
Estudo dos fatores de transcrição: uma nova ferramenta para entender a dor neuropática**Dênis Augusto Santana Reis ***

Atualmente sabe-se que a dor neuropática é uma patologia complexa, mas no passado acreditava que ela seria causada por alguma disfunção neuronal, entretanto, está claro que essa doença conta com a participação da tríade: células da glia (micróglia e astrócitos), neurônios e células imunes (linfócitos, macrófagos, principalmente). Partindo dessa premissa, abordaremos nesse editorial a dor neuropática no que tange a participação das micróglia. Para tanto, podemos enumerar a sequência de eventos que decorrem da lesão de nervos até a neuropatia:

- A injúria de nervos periféricos ativa as micróglia, que se caracteriza pela sua proliferação e hipertrofia;
- Essa micróglia ativada tem alta expressão do receptor P2X4, a ativação desse receptor induz a liberação de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) que age em receptores TrkB (*tyrosine protein kinase B*), internalizando o cotransportador K⁺ Cl⁻ (KCC2), causando hiperexcitabilidade neuronal e contribuindo para o desenvolvimento da dor neuropática.

Diante disto, alterações importantes ocorrem nas micróglia durante a transição do estado normal para o estado ativado, mas que alterações seriam essas? Como genes micróglia do estado normal seriam ativados? Qual a contribuição desses genes para o desenvolvimento da dor neuropática? As respostas para essas perguntas começaram a ser respondidas há dois anos, quando um grupo de pesquisadores japoneses e canadenses publicaram o artigo "*IRF8 Is a Critical Transcription Factor for Transforming Microglia into a Reactive Phenotype*" na revista Cell e recentemente complementaram esta história com o outro trabalho "*Transcription factor IRF5 drives P2X4R+-reactive microglia gating neuropathic pain*" na revista Nature Communications.

Para contar essa história devemos recorrer a um trabalho publicado por esse mesmo grupo em 2003 na revista Nature "*P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury*" no qual foi demonstrado que após a lesão de nervos periféricos ocorre o aumento da expressão de receptores P2X4 em micróglia, que é necessário para o desenvolvimento da dor neuropática. Diante disso, o artigo de 2012 "*IRF8 Is a Critical Transcription Factor for Transforming Microglia into a Reactive Phenotype*" mostrou que um tipo específico de fator de transcrição, IRF8, permeia a ativação de micróglia após a lesão de nervos.

Nesse contexto, o fator nuclear κ B (NF κ B) é um fator de transcrição envolvido na regulação de diversos genes relacionados com respostas imunes, incluindo a indução de interferon β e citocinas pró-inflamatórias. Recentemente, uma nova família de fatores de transcrição foi descrita, os fatores de interferon (IRF), que foram inicialmente associados à indução de genes relacionados a produção de interferon, entretanto, agora sabe-se que possuem papéis relevantes no controle da resposta imune. A família IRF é composta por nove membros:

- IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (LSIRF, PIP ou ICSAT);
- IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ICSBP);
- IRF9 (ISGF3 γ).

Esses fatores ficam localizados no citoplasma e ao serem ativados, são translocados para o núcleo, ligando-se a regiões promotoras de genes, denominadas elementos responsivos a interferon, induzindo a expressão gênica. Estes fatores ganharam mais atenção como fatores essenciais para ativação de células imunes ao ser descrito que receptores de reconhecimento padrão, além dos receptores de IFN ativariam os IRFs.

No artigo publicado na revista *Cell*, foi demonstrado que a lesão de nervos induz a expressão de IRF8 em micróglia na medula espinal. Nesse sentido, ao realizar a lesão de nervos em animais IRF 8 KO foi observado que estes são resistentes a dor neuropática quando comparado com animais *wild type*. Apenas esses dois experimentos já indicavam que o IRF8 teria um papel importante no desenvolvimento da neuropatia, no entanto, não se sabia ao certo a função do IRF8 neste modelo. Para avaliar qual a função do IRF8 foi realizado uma série de experimentos *in vitro* usando como ferramenta um lentivírus que codificava o fator de transcrição IRF8. Desta forma, ao transfectar culturas de micróglia com este lentivírus, seria possível avaliar quais genes que são ativados pelo IRF8. Foi encontrado que o IRF 8 promovia a transcrição de genes do receptor toll-like 2, P2Y12, CX3CR1, IL-1beta, P2X4, Catepsina S e BDNF. Em experimentos *in vivo* foi observado que após a lesão de nervos de animais WT, quando comparados com animais IRF 8 KO, que o IRF8 controlava a expressão do receptor *toll-like 2*, P2Y12, Catepsina S, BDNF e CX3CR1. Por último, a transferência de micróglia que superexpressavam o fator de transcrição IRF8 para animais normais induzia dor. Além disso, foi demonstrado que o IFN gama e a ativação de receptores do tipo *toll-like 4* induzem a ativação do fator de transcrição IRF8.

O trabalho publicado no dia 13 de maio de 2014 na revista *Nature Communications* é uma continuação do artigo publicado na *Cell*. Nesse artigo foi demonstrado que após a lesão de nervos periféricos ocorre o aumento da expressão de IRF5 em micróglia na medula espinal e esta é responsável pela expressão do receptor P2X4. Os pesquisadores demonstraram que ao estimular micróglia com ATP, IFN gama ou LPS (estímulos que sabidamente ativam micróglia) não ocorria o aumento da expressão do IRF5 ou a sua ativação (translocação para o núcleo). Entretanto, em 2006, os mesmos autores tinham publicado um artigo na revista *Glia* "*Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia*", no qual foi observado que a estimulação de micróglia com fibronectina, molécula da matriz extracelular que é ativamente produzida por astrócitos em resposta a lesões ou doenças no sistema nervoso central, induziu o aumento da expressão de receptores P2X4. Com isso, sabia-se que a fibronectina induzia a expressão de P2X4, mas será que a fibronectina estava aumentada após a lesão de nervos periféricos? A resposta é sim, após a lesão de nervos periféricos ocorria o aumento da expressão/produção de fibronectina na medula espinal. Nesse sentido, ao estimular micróglia com fibronectina foi observado o aumento da expressão/ativação do IRF5 e expressão do receptor P2X4. Porém, será que o IRF5 aumentava diretamente a expressão do receptor P2X4? A resposta para essa pergunta é um pouco complexa, mas vamos por partes. Sabe-se que a região promotora do P2X4 possui cinco regiões onde os IRFs podem ligar-se, dessa forma, com o auxílio da técnica de imunoprecipitação da cromatina, os IRFs foram precipitados juntamente com o pedaço de cromatina que eles estavam associados, posteriormente os fragmentos foram amplificados pela técnica de PCR em tempo real e foi constatado que o IRF5 ligava-se a região promotora do P2X4. Neste momento, os autores tinham a seguinte via: fibronectina/IRF5/P2X4, entretanto os autores questionaram-se sobre a possibilidade do IRF8 controlar a expressão do IRF5. Mais uma vez eles estavam certos, ao transfectar micróglia com o lentivírus que codificava o IRF8 foi observado que ele regulava o IRF5, ao ligar-se a sua região promotora e induzindo a expressão de IRF5 e P2X4. Desta forma, a via estava completa: IRF8/IRF5/P2X4, sendo que a ativação de culminaria na ativação de P2X4, principalmente, sendo muito mais específica. Por último, foi demonstrado que animais deficientes para o IRF5 eram resistentes a dor neuropática quando comparado com animais *wild type*. Em suma os dois trabalhos mostram como os fatores de transcrição da família dos IRFs são relevantes para o desenvolvimento da dor neuropática; em um primeiro momento teríamos o IRF8, um fator de transcrição amplo que levaria a expressão de diversos genes, incluindo gene da IL-1beta, e em um segundo momento teríamos o IRF5 ativado pelo IRF8

ou pela fibronectina liberada por astrócitos, que regularia apenas a expressão do receptor P2X4 em micróglia. Esses trabalhos mostram a relevância de se investigar a função dos fatores de transcrição no desenvolvimento da dor neuropática e abrem as portas para o desenvolvimento de uma nova classe de drogas “os inibidores dos IRFs”. A pergunta é quando surgirão os primeiros inibidores dos IRFs e qual o papel dos outros fatores de transcrição?

Referências

- Masuda T, Iwamoto S, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Nishiyama A, Mak TW, et al. (2014). *Transcription factor IRF5 drives P2X4R(+)-reactive microglia gating neuropathic pain*. Nature communications 5: 3771.
- Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, et al. (2012). *IRF8 Is a Critical Transcription Factor for Transforming Microglia into a Reactive Phenotype*. Cell Reports 1(4): 334-340.
- Nasu-Tada K, Koizumi S, Tsuda M, Kunifusa E, Inoue K (2006). *Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia*. Glia 53(7): 769-775.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. (2003). *P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury*. Nature 424(6950): 778-783.

* Biomédico, mestrando do Laboratório de Inflamação e Dor do Depto. de Farmacologia da FMRP-USP