
Participação de mecanismos epigenéticos na dor crônica: uma crescente área de investigação**Andreza Urba de Quadros ***

As edições do DOL têm procurado trazer sempre novas informações a respeito de mecanismos envolvendo a gênese e manutenção da dor crônica. De fato, este é um dos temas mais relevantes no estudo da dor e na busca por novos alvos terapêuticos e drogas analgésicas. Pode-se dizer que temos fármacos bastante eficazes no controle da dor aguda, principalmente os anti-inflamatórios não esteroidais; mas quando o assunto é dor crônica, o tratamento e o controle ainda são um desafio. Neste editorial, trazemos um resumo sobre um assunto bastante novo e de importância crescente para o entendimento do processo de transição de uma lesão aguda em dor persistente: a epigenética.

Antes de definirmos o que é epigenética, vale a pena lembrar que a dor crônica é caracterizada por uma dor persistente, causada inicialmente por uma lesão tecidual, mas que permanece mesmo depois desta lesão ter sido resolvida. Nesse contexto, já sabemos que acontecem mudanças de médio e longo prazo na via de transmissão da dor, resultando em uma sensibilização neuronal contínua, que gera hiperalgesia, alodinia e/ou dor espontânea. Essas alterações acontecem desde o neurônio periférico, gânglio da raiz dorsal (GRD), medula espinal e em estruturas cerebrais e compreendem principalmente a modulação na expressão de receptores ionotrópicos e metabotrópicos, de neurotransmissores (como aumento de glutamato e redução de GABA) e de moléculas de sinalização intracelular (como fatores de transcrição), geralmente envolvendo a interação entre sistema nervoso, imune e células da glia. Mas para que tudo isso aconteça e, principalmente, permaneça, como acontece na dor crônica, é preciso que haja mudanças em mecanismos transcricionais, traducionais e/ou pós-traducionais na célula. Nesse contexto, a epigenética surge como uma hipótese bastante consistente de estudo.

Mecanismos epigenéticos são aqueles que permitem a modulação (facilitação ou repressão) da expressão de um determinado gene, sem que haja alterações na sequência do DNA. É uma das principais formas com que a célula se adapta ao ambiente e a qualquer outro contexto que exija readequação do sistema ao qual ela faz parte, de forma rápida, sem que a estabilidade do DNA seja alterada. São dinâmicas e normalmente reversíveis, mas podem ser permanentes em determinadas situações, sendo inclusive passíveis de transmissão entre gerações.

Há três principais mecanismos epigenéticos capazes de alterar o perfil de expressão gênica de uma célula: alterações no DNA, como a metilação, modificações na cromatina, como a acetilação de histonas, e expressão de micro RNAs (miRNAs).

A cromatina é a união de cerca de 147 pares de base de DNA, com um octâmero de proteínas chamadas histonas (H). A repetição dessa estrutura básica é o nucleossomo. A cromatina é uma estrutura dinâmica e muda de conformação e de grau de enovelamento dependendo da exigência da célula. Por exemplo: durante a divisão celular, uma conformação bastante enovelada chamada de heterocromatina facilita a segregação dos cromossomos durante a mitose ou a meiose. Já outra conformação, chamada de eucromatina, caracteriza-se por ser uma forma bem menos compacta de DNA e histonas, o que permite o acesso do RNA mensageiro à sequência de DNA, facilitando sua transcrição. O segmento N-terminal das histonas é bastante acessível a modificações pós-traducionais, que contribuem para a regulação do estado de enovelamento da cromatina e o consequente acesso da maquinaria de transcrição ao DNA. Essas modificações podem ser a fosforilação, metilação, acetilação ou ubiquitinação e, de acordo com o tipo, localização e combinação dessas "marcas" nas histonas, além da conformação espacial alterada, diferentes proteínas e fatores de transcrição são recrutados, determinando um maior ou menor acesso à sequência alvo e a consequente facilitação ou repressão da transcrição de um gene. De uma maneira

geral, a acetilação de resíduos de lisina facilita a transcrição de um gene, enquanto a metilação das histonas pode tanto reprimir como promover a transcrição, dependendo do aminoácido, da posição do seu resíduo e da localização nas histonas. Além disso, todo este processo está sujeito à regulação de proteínas como deacetilases, fosfatases, lisina demetilases, dentre outras.

Diferente da cromatina, o DNA está limitado à metilação em resíduos de citosina (no carbono 5 do anel de pirimidina) por meio da ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). A adição de um radical metil a um determinado trecho do DNA permite a regulação da transcrição através do recrutamento de proteínas de ligação ao DNA metilado (como a MeCP2), que geralmente inibem a transcrição gênica por dificultar o acesso da maquinaria de transcrição à sequência alvo no DNA.

Já os microRNAs (miRNAs) são pequenos fragmentos de RNA não codificadores, com cerca de 15 a 21 pares de base, sintetizados no núcleo pela ação essencial da enzima Dicer e transportados para o citoplasma, com função principal de repressão gênica. Cerca de 60% do genoma humano pode ser regulado por este mecanismo, o que revela sua importância tanto em condições fisiológicas, como patológicas.

Não é difícil perceber que as alterações epigenéticas estão envolvidas em importantes funções do organismo. De fato, elas estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento da plasticidade sináptica, memória, aprendizado e também em situações como desordens psiquiátricas, dependência, no câncer e em doenças crônicas como a diabetes. Nos últimos anos, trabalhos mostrando a participação desses mecanismos na gênese e manutenção da dor crônica tem surgido e a cada artigo vamos descobrindo como esses mecanismos estão envolvidos na perpetuação do quadro doloroso. A seguir, listamos resumidamente alguns deles:

Dor inflamatória

Sabemos que a injeção de CFA (*complete Freud's adjuvant*) impede a ação da proteína MeCP2, que se liga a regiões de DNA metilado, nas lamínas I e II do corno dorsal da medula espinal, permitindo a transcrição de genes até então reprimidos pelo complexo DNA metilado:MeCP2. Ainda, a injeção de CFA induz a expressão da HDAC2 (histona deacetilase 2) no corno dorsal da medula espinal, enzima responsável pela remoção do grupo acetil das histonas, inibindo a transcrição.

Além disso, a sensibilização nociceptiva inflamatória resultante da injeção intraplantar de formalina está também relacionada à redução na expressão do miRNA 124a no corno dorsal da medula. Essa redução parece facilitar a transmissão nociceptiva, uma vez que o tratamento com um antagonista de miRNA 124a reduz não apenas a dor, mas também a expressão de citocinas pró-inflamatórias e nociceptivas, como IL-1 β . Complementando, a deleção da Dicer, enzima responsável pela síntese de miRNAs, resulta em significativa redução da hiperalgesia inflamatória em camundongos, enquanto mantém a nocicepção aguda de proteção.

Mudanças na expressão de miRNAs foram também observadas no gânglio trigeminal em modelo experimental de inflamação crônica. A expressão do miRNA 134, por exemplo, está reduzida, tanto no gânglio trigeminal quanto no GRD após a injeção de CFA. Além disso, a injeção intratecal de IL-1 β , induz o aumento da expressão de micro RNA 21 no GRD, além de regular a expressão de HDACs em alguns tecidos.

Dor neuropática

Em relação à dor neuropática, pelo menos em modelo de ligação parcial do nervo ciático periférico (*PSNL*), não há alteração significativa da metilação do DNA. No entanto, há inúmeras modificações na estrutura da cromatina, promovidas especialmente por metilação. Nesse caso, a trimetilação do resíduo 27 de lisina na histona H3 está

diretamente relacionada a um aumento expressivo de MCP-3 em astrócitos, uma quimiocina pró-inflamatória e nociceptiva, duas semanas após a indução de lesão. Além disso, a acetilação de histonas tem sido relacionada diretamente à sensibilização nociceptiva em diversos modelos de neuropatia. Algumas das mudanças mais significativas que acontecem na medula espinal após a ligação do nervo espinal (SNL) em ratos estão relacionadas ao aumento da expressão de HDAC1 e à redução da acetilação da H3.

Modelos experimentais de dor neuropática também revelam alterações tempo-dependentes e tecido-seletivas na expressão de diferentes miRNAs. Por exemplo, o modelo de SNL ou constrição crônica do nervo ciático (CCI) promovem aumento do miRNA 21 no GRD por até 14 dias após a lesão. Ainda, o miRNA 195 está aumentado no GRD após PNL e na medula espinal após SNL. Este miRNA está diretamente relacionado à liberação de citocinas pró-nociceptivas por células microglicais, como IL-1 β e TNF α , e à hiperalgesia mecânica e ao frio. O miRNA 103 também é capaz de regular a expressão de canais de cálcio tipo Cav 1.2 na medula espinal, essenciais para a plasticidade sináptica e pela sensibilização neuronal à longo prazo.

Mecanismos endógenos de controle da dor

A acetilação de histonas está também implicada nas adaptações que acontecem nos sistemas endógenos de controle da dor. Por exemplo: a expressão de receptores μ (mi) opioide e dos canais Nav 1.8 está reduzida durante a dor neuropática. Sete dias após a lesão do nervo, essa expressão reduzida está relacionada à acetilação de silenciadores do gene desses receptores, mecanismo que facilita a expressão proteica do gene.

Além disso, a deleção da enzima responsável pela síntese de miRNAs (Dicer) no GRD corresponde à redução de RNA mensageiro para Nav 1.8, para receptores P2X3 e para o fator de transcrição Runx-1.

Alterações cerebrais

Além de tudo que apresentamos, alterações epigenéticas no cérebro estão envolvidas com a percepção e a memória da dor, com o humor e com o aprendizado durante a dor crônica. A injeção de CFA, por exemplo, promove acetilação de H3 no núcleo magno da rafe, estrutura envolvida na inibição descendente da dor, e redução da expressão de GAD65, uma das enzimas relacionadas à síntese de GABA. A injeção de carragenina aumenta a expressão de miRNA 155 e 223 no córtex pré-frontal, estrutura relacionada à percepção da dor, à depressão e ansiedade na dor crônica. Além disso, uma redução na metilação do DNA no córtex pré-frontal e amígdala em modelo de neuropatia (SNI) está correlacionada à hipersensibilidade mecânica e térmica em ratos e à ansiedade e depressão nesses animais.

Perspectivas terapêuticas

De pouco adiantaria discutirmos mecanismos epigenéticos se não houvesse perspectivas terapêuticas nesse sentido. De fato, a epigenética está ajudando a explicar muitas das nossas perguntas à respeito de alterações a médio e longo prazo ocorridas durante a dor crônica, inclusive no cérebro.

Por hora, a perspectiva mais promissora parece ser os inibidores das enzimas histona deacetilases (HDACs), que impedem a retirada de grupos acetil. Diversas dessas drogas são capazes de regular a acetilação de histonas tanto no cérebro quanto na medula espinal, o que evidencia a habilidade em passar a barreira hematoencefálica. Uma única dose intratecal, por exemplo, de baicalina, um inibidor não específico de HDAC, é capaz de reduzir tanto a hiperalgesia como a alodinia em animais experimentais. Além disso, o ácido valpróico, fármaco usado clinicamente como anticonvulsivante, é também um inibidor de HDAC e é eficaz para o tratamento da dor neuropática em ratos, o que poderia

estar relacionado ao seu mecanismo epigenéticos. O uso de inibidores de HDAC, como o vorinostat, a trichostatina A e o LAQ824, por via intratecal reduz também a dor causada pela injeção de CFA. Os inibidores seletivos da isoforma 1 das HDAC parecem ser mais efetivos na dor inflamatória, assim como doadores de grupo acetil, como L-acetil carnitina. Há também fármacos inibidores de miRNA com excelentes resultados em modelos de nocicepção.

As evidências em relação aos mecanismos epigenéticos na gênese e manutenção da dor são ainda bastante recentes e, embora existam perspectivas terapêuticas quanto à modulação destes mecanismos para modulação da dor, os estudos ainda são incipientes e os mecanismos pouco compreendidos. Certamente nos próximos anos veremos surgir novos dados nesse sentido.

Encerramos esse editorial com um incentivo para o desenvolvimento de pesquisa no campo da epigenética e dor crônica, uma vez que é um campo promissor e pouco explorado. Muitos estudos ainda são necessários não apenas para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da dor crônica e para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas, mas também para o entendimento da eficácia de medicamentos que ainda não sabemos exatamente como agem (por exemplo: neurolépticos na dor crônica).

Sempre haverá um novo caminho a percorrer...

Referências bibliográficas

- Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler EJ, Zachariou V, Narita M. Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Trends Neurosci.* 2015 Apr;38(4):237-46. doi: 10.1016/j.tins.2015.02.001.
- Denk F, McMahon SB. Chronic pain: emerging evidence for the involvement of epigenetics. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Feb;12(1):35-41. doi: 10.1016/j.coph.2011.10.012.
- Géronton SM1. Targeting epigenetic mechanisms for pain relief. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Feb;12(1):35-41. doi: 10.1016/j.coph.2011.10.012.
- Klein K, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis, a review. *Curr Opin Pharmacol.* 2013 Jun;13(3):420-5. doi: 10.1016/j.coph.2013.01.007.
- Seo S, Grzenda A, Lomber G, Ou XM, Cruciani RA, Urrutia R. Epigenetics: a promising paradigm for better understanding and managing pain. *J Pain.* 2013 Jun;14(6):549-57. doi: 10.1016/j.jpain.2013.01.772.
- Bai G, Ren K, Dubner R. Epigenetic regulation of persistent pain. *Transl Res.* 2015 Jan;165(1):177-99. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.012.

* Farmacêutica, doutoranda do Laboratório de Dor do Depto. de Farmacologia da FMRP-USP