre o início dos tratamentos com paclitaxel ou veículo e a administração do inibidor (21 dias).

Gráfico 15 - Participação do NFkB na dor neuropática induzida por paclitaxel



Fonte: da autora.

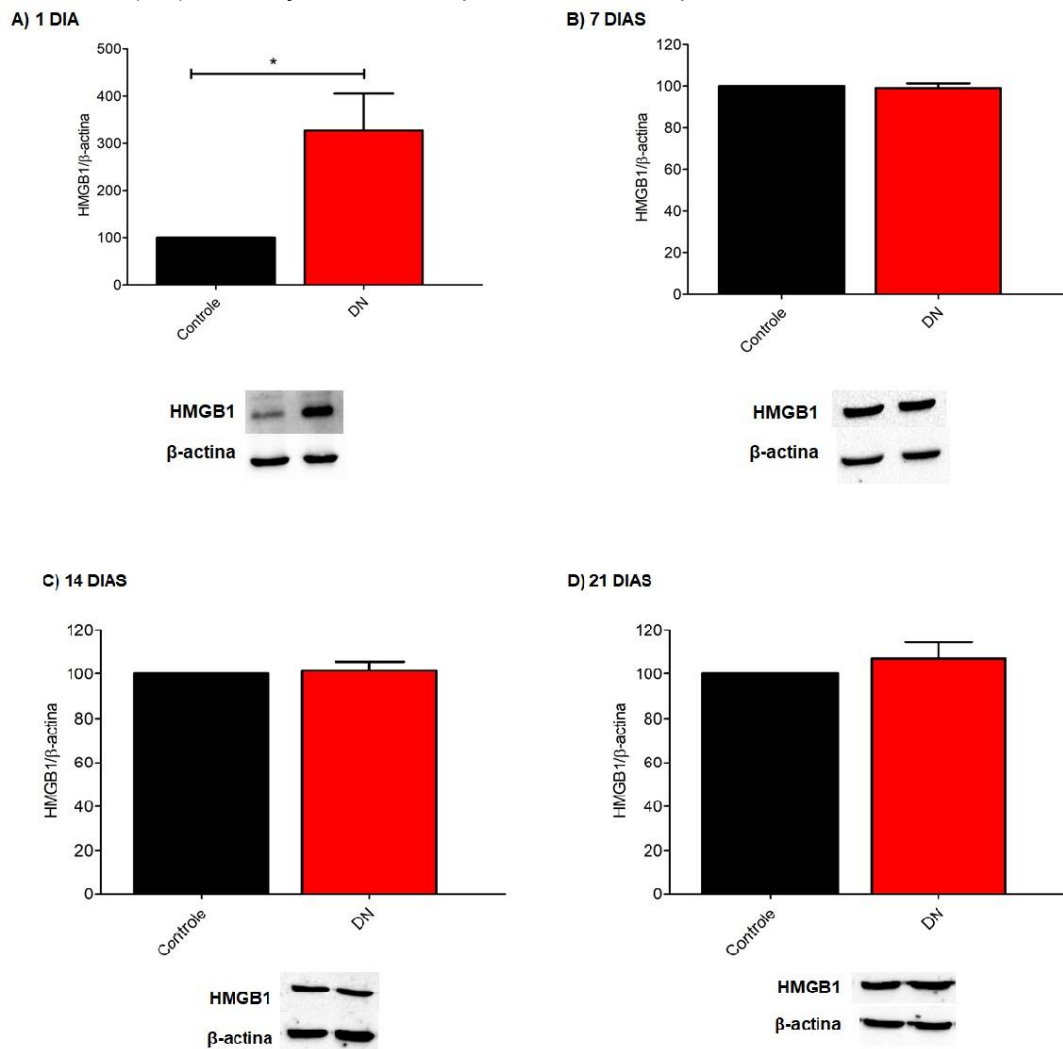
Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle e ### $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo DN, $n=6$ por grupo. A quebra no eixo "x" no gráfico indica o intervalo de tempo entre o início dos tratamentos com paclitaxel ou veículo e a administração do inibidor (21 dias).

5.5 ENVOLVIMENTO DO HMGB1 NA FASE INICIAL DA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

O uso de quimioterápicos leva a quadros de neuropatia devido à degeneração neuronal e neuroinflamação que ocorrem. Nossos dados demonstraram que a proteína HMGB1 recombinante foi capaz de gerar alodínia mecânica a nível espinal. Deste modo, os níveis proteicos de HMGB1 foram avaliados durante a dor neuropática induzida por paclitaxel, afim de elucidar seu papel neste modelo. No dia 1, pode-se observar a ocorrência de aumento dos níveis de HMGB1 nos animais DN em relação aos animais controle ($p < 0,05$) (GRÁFICO 16 a), porém nos dias 7, 14 e 21 este aumento não foi mais observado (GRÁFICOS 16 b-d). Os níveis de HMGB1 também foram avaliados pelo método de ELISA no 21º dia, porém assim como no ensaio de Western blot, não foi encontrada diferença em comparação ao grupo veículo ($p > 0,05$),

sugerindo a participação do HMGB1 na fase inicial da dor neuropática induzida pelo paclitaxel (GRÁFICO 17).

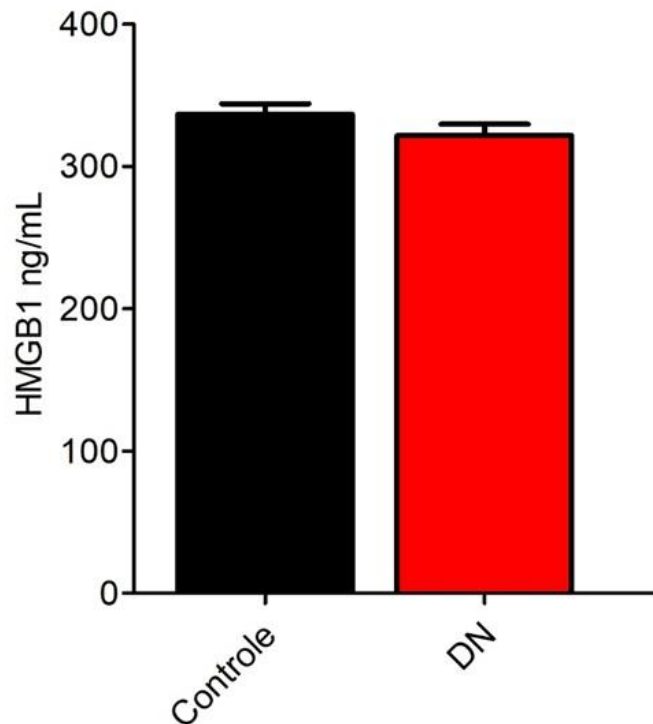
Gráfico 16 (a-d) - Avaliação dos níveis proteicos HMGB1 pelo ensaio de Western Blot



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média ± E.P.M. teste *t student*, * $p < 0,05$ indica significância estatística em relação ao grupo controle, $n=4$ por grupo.

Gráfico 17 - Dosagem dos níveis de HMGB1 pelo método de ELISA no 21° após o início da indução da dor neuropática



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. teste t *student*, n=4 por grupo.

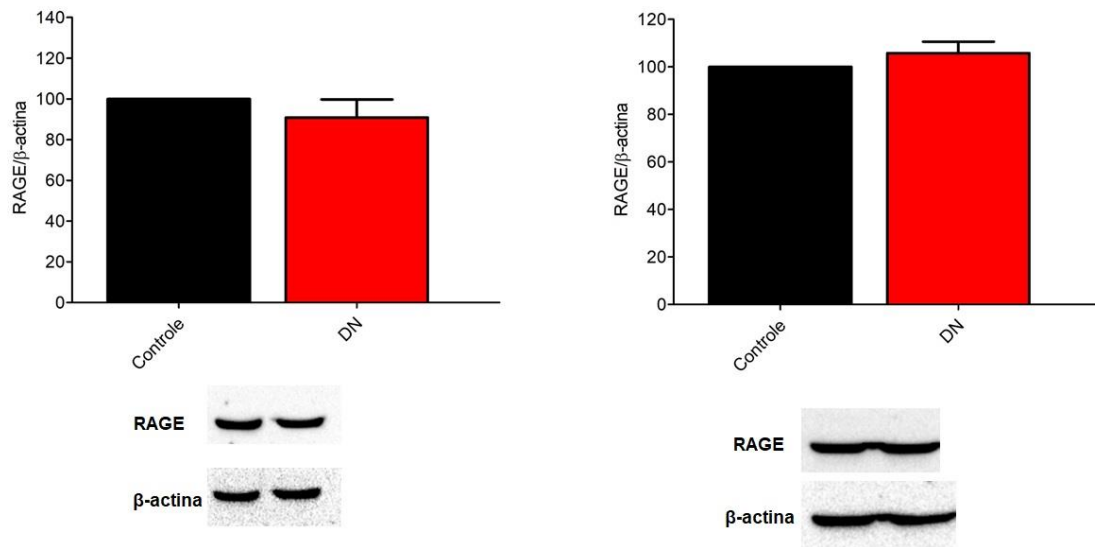
5.5 INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS DE RAGE E TLR4 ESPINAIS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE AS CÉLULAS DA GLIA DURANTE A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

Nos experimentos comportamentais foi verificada a participação dos receptores RAGE e TLR4 na dor neuropática, uma vez que quando bloqueados houve diminuição da nocicepção, além disso, também observamos o envolvimento destes receptores na nocicepção induzida por HMGB1. Deste modo, foram avaliados os níveis proteicos de ambos receptores nos dias 14 e 21 após o início dos tratamentos com paclitaxel ou veículo. Os gráficos 18 a e b representam os níveis proteicos de RAGE, os quais não apresentaram alterações, porém os níveis de TLR4 aumentaram de forma significativamente estatística tanto no 14° ($p < 0,05$) como no 21° ($p < 0,01$) dia quando comparado ao grupo controle (GRÁFICOS 19 a-b).

Gráfico 18 (a-b) - Avaliação dos níveis proteicos RAGE pelo ensaio de Western Blot.

A) RAGE 14 DIAS

B) RAGE 21 DIAS



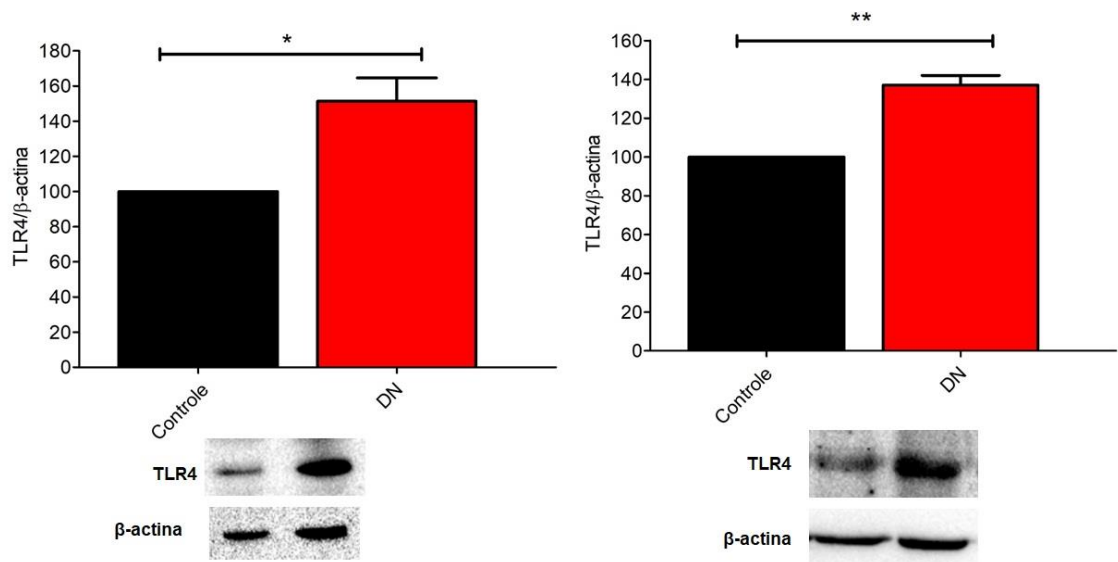
Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. teste *t student*, n=4 por grupo.

Gráfico 19 (a-b) - Avaliação dos níveis proteicos TLR4 pelo ensaio de Western Blot

A) TLR4 14 DIAS

B) TLR4 21 DIAS



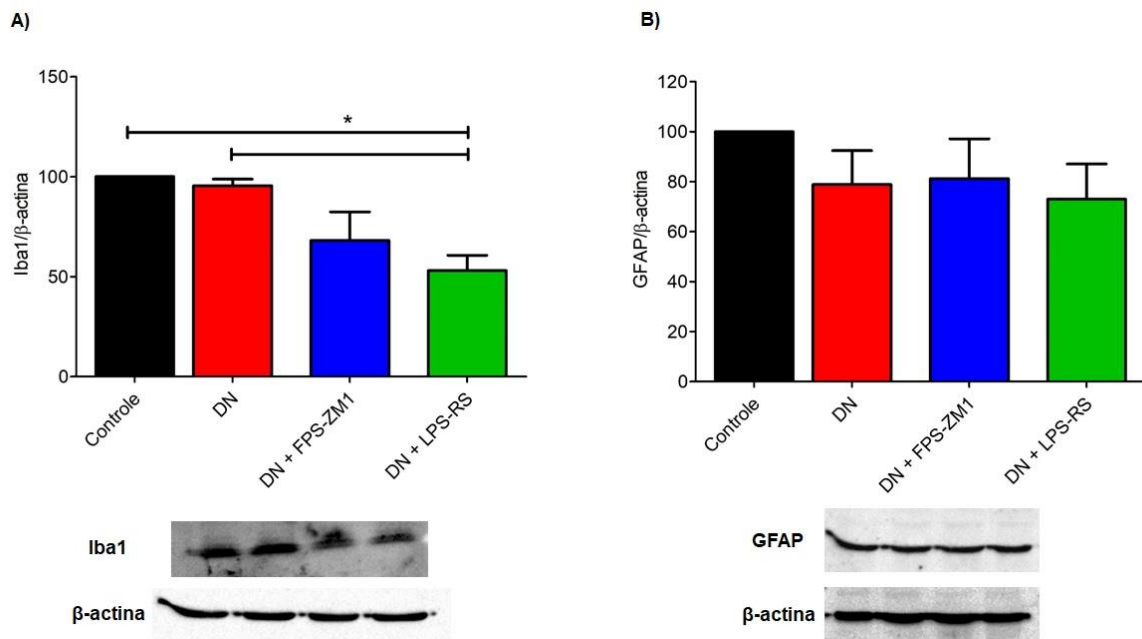
Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. teste *t student*, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam significância estatística em relação ao grupo controle; n=4 por grupo.

Visto que as células da glia expressam os receptores RAGE e TLR4, foi avaliado por meio do ensaio de Western Blot a influência dos mesmos em uma

possível ativação de micróglia e astrócitos espinais de animais com dor neuropática tratados com os respectivos antagonistas no 21°. Para a avaliação da micróglia, foi utilizado o marcador Iba1 e o Gráfico 20 a indica que os animais que receberam o antagonista de TLR4 apresentaram diminuição destes níveis em comparação ao grupo controle e ao grupo DN ($p < 0,05$), o que indica que os receptores TLR4 participam da ativação microglial na dor neuropática induzida por paclitaxel. Embora não houve significância estatística no grupo que recebeu o antagonista para RAGE, houve tendência de diminuição dos níveis proteicos de Iba1. Já o Gráfico 20 b demonstra a avaliação dos níveis de GFAP, marcador da ativação de astrócitos, o qual não apresentou nenhuma alteração significativamente estatística.

Gráfico 20 (a-b) - Avaliação dos níveis proteicos de Iba1 e GFAP pelo ensaio de Western Blot



Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. *One way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, * $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo DN, $n=4$ por grupo.

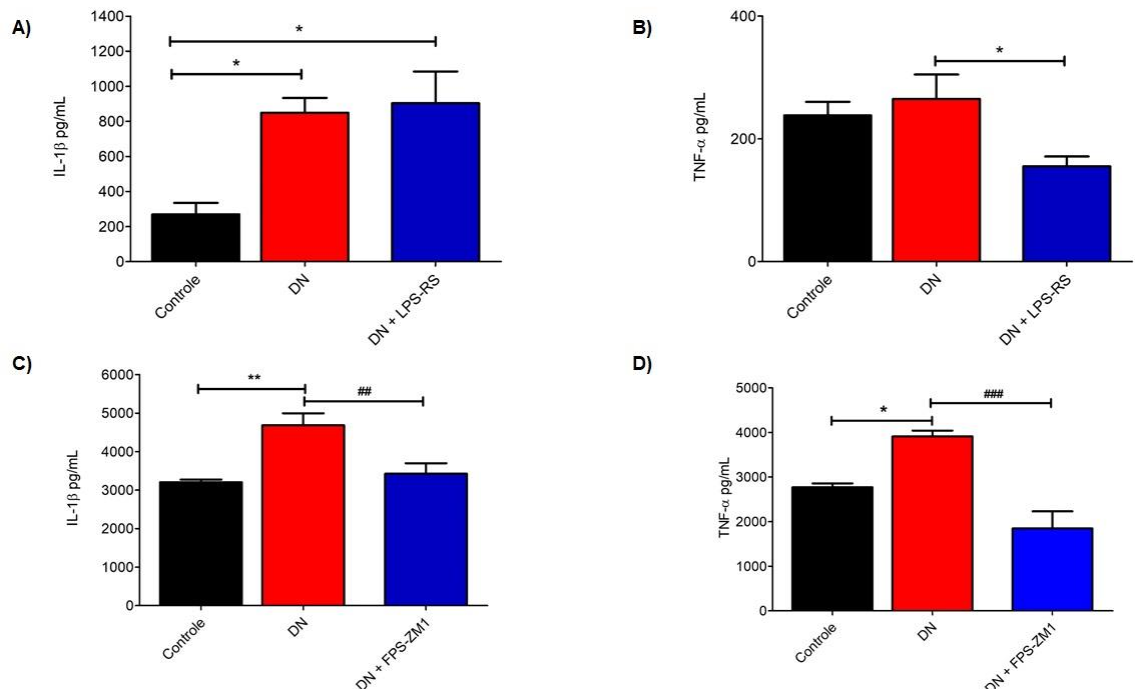
5.4 ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DURANTE A NEUROPATIA

Até então nossos dados demonstraram o envolvimento do HMGB1 na ativação dos receptores RAGE e TLR4, principalmente com a participação de TLR4 na

micróglia e a ativação da sinalização de p38 e NFkB. Como o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias tem sido demonstrado na dor neuropática (LI, XIANGNAN *et al.*, 2016) e nossos resultados indicam que as vias ativadas levam à liberação de citocinas, foi efetuado o ensaio de ELISA em animais com DN tratados com antagonistas de RAGE e TLR4. Os Gráficos 21 a e b indicam que os animais com DN apresentaram aumento significativo dos níveis de IL-1 β ($p < 0,05$), mas não de TNF- α em relação ao grupo controle e o bloqueio do receptor TLR4 diminuiu apenas os níveis de TNF- α em relação ao grupo DN ($p < 0,05$).

Já os Gráficos 21 c e d indicam que os animais DN apresentaram significativo aumento dos níveis de IL-1 β ($p < 0,01$) e de TNF- α ($p < 0,05$), porém quando o receptor RAGE é bloqueado, o aumento de IL-1 β ($p < 0,01$) e de TNF- α ($p < 0,001$) é prevenido. Sendo assim, os dados indicam participação dos receptores TLR4 e RAGE nos níveis de citocinas pró-inflamatórias durante a dor neuropática induzida por paclitaxel.

Gráfico 21 (a-d) - Participação dos receptores TLR4 e RAGE na liberação de TNF- α e IL-1 β na neuropatia induzida por paclitaxel



Fonte: da autora.

Nota: a) e b) Os animais foram submetidos ao tratamento com paclitaxel (DN) e no 21º dia foi administrado LPS-RS e a coleta dos segmentos medulares foi efetuada na 3ª hora. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ indica significância estatística em relação ao grupo controle, ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Ptx. $n = 6$ por grupo. c) e d) Os animais foram submetidos ao tratamento com paclitaxel (DN) e no 21º dia foi administrado FPS-ZM1 e a coleta dos segmentos medulares foi

efetuada na 3° hora. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam significância estatística em relação ao grupo controle, ## $p < 0$, ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo DN. $n=6$ por grupo.

6 DISCUSSÃO

Durante processos inflamatórios ocorre a liberação de DAMPs, a qual pode ocorrer de forma passiva principalmente durante necrose e apoptose, devido à ruptura das membranas celulares ou de forma ativa por lisossomos e exossomos secretores. Estas moléculas são potentes ativadoras do sistema imunológico e uma vez liberadas tem relação com o desenvolvimento da nocicepção, devido à sua interação com receptores que culminam na produção de citocinas e quimiocinas (MURAO *et al.*, 2021). Um dos principais DAMPs estudados atualmente é o HMGB1, uma proteína nuclear de ligação à cromatina associada à replicação do DNA, com função de modular a transcrição de várias proteínas, incluindo o NFkB e está presente no núcleo de células neuronais, como nociceptores e neurônios corticais, bem como células não neuronais como macrófagos, micróglia e astrócitos (FAN *et al.*, 2020; KRYSKO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2021). Quando liberado para o meio extracelular, o HMGB1 interage com receptores e pode ativar diretamente o sistema nociceptivo por meio de diferentes mecanismos, sendo que neste trabalho investigamos sua interação com os receptores RAGE e TLR4 em células da glia (KATO;SVENSSON, 2015).

A participação da nocicepção induzida por HMGB1 a nível espinal já foi descrita, como no estudo de Morioka *et al.* (2019), indicando alodínia mecânica. Porém nosso estudo aprofundou-se na elucidação da via envolvida nesta nocicepção (MORIOKA, 2019). Após demonstrarmos que a injeção intratecal da proteína HMGB1 recombinante gerou alodinia, exploramos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da nocicepção e encontramos a participação dos receptores RAGE e TLR4, da micróglia e astrócitos e da sinalização intracelular MAPK p38 e NFkB a nível espinal por meio de injeção intratecal de antagonistas e inibidores, além de sua relação com o desenvolvimento da dor neuropática induzida por quimioterapia, sendo o grande diferencial o dado encontrado relacionando o HMGB1 logo na fase inicial da dor neuropática, algo ainda não demonstrado pela literatura.

Os principais receptores pelos quais o HMGB1 se liga quando liberado para o meio extracelular são RAGE e TLR4, que são componentes chave da ativação do sistema imune inato. Os receptores RAGE já são expressos em condições basais porém são supra regulados em estados de inflamação crônica, desde doenças

cardiovasculares, diabetes, câncer e condições neurodegenerativas, a qual pode-se incluir a dor neuropática induzida por quimioterápicos (HUDSON; LIPPMAN, 2018). A interação entre o HMGB1 liberado sob condições de morte celular e RAGE resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares e transcrição de genes para citocinas pró-inflamatórias (HUDSON; LIPPMAN, 2018). O receptor TLR4 é um dos principais reguladores dos processos inflamatórios e neuroinflamatórios, mecanismos que ocorrem durante a dor neuropática e a ligação entre HMGB1 e TLR4 tem sido demonstrada de grande importância neste processo por iniciar cascatas de produção e liberação de citocinas (KATO; SVENSSON, 2015). Nossos resultados comportamentais indicaram a participação de RAGE e TLR4 na nocicepção induzida por HMGB1 a nível espinal, uma vez que o pré-tratamento com o antagonista FPS-ZM1 e LPS-RS preveniram a nocicepção. Nishida *et al.*, (2016) demonstraram esta relação a nível periférico a partir das injeções por via intraplantar relacionando sua liberação por macrófagos, porém em nosso estudo demonstramos esta participação a nível espinal, sugerindo que a durante a lesão nervosa causada pelo tratamento com paclitaxel a liberação de HMGB1 pode modular a dor via estes receptores.

A relação entre o HMGB1 e as células da glia espinais, micróglia e astrócitos, foi encontrada em nosso estudo, uma vez que a inibição dessas células preveniu a nocicepção induzida por HMGB1. A literatura relata que em cultura de micróglia o tratamento com HMGB1 recombinante promoveu a ativação dessas células favorecendo o fenótipo M1 (pró-inflamatório), demonstrando em ensaio de PCR que observou o aumento de RNA mensageiro (RNAm) de marcadores pró-inflamatórios como TNF- α , INOS e CD86, além do aumento da expressão dos receptores RAGE e TLR4 mostrado no ensaio de Western Blot (FAN *et al.*, 2020). O antagonismo do receptor RAGE diminuiu estes mesmos marcadores pró-inflamatórios, indicando a presença desses receptores na micróglia (FAN *et al.*, 2020). Embora nossos resultados sugiram o papel da micróglia *in vivo*, o estudo de Fan *et al.*, (2020) corrobora com nossos dados sugerindo a interação entre HMGB1 e micróglia. A ativação de astrócitos espinais foi demonstrada por Morioka *et al.*, (2019), uma vez que a injeção intratecal de HMGB1 levou ao aumento da marcação de GFAP em ensaio de imunofluorescência na medula espinal. Este mesmo estudo indicou a presença de TLR4 em astrócitos uma vez que seu antagonista diminuiu os níveis de células GFAP positivas. O estudo de Morioka *et al.*, (2019) vai de encontro aos nossos

dados, pois também observamos a participação de astrócitos na nocicepção induzida por HMGB1 em ensaio comportamental.

A ativação dos receptores RAGE e TLR4 leva à sinalização intracelular a jusante de proteínas cinases como a p38 e a translocação do NFkB que estão intimamente ligados à processos inflamatórios e resultam em um aumento da regulação da resposta inflamatória (KATO; SVENSSON, 2015). Em nosso trabalho, a participação destes receptores na nocicepção induzida por HMGB1 recombinante foi observada a partir da avaliação do envolvimento da MAPK p38 e do NFkB neste processo e por meio da injeção intratecal dos inibidores que consequentemente preveniu a nocicepção, o que sugere a participação dessa sinalização nesse mecanismo induzido por HMGB1. Liu *et al.*, (2019) demonstraram em modelo de cultura de células NP (núcleo pulpos), relacionadas à degeneração de disco intervertebral, que o HMGB1 induz a fosforilação de p38 e que uma vez inibido essa resposta diminui juntamente com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (LIU *et al.*, 2019). Um outro trabalho demonstrou em modelo de hemorragia subaracnoide o aumento da expressão de RAGE concomitante ao aumento da expressão de NFkB no córtex de ratos pelo ensaio de Western Blot (LI *et al.*, 2014). Sendo assim, a participação da sinalização HMGB1/p38/NFkB encontrada em nosso estudo vai de encontro aos dados da literatura, embora estes estudos descritos não tenham sido relacionados à nocicepção, mas que nos fornece um embasamento para a elucidação dos mecanismos envolvidos neste processo.

A dor neuropática induzida por quimioterapia é bem descrita na literatura, pois algumas classes de fármacos quimioterápicos como o paclitaxel atuam como estabilizadores dos microtúbulos das células a fim de impedir a despolimerização e proliferação, porém não afeta somente as células cancerígenas, o que gera danos às fibras de axônios sensoriais e podem resultar em sintomas como a alodínia desde a primeira infusão da droga e pode persistir por anos (BOBYLEV *et al.*, 2015; CHIBA *et al.*, 2016; COLVIN, 2020; LI *et al.*, 2020; PEASE-RAISSI *et al.*, 2018). Em nosso estudo, a injeção intraperitoneal de paclitaxel gerou alodínia mecânica, demonstrada pela diminuição do limiar nociceptivo no teste comportamental de von Frey filamentos desde a primeira avaliação.

A partir destes dados encontrados relacionados à via em que o HMGB1 gera nocicepção, investigamos se as vias relacionadas ao desenvolvimento da DN induzida por paclitaxel coincidiam com as vias ativadas na nocicepção induzida por HMGB1 para então verificar a participação do HMGB1 no desenvolvimento da dor neuropática e encontramos participação dos receptores RAGE e TLR4, das células da glia, da sinalização de p38 e NFkB.

Atualmente sabe-se que durante lesões do sistema nervoso ocorrem respostas neuroimunes centrais subjacentes e as células da glia tem importante papel na gênese e manutenção da dor neuropática (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Nossos dados comportamentais apontam que tanto a inibição da micróglia como dos astrócitos diminuiu a alodínia mecânica na DN induzida por paclitaxel. Yan *et al.*, (2018) demonstraram por meio do monitoramento em tempo real da atividade de Ca^{2+} , que ambas células da glia são ativadas durante a dor neuropática (YAN *et al.*, 2019). Estes dados são relevantes pois também verificamos a participação das células da glia na nocicepção induzida por HMGB1, o que sugere que a relação da liberação do HMGB1 durante a DN atuando em células da glia.

Sabe-se que diversos receptores têm expressão supra regulada em resposta a lesões do SNP e SNC em condições de dor crônica, como na dor neuropática, aumentando vias de sinalização intracelulares e levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para seu desenvolvimento e manutenção. Os receptores RAGE estão relacionados à estes processos e de acordo com estudos apontados na literatura sua expressão em astrócitos, micróglia e neurônios tem papel na inflamação e neurodegeneração (GONZÁLEZ-REYES; RUBIANO, 2018; SONG *et al.*, 2014). A interação destes receptores com seus ligantes em casos de lesão do sistema nervoso ativa a via das MAPK e leva à translocação do NFkB, o que resulta no aumento dos níveis de citocinas e formação de ERO (Li *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2014).

A participação de RAGE na neuropatia induzida por paclitaxel já foi demonstrada a nível periférico, por meio da administração intraplantar de seu antagonista, a qual diminuiu a nocicepção (NISHIDA *et al.*, 2016). Já em nosso estudo, observamos que o antagonista para RAGE diminuiu alodinia mecânica e os níveis de TNF- α e IL-1 β de animais com neuropatia induzida por paclitaxel a nível espinal, sugerindo que sua participação não ocorre somente periféricamente, mas também a nível central. Esses dados corroboram com o estudo de Li *et al.*, (2016), o qual

demonstrou a participação desses receptores na dor neuropática em modelo de ligadura do nervo espinal, a partir da injeção de anticorpos neutralizantes por via intratecal que diminuíram a nocicepção e a liberação das citocinas TNF- α e IL-1 β (LI *et al.*, 2016). O estudo de Brederson *et al.*, (2015) também mostrou a participação de RAGE a nível espinal na dor neuropática, porém no modelo de constrição do nervo ciático mas não associado à presença do receptor em células da glia, de modo que a injeção intratecal de anticorpos monoclonais geraram antinocicepção (BREDERSON *et al.*, 2016).

Sabe-se que os receptores TLR4 são principalmente ativados pelo lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias, entretanto o paclitaxel também é capaz de ativar a mesma sinalização induzida pelo LPS nesses receptores, devido a liberação de DAMPS (BYRD-LEIFER *et al.*, 2001). Deste modo, avaliamos seu envolvimento no comportamento dos animais com dor neuropática por meio da injeção intratecal de seu antagonista, ao qual diminuiu a alodinia mecânica. Li *et al.*, (2015) mostraram no ensaio de western blot que os níveis proteicos de TLR4 se apresentaram aumentados na medula espinal de animais tratados com paclitaxel, sustentando nossa hipótese de envolvimento espinal do TLR4 neste modelo de dor (Li *et al.*, 2015).

Ambos receptores RAGE e TLR4 compartilham a via a jusante NF κ B que se ativa em resposta ao DAMP e culminam na liberação de citocinas que contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática (GONZÁLEZ-REYES; RUBIANO, 2018). Um estudo feito por Meng *et al.*, (2019) verificou a participação da MAPK p38 na neuropatia induzida por paclitaxel (MENG *et al.*, 2019). Nosso estudo sugere o envolvimento da MAPK p38 a nível espinal na dor neuropática induzida por paclitaxel, uma vez que a administração intratecal de seu inibidor promoveu reversão da nocicepção. Como foi observada a participação de células gliais e dos receptores RAGE e TLR4 neste processo, este achado pode indicar a ativação da via MAPK p38 em micróglia e astrócitos via ativação desses receptores (SONG *et al.*, 2014).

De acordo com a literatura, sabe-se que dentre os diversos mediadores liberados durante a dor neuropática induzida por paclitaxel, o HMGB1 atua como DAMP estimulando a inflamação por meio da ativação dos receptores RAGE e TLR4, porém os dados sugerem este papel periféricamente (NISHIDA *et al.*, 2016; SEKIGUCHI *et al.*, 2018). Em nossa hipótese, durante a neuropatia induzida pelo

paclitaxel ocorre a liberação de HMGB1, a qual pode ocorrer devido à degeneração axonal causada pelo quimioterápico que se liga aos receptores RAGE e TLR4 modulando a dor a nível espinhal (YANG *et al.*, 2021).

Nossos dados biomoleculares mostraram o aumento dos níveis proteicos de HMGB1 após a primeira injeção de paclitaxel e embora estes níveis não permaneceram aumentados, a literatura mostra que o paclitaxel é capaz de gerar danos axonais desde a primeira infusão e outros mecanismos podem atuar na manutenção da DN (COLVIN, 2020). Este aumento dos níveis proteicos de HMGB1 logo após a primeira injeção de paclitaxel sugere que estas moléculas são liberadas para o meio extracelular no início da degeneração neuronal no processo inflamatório induzido pelo quimioterápico, sensibilizando receptores que são mantidos ativos por outros mediadores liberados durante este processo.

O fato de o HMGB1 não se manter aumentado durante a fase mais tardia da DN é suportado pelo estudo de Sekiguchi *et al.*,(2016) que também não encontrou aumento da expressão de HMGB1 em tecido medular no 14º dia assim como em nosso trabalho (NISHIDA *et al.*, 2016), porém o aumento dos níveis de HMGB1 logo no início do tratamento com paclitaxel traz um novo dado à literatura, pois indica sua participação na gênese desse tipo de dor neuropática. Yang *et al.*,(2021) mostraram que em caso de lesão de nervos como a dor neuropática induzida por modelo de constrição do nervo (CCI), o HMGB1 é liberado por nociceptores promovendo hiperalgesia e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (YANG *et al.*, 2021). No modelo de lesão da medula espinhal, foi encontrado o aumento de mRNA de HMGB1 após 3 dias da cirurgia, também na fase inicial porém em modelo de lesão direta do nervo e o aumento dos níveis de marcadores de apoptose logo nos primeiros dias de lesão no corno dorsal da medula, sugerindo que a lesão nervosa leva à mecanismos de apoptose resultam na liberação de HMGB1 (FAN *et al.*, 2020; LI, MINGMING *et al.*, 2021). Nossos dados corroboram e complementam as informações já disponíveis, trazendo a atenção ao início do tratamento e sua resposta espinhal.

Um trabalho de Wu *et al.*,2019 mostrou em um ensaio de imunofluorescência o aumento da expressão de Iba1, um marcador de micróglia, o que indica a ativação destas células em animais que receberam o paclitaxel (WU, Jiang *et al.*, 2019). Nossa análise feita no 21º dia não indicou aumento dos níveis de Iba1, porém o tratamento com LPS-RS (antagonista de TLR4) foi capaz de diminuir a expressão de Iba1,

sugerindo a modulação da ativação microglial via TLR4 no período de manutenção da DN. Este dado vai de encontro ao aumento da expressão de TLR4 em animais submetidos ao tratamento com paclitaxel tanto no 14° como no 21° ao qual encontramos. Como os níveis aumentados de HMGB1 foram encontrados na fase inicial do tratamento com paclitaxel, é possível que o aumento dos níveis de TLR4 na fase de manutenção esteja presente devido a outros mediadores. Em relação ao receptor RAGE, não encontramos aumento significativo de seus níveis proteicos e o tratamento com seu antagonista não diminuiu de forma significativa a expressão de Iba1, o que também pode ser explicado por não haver níveis aumentados de HMGB1 nesta fase avaliada, uma vez que o HMGB1 é o principal ligante de RAGE neste processo

O aumento de RNAm de RAGE e TLR4 em cultura de micróglia tratada com HMGB1 concomitante ao aumento de citocinas pró-inflamatórias foi encontrado no estudo de Fan *et al.*, (2020), indicativo da presença desses receptores nessas células. Este mesmo estudo observou que o tratamento com FPS-ZM1 (antagonista de RAGE) era capaz de diminuir tais níveis de citocinas. Em nosso estudo, encontramos a participação dos receptores RAGE e TLR4, nos ensaios comportamentais, de modo que o antagonismo dos receptores diminuiu significativamente a nocicepção induzida pelo paclitaxel. Em relação aos astrócitos, embora encontrada sua participação nos ensaios comportamentais, o resultado do Western Blot não apresentou alterações significativas nos níveis de GFAP, o que pode ser justificado pelo fato de a micróglia ser ativada antes dos astrócitos, conforme demonstrado no estudo de Yan *et al.*, (2019) (YAN *et al.*, 2019).

Em ensaio de ELISA, não encontramos aumento de HMGB1 no 21° dia assim como não foi encontrado no ensaio de Western blot, porém verificamos que o aumento dessa proteína ocorre logo nos primeiros dias, corroborando com o estudo de Fan *et al.*, (2020), ao qual encontraram aumento de HMGB1 pelo método de ELISA no 3° dia após cirurgia de lesão da medula espinal. Mesmo que sejam modelos diferentes, a participação do HMGB1 foi indicada na gênese da DN, ou seja, logo após a lesão nervosa. Encontramos também a participação de TLR4 na liberação de TNF- α , e de RAGE na liberação de IL-1 β e TNF- α , sugerindo que estes receptores tem função primordial na DN induzida por paclitaxel.

De acordo com os dados encontrados em nosso trabalho e os disponíveis na literatura, sugerimos que o HMGB1 é liberado logo no início da lesão nervosa induzida pelo tratamento com paclitaxel, ativando inicialmente receptores TLR4 presentes na micróglia e levando à fosforilação de p38 e translocação de NFκB que resulta na liberação de citocinas, principalmente TNF-α e modulando a DN. Não é descartada a participação do receptor RAGE, uma vez que o HMGB1 se mostrou aumentado no início dos tratamentos e a avaliação dos níveis de RAGE ocorreu no 21º dia, além disso, o tratamento com seu antagonista (FPS-ZM1) foi capaz de diminuir IL-1β e TNF-α neste modelo, sugerindo que mesmo não se apresentando supra regulado, tem relação à manutenção da dor. Este estudo traz uma nova elucidação dos mecanismos envolvidos na dor neuropática induzida por quimioterápicos, a qual tem grande impacto na vida dos pacientes e uma vez que seu processo de desenvolvimento seja entendido, novas ferramentas farmacológicas podem ser desenvolvidas.

7 CONCLUSÃO

A partir dos dados encontrados em nosso trabalho sugerimos que o HMGB1 é liberado na fase inicial da dor, causado pela degeneração axonal decorrente do tratamento com paclitaxel. A partir de sua liberação, o HMGB1 liga-se aos receptores RAGE e TLR4 nas células microgliais, promovendo ativação da sinalização da MAPK p38 e translocação do NFkB que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o estado de dor neuropática.

REFERÊNCIAS

AGALAVE, N. M.; SVENSSON, C. I. Extracellular High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) as a Mediator of Persistent Pain. **Molecular Medicine**, Stockholm, v. 20, n. 1, p. 569, 2014.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALLING. **Nature Reviews Immunology**, Japan, v. 4, n. July, 2004.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. **Brain Research**, São Paulo, v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, 2004.

BOBYLEV, I. et al. Neurobiology of Disease Paclitaxel inhibits mRNA transport in axons. **Neurobiology of Disease**, Cologne, Baltimore, v. 82, p. 321–331, 2015.

BORGHI, S. M. et al. Intense Acute Swimming Induces Delayed-Onset Muscle Soreness Dependent on Spinal Cord Neuroinflammation. **Frontiers in Pharmacology**, USA, v. 12, n. January, p. 1–17, 2022.

BREDERSON, J. et al. A monoclonal antibody against the receptor for advanced glycation end products attenuates inflammatory and neuropathic pain in the mouse. **European Journal of Pain**, Germany, p. 607–614, 2016.

BREWER, J. R. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Current status and progress. **Gynecologic Oncology**, Chicago, v. 140, n. 1, p. 176–183, jan. 2016.

BUSHNELL, M. C.; ČEKO, M.; LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nature reviews. Neuroscience**, Maryland, v. 14, n. 7, p. 502, jul. 2013.

BYRD-LEIFER, C. A. et al. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. **European Journal of Immunology**, Japan, p. 2448–2457, 2001.

CHEN, G. et al. Sex-Dependent Glial Signaling in Pathological Pain : Distinct Roles of Spinal Microglia and Astrocytes. **Neuroscience Bulletin**, Singapore, v. 34, n. 1, p. 98–108, 2018.

CHIBA, T. et al. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy increases substance P release in rat spinal cord. **European Journal of Pharmacology**, Japan, v. 770, p. 46–51, 2016.

CLARK, A. K.; OLD, E. A.; MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: Current perspectives. **Journal of Pain Research**, London, v. 6, p. 803–814, 2013.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Bmj**, USA, v. 348, n.6 feb, p. f7656–f7656, 2014.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, Baltimore, v. 3, p. 1–20, 2017.

COLVIN, L. A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): where are we now ? **Pain**, Dundee, v. 160, p. 1–22, 2020.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain. **Annu Rev Neurosci**, Boston, n. 32, p. 1–32, 2009.

CROFFORD, L. J. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, Nashville, v. 126, p. 167–83, 2015.

DESANTANA, J. M. et al. Definição revisada de dor pela Associação Internacional para o Estudo da Dor: conceitos, desafios e compromisso | Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. **Iasp**, Brasil, p. 1–8, 2020.

ELISEI, L. M. S. et al. Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. **Inflammopharmacology**, Alfenas, n. 0123456789, 2020.

FAN, H. et al. Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury. **Journal of Neuroinflammation**, Shaanxi, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2020.

FARQUHAR-SMITH, P.; BROWN, M. R. D. Persistent Pain in Cancer Survivors: Pathogenesis and Treatment Options. **IASP** [s.l.], v. XXIV, n. 4, 2016.

GIERTHMÜHLEN, J.; BARON, R. Neuropathic Pain. **Seminars in Neurology**, Kiel, v. 36, n. 05, p. 462–468, 23 set. 2016.

GONZÁLEZ-REYES, R. E.; RUBIANO, M. G. Astrocyte ´ s RAGE : More Than Just a Question of Mood. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, Bogotá, p. 39–48, 2018.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature reviews. Immunology**, USA, v. 14, n. 4, p. 217, 2014.

HM, G. et al. HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, North Caroline, v. 31, n. 3, p. 1081–1092, 19 jan. 2011.

HUDSON, B. I.; LIPPMAN, M. E. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. **Annual Review of Medicine**, Miami, v. 69, p. 349–364, 2018.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **European Journal of Pharmacology**, Minneapolis, v. 67, n. 2–3, p. 313–316, 1980.

JI, R.-R.; DONNELLY, C. R.; NEDERGAARD, M. Astrocytes in chronic pain and itch. **Nature reviews. Neuroscience**, USA, v. 20, n. 11, p. 667, 1 nov. 2019.

JI, R. et al. Pain Regulation by Non-neuronal Cells and Inflammation. **Science**, USA, v. 354, n. 6312, p. 572–577, 2017.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? **Pain**, USA, v. 154, p. S10–S28, 2013.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, USA, v. 413, n. 6852, p. 203–210, 13 set. 2001.

KATO, J.; SVENSSON, C. I. Role of extracellular damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) as mediators of persistent pain. **Prog Mol Biol Transl Sci**, Stockholm, v. 131, 2015.

KNUTIE, S. A. et al. Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems. **Physiology & behavior**, USA, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2020.

KRYSKO, D. V. et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, Belgium, v. 12, n. 12, p. 860–875, 2012.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, Germany, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, Springfield, v. 47, n. 2, p. 173–180, 2020.

LI, H. et al. Expression and cell distribution of receptor for advanced glycation end-products in the rat cortex following experimental subarachnoid hemorrhage. **Brain Research**, China, v. 1543, p. 315–323, 2014.

LI, L. et al. Activation of KCNQ channels prevents paclitaxel-induced peripheral neuropathy and associated neuropathic pain. **The Journal of Pain**, USA, v. 20, n. 5, p. 528–539, 2020.

LI, M. et al. Lidocaine Alleviates Neuropathic Pain and Neuroinflammation by Inhibiting HMGB1 Expression to Mediate MIP-1 α /CCR1 Pathway. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, China, v. 16, n. 2, p. 318–333, 2021.

LI, X. et al. Enhanced RAGE expression in the dorsal root ganglion may contribute to neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Pain Medicine (United States)**, China, v. 17, n. 5, p. 803–812, 2016.

LI, Y. et al. Toll-Like Receptor 4 Signaling Contributes to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. **The Journal of Pain**, Houston, v. 15, n. 7, p. 712–725, 2014b.

LIU, X. et al. Glycyrrhizin suppresses inflammation and cell apoptosis by inhibition of HMGB1 via p38/p-JUK signaling pathway in attenuating intervertebral disc degeneration. **Am J Transl Res**, China, v. 11, n. 8, p. 5105–5113, 2019.

MAKKER, P. G. S. et al. Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **PLoS One**, Randwick, p. 1–24, 2017.

MEACHAM, K. et al. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**, USA, v. 21, n. 6, 2017.

MELZACK, R.; WALL, P. D. A gate control system modulates sensory input from the skin before it evokes pain perception and response. **Pain mechanisms: a new theory**, USA, v. 150, n. 3699, p. 971–979, 1965.

MENG, J. et al. Duloxetine, a balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, improves painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy by inhibiting activation of p38 MAPK and NF- κ B. **Frontiers in Pharmacology**, China, v. 10, n. APR, p. 365, 2019.

MIKA, J. et al. Importance of glial activation in neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, Krakow, v. 716, n. 1–3, p. 106–119, 2013.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, New Mexico, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.

MOLOFSKY, A. V.; DENEEN, B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. **Glia**, USA, v. 63, n. 8, p. 1320–1329, 2015.

MORAES, T. R. et al. Participation of CXCL1 in the glial cells during neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, Alfenas, v. 875, p. 173039, 2020.

MORIOKA, N. Spinal high-mobility group box-1 induces long-lasting mechanical hypersensitivity through the toll-like receptor 4 and upregulation of interleukin-1 β in activated astrocytes. **J Neurochem**, Japan, p. 738–758, 2019.

MURAO, A. et al. Release mechanisms of major DAMPs. **Apoptosis**, USA, v. 26, n. 3–4, p. 152–162, 2021.

NISHIDA, T. et al. Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats. **Toxicology**, Japan, v. 365, p. 48–58, 2016.

PEASE-RAISSI, S. E. et al. Paclitaxel reduces axonal Bclw to initiate IP3 R1-dependent axon degeneration. **Neuron**, USA, v. 96, n. 2, p. 373–386, 2018.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, USA, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

RINGKAMP, M.; DOUGHERTY, P. M.; RAJA, S. N. Anatomy and Physiology of the Pain Signaling Process. **Essentials of Pain Medicine**, [s.l.], 2018.

SAŁAT, K. Chemotherapy - induced peripheral neuropathy : part 1 — current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy. **Pharmacological Reports**, Krakow, v. 72, n. 3, p. 486–507, 2020.

SCHOLZ, J. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**, USA, v. 160, n. 1, p. 53, 2019.

SEKIGUCHI, F. et al. Paclitaxel-induced HMGB1 release from macrophages and its implication for peripheral neuropathy in mice: Evidence for a neuroimmune crosstalk. **Neuropharmacology**, Japan, v. 141, p. 201–213, 2018.

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

SMITH, E. S. J. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal of Neurology**, Cambridge, v. 265, n. 2, p. 231, 1 fev. 2018.

SNEDDON, L. U. Comparative physiology of nociception and pain. **Physiology**, Liverpool, v. 33, n. 1, p. 63–73, 2018.

SONG, J. et al. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Its Ligands : Focus on Spinal Cord Injury. **Int J Mol Sci**, Korea, p. 13172–13191, 2014.

STAROBOVA, H.; VETTER, I.; VETTER, I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Front Mol Neurosci**, Australia, v. 10, p. 1–21, 2017.

TANAY, M. A. L.; ARMES, J.; REAM, E. The experience of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adult cancer patients: a qualitative thematic synthesis. **European Journal of Cancer Care**, London, v. 26, n. 5, p. e12443, 2017.

TOMA, W. et al. Effects of paclitaxel on the development of neuropathy and affective behaviors in the mouse. **Neuropharmacology**, USA, v. 117, p. 305–315, 2017.

VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, Dundee, v. 155, n. 4, p. 654–662, 2014.

VICARIO, N. et al. Intercellular communication and ion channels in neuropathic pain chronicization. **Inflammation Research** 2020 69:9, Italy, v. 69, n. 9, p. 841–850, 2020.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. GLIA: A novel drug discovery target for clinical pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, USA, v. 2, n. 12, p. 973–985, 2003.

WILSON, S. M. Identification of a functional interaction of HMGB1 with Receptor for Advanced Glycation End-products in a model of neuropathic pain. **Brain Behav Immun**, USA, p. 169–177, 2015.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, USA, v. 55, n. 3, p. 353–364, 2007.

WU, H. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 reverses the antianalgesia induced by dextro -morphine or morphine in the mouse spinal cord.

Eur J Pharmacol, Milwaukee, v. 550, p. 91–94, 2006.

WU, J. et al. Cannabinoid Type 2 Receptor System Modulates Paclitaxel-Induced Microglial Dysregulation and Central Sensitization in Rats. **Journal of Pain**, Ohio, v. 20, n. 5, p. 501–514, 2019.

Y, E. et al. Age-dependent change of HMGB1 and DNA double-strand break accumulation in mouse brain. **Biochemical and biophysical research communications**, Tokyo, v. 376, n. 1, p. 128–133, 7 nov. 2008.

YAM, M. F. et al. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, Malaysia, v. 19, n. 8, 2018.

LI, Y et al. Toll-like receptor 4 signaling contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **International Journal of Molecular Sciences**, Houston, v. 15, n. 7, p. 712–725, 2015.

YAN, X. et al. Interleukin-1beta released by microglia initiates the enhanced glutamatergic activity in the spinal dorsal horn during paclitaxel-associated acute pain syndrome. **Glia**, China v. 67, n. 3, p. 482–497, 2019.

YANG, H. et al. HMGB1 released from nociceptors mediates inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 118, n. 33, 2021b.

ZHANG, X.-S. Activation of the RAGE/STAT3 Pathway in the Dorsal Root Ganglion Contributes to the Persistent Pain Hypersensitivity Induced by Lumbar Disc Herniation. **Pain Physician**, China, p. 419–427, 2017.

ZHAO, E. et al. Dexmedetomidine Alleviates CCI-Induced Neuropathic Pain via Inhibiting HMGB1-Mediated Astrocyte Activation and the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in Rats. **Neurotoxicity Research**, China, v. 38, n. 3, p. 723–732, 2020.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, Germany, v. 429, n. 1–3, p. 23–37, 2001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da participação do HMGB1 na ativação dos receptores RAGE em células da glia na dor neuropática induzida por paclitaxel", registrada com o nº 52/2018, sob a responsabilidade de Giovane Galdino de Souza, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 30/11/2018 a 01/08/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	168
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 30 de Novembro de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG