

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**Alexandre Gomes de Macedo Maganin**

**Caracterização do papel das fibras sensitivas A (Trkb+)  
e fibras C (Neurotensina+) na dor nociceptiva e  
patológica.**

RIBEIRÃO PRETO

2023

ALEXANDRE GOMES DE MACEDO MAGANIN

**Caracterização do papel das fibras sensitivas A (Trkb+) e fibras C (Neurotensina+) na dor nociceptiva e patológica.**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Farmacologia

**Orientador:** Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

RIBEIRÃO PRETO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Maganin, Alexandre Gomes de Macedo

Caracterização do papel das fibras sensitivas A (Trkb+) e fibras C (Neurotensina+) na dor nociceptiva e patológica.

Ribeirão Preto, 2023.

89p.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Farmacologia- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Thiago Mattar Cunha

Palavras chaves: Nocicepção, Neurônio, Trkb, Neurotensina.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autor:** Alexandre Gomes de Macedo Maganin

**Título:** Caracterização do papel das fibras sensitivas A (Trkb+) e fibras C (Neurotensina+) na dor nociceptiva e patológica.

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Farmacologia

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2019/15063-4 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**DEDICATÓRIA**

À minha mãe Cristina e ao meu pai Antonio que, sempre estiveram me apoiando, por todas as vezes que abriram mão dos seus sonhos para eu poder sonhar. Obrigado por todo carinho, por todas as conversas e conselhos, por todo amor que sempre me proporcionaram e por me ensinarem a sempre ser o melhor de mim, a ser correto e manter sempre a família em primeiro lugar.

À minha mulher, Lari obrigado por estar sempre comigo nas horas difíceis e me mostrar que as vezes precisamos ver o mundo de outra forma. E às minhas princesas, Lara, você sempre traz leveza e alegria à minha vida, Sassa durante os momentos mais difíceis, você me deu forças para seguir em frente.

Amo todos vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus por me proteger e me guiar. Por todas as oportunidades que Ele me concedeu, pela minha saúde e sempre me manter forte nas batalhas.

Aos meus pais, Antonio e Cristina, e meus irmãos, Luiz Felipe e Henrique, por todo suporte, conselhos e encorajamento. Que mesmo com a distância sempre estão presentes em minha vida e me ensinando e ajudando.

À minha mulher, Larissa, que esteve comigo desde o início desse trabalho, sempre me apoiando, me ajudando nos momentos difíceis, as vezes pegando no meu pé para eu não ser tão bravo, obrigado amor por estar comigo sempre e pelo melhor presente do mundo.

À Lara por ser uma criança tão carinhosa, inteligente, obrigado por me ensinar que as vezes precisamos sair do mundo real para nosso mundo de imaginação e aventuras, por me obrigar a utilizar toda a criatividade do mundo nas brincadeiras.

À minha filha, Sassa você ainda nem imagina, mas você fez tanto por mim, obrigado por virar meu mundo de cabeça para baixo e me mostrar que na verdade esse era o lado certo da vida, obrigado por me fazer a pessoa mais completa e feliz do mundo desde o primeiro dia.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, por permitir que eu fizesse meu doutorado em um grande centro de pesquisa, por todas as lições ensinadas, que acabaram sendo importantes na minha formação como pesquisador e pessoa. Obrigado pela oportunidade de executar esse trabalho.

Prof. Dr. Fernando Queiróz Cunha e ao Prof. Dr. José Carlos Alves-Filho por ceder seu laboratório e permitir que eu desenvolva esse projeto.

À banca pela disponibilidade de estar aqui presente e somando às discussões desse trabalho.

Ao Alexandre e à Thalita, que graças a nós, nos tornamos grandes amigos. Obrigado pela amizade, pelas conversas e por serem parte da nossa família aqui de Ribeirão.

À Lili, que desde que chegou em Ribeirão se tornou uma grande amiga, uma irmã, que sempre acreditou em mim, sempre esteve lá para me ajudar em todos os momentos. Obrigado pela amizade sincera, pelas conversas e risadas.

Aos meus companheiros de pós-graduação que se tornaram grandes amigos: Fábio, Maria, Isadora, Atlante, Gabriel, Bia, Isaac, Larissa, Rafaela.

Agradeço a Jéssica, que iniciou como minha IC e se tornou uma grande amiga, fundamental na execução desse trabalho.

À Ieda Regina dos Santos, primeiramente por ser uma amiga muito querida, por me aturar todos os dias e pela ajuda técnica fundamental no desenvolvimento do projeto. Obrigado.

À Katia, pelos incentivos, conselhos, pelo carinho que sempre teve comigo e ajudas durante toda essa jornada.

Ao técnico e amigo Sergio Rosa, pela ajuda e organização em todos os momentos.

À Diva Amábile de Souza, pela convivência, amizade e pelo carinho com que sempre me tratou.

À Marcella Daruge Grando, amizade, pela organização dos materiais e pelo carinho com que sempre me tratou.

Ao grupo de Dor: Glauce, Bruna, Giovanni, Andressa, Rafaela, Samara, Glauce, Vitor, William e Felipe que, direta ou indiretamente, participaram no desenvolvimento desse trabalho, pelo convívio e pela oportunidade de estar sempre conversando e aprendendo cada dia mais.

Aos colegas e amigos do CRID.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia.

Aos colegas da pós-graduação do Departamento de Farmacologia.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, Gislaíne e Ramon, pela dedicação e competência.

Aos bioteristas, Júlio, Dener, Eliana, Marquinhos e Orlando, pelo cuidado com os animais do biotério, fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

À todos os funcionários da FMRP-USP pela competência e dedicação.

À CAPES e à Fapesp pelo auxílio financeiro para realização desse projeto.

Por fim, agradeço a todos que passaram por minha vida e contribuíram para me tornar uma pessoa melhor.

“Nunca diga nunca, pois os limites são como os medos:  
sempre são apenas ilusões.”

(Michael Jordan)

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- – Negativo

% – Porcentagem

+ – Positivo

± – Mais ou menos

ATP – Adenosina trifosfato

CGRP – Peptídeos relacionados ao gene de calcitonina

ChR2 – Canal de rodopsina 2

CNO – Clozapina-N-óxido

Cnp – C não peptidérgicas

DMSO – Dimetilsulfóxido

g – Gramas

GRD – Gânglio da raiz dorsal

h – Hora

Hz – Hertz

i.p. – Intraperitoneal

Kg – Quilogramas

mg – Miligramas

min – Minutos

ml – Mililitros

mW/mm<sup>2</sup> – Miliwatt por milímetro quadrado

Nav1.8 – Subunidade 1.8 do canal de sódio

ng – Nanograma

nm – Nanômetros

NSN – Neurônios sensitivos nociceptivos

Nts – Neurotensina

°C – Graus Celsius

P2X3 – P2X purinoceptor 3

PBS – Phosphate buffered saline (Solução de fosfato salina)

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucleico

SNI – Spared nerve injury (Lesão do nervo poupado)

SST – Somatostatina

Trkb – Tirosina quinase B

YFP – Yellow fluorescent protein (Proteína fluorescente amarela)

$\beta$  – Beta

$\delta$  – Delta

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{l}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrometro

**RESUMO**

MAGANIN, A. G. M. **Caracterização do papel das fibras sensitivas A (Trkb+) e fibras C (Neurotensina+) na dor nociceptiva e patológica.** Tese (Doutorado) – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2023.

A dor é compreendida como uma resposta gerada após o reconhecimento de um estímulo nocivo, podendo estar associada à uma lesão real ou potencial. Porém, processos inflamatórios e lesões no sistema somatossensorial podem fazer com que a dor passe a ser compreendida como patologia. Apercepção tanto da dor nociceptiva quanto da patológica dependem do reconhecimento dos estímulos nocivos pelos neurônios sensitivos nociceptivos (exemplo Fibra C), e em casos de patologia (como a neuropatia) também pelos neurônios sensitivos não-nociceptivos (Fibras A). Contudo a classificação desses neurônios sensitivos sempre foi baseada em característica morfofuncionais, o que sempre gerou controvérsia quanto a real função desses neurônios na nocicepção. Devido a isso uma nova classificação baseada nas características transcricionais globais vem sendo proposta. Contudo ainda se sabe pouco da real função dos novos subgrupos e o entendimento mais preciso do envolvimento dos neurônios sensitivos na via de transmissão nociceptiva poderá contribuir diretamente com estudos de novos alvos terapêuticos mais eficazes para o tratamento de diferentes subtipos de dor. Assim sendo, o objetivo desse projeto é caracterizar o envolvimento das fibras nervosas sensitivas Trkb+ e Neurotensina (Nts)+ na via nociceptiva. Para tal serão utilizadas abordagens de perda e ganho de função com o auxílio de animais geneticamente modificados que expressam a enzima recombinase CRE nessas populações específicas de neurônios sensitivos. No decorrer desse estudo foi observado que as fibras Nts+ não apresentam papel na nocicepção, nem no desenvolvimento da dor neuropática por lesão e por quimioterapia, contudo aparentemente as fibras Trkb+ que em condições *naives* respondem somente a estímulos inócuos, em condições neuropáticas ela passa a assumir um papel de nociceptor. Ademais, nossos dados demonstram o envolvimento direto das fibras Nts+ na resposta de prurido dos animais.

Palavras chaves: nocicepção, neurônios sensitivos, Trkb, Neurotensina.

**ABSTRACT**

MAGANIN, A. G. M. Characterization of the role of sensory fibers A (Trkb+) and C fibers (Neurotensin+) in nociceptive and pathological pain. Thesis (PhD) – Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2023.

Pain is understood as a response generated after the recognition of a noxious stimulus, and may be associated with a real or potential injury. However, inflammatory processes and lesions in the somatosensory system can cause pain to be understood as a pathology. The perception of both nociceptive and pathological pain depends on the recognition of noxious stimuli by nociceptive sensory neurons (egg C fiber), and in cases of pathology (such as neuropathy) also by non-nociceptive sensory neurons (A fibers). However, the classification of these sensory neurons has always been based on morphofunctional characteristics, which has always generated controversy regarding the real function of these neurons in nociception. Because of this, a new classification based on global transcriptional characteristics has been proposed. However, little is known about the real function of the new subgroups and a more precise understanding of the involvement of sensory neurons in the nociceptive transmission pathway may directly contribute to studies of new, more effective therapeutic targets for the treatment of different subtypes of pain. Therefore, the aim of this project is to characterize the involvement of Trkb+ and Neurotensin (Nts)+ sensory nerve fibers in the nociceptive pathway. For this, loss and gain of function approaches will be used with the aid of genetically modified animals that express the enzyme CRE recombinase in these specific populations of sensory neurons. During this study, it was observed that Nts+ fibers do not play a role in nociception, nor in the development of neuropathic pain due to injury and chemotherapy, however apparently Trkb+ fibers, which in naive conditions respond only to innocuous stimuli, in neuropathic conditions it starts to assume a nociceptor role. Furthermore, our data demonstrate the direct involvement of Nts+ fibers in the itch response of animals.

Keywords: nociception, sensory neurons, Trkb, Neurotensin

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1. Dor.....	23
1.2. Nociceptores.....	25
1.3. Nova classificação neuronal.....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
2.1. Objetivos gerais.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
2.2.1. Caracterização dos neurônios sensitivos Trkb+ e Nts+.....	31
2.2.2. Avaliação do envolvimento dos neurônios sensitivos Trkb+ e Neurotensina+ na dor nociceptiva e neuropática.....	31
<b>3. Material e Métodos</b> .....	33
3.1. Animais.....	34
3.2. Modelos experimentais.....	34
3.2.1. Dor neuropática induzida por lesão do nervo periférico.....	34
3.2.2. Dor neuropática induzida por quimioterápico.....	35
3.3. Avaliação dos limiares nociceptivos.....	35
3.3.1. Teste de Von Frey filamentos.....	35
3.3.2. Optogenética.....	36
3.3.3. Quimiogenética.....	37
3.4. Tratamento com Tamoxifeno.....	39
3.5. Coleta das amostras.....	39
3.6. Imunofluorescência.....	39
3.7. Citometria de fluxo.....	40
3.8. Reanálises de dados de sequenciamento de RNA de célula única.....	40
3.9. Análise estatística.....	40
<b>4. Resultados</b> .....	42
4.1. Caracterização das fibras Neurotensinas (Nts)+ e Trkb+.....	43
4.2. Os neurônios Nts+ e Trkb+ não apresentam envolvimento na dor nociceptiva.....	51
4.3. Os neurônios Trkb+, mas não os Nts+, apresentam envolvimento na dor neuropática induzida por lesão.....	55
4.4. Os neurônios Trkb+, mas não os Nts+, apresentam	

envolvimento na dor neuropática induzida por quimioterápico.....	60
4.5. Os neurônios Nts+ não apresentam envolvimento com respostas nocifensivas, mas sim com respostar a coceira.....	65
4.6. Bloqueio dos neurônios Nts+ leva a redução da coceira induzida por histamina.....	71
<b>5. Discussão.....</b>	<b>73</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>79</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>86</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Dor

A dor é uma das adversidades que mais acomete a sociedade desde os primórdios, gerando um alto custo social, devido ao fato de provocar incapacidade nos indivíduos e assim, levar a prejuízos socioeconômicos significativos (VERRI et al, 2006).

A tentativa de compreender a dor remete ao primórdio dos seres humanos, as primeiras civilizações no Egito buscaram compreender o que seria a dor, passando pelos filósofos gregos, que classificaram como alteração nas ações naturais do ser humano, alterações no que chamavam de “humores”, até Descartes descreveu que a dor era resultado da discordância entre o sistema nervoso periférico e o encéfalo (BONICA, 1990; PRITHVI, 1996; TEIXEIRA; OKADA, 2003).

Porém, as compreensões da dor colocavam-na apenas como parte de um problema maior, ou seja, um sintoma de doenças subjacentes (RAFFAELI, ARNAUDO, 2017), contudo, atualmente compreende-se que a dor é um “reflexo de proteção” e que agregada a dor, há experiências emocionais anteriores que fazem com que o indivíduo possa relatar de maneira diferente a sensação dolorosa, isso ocorre da correlação entre a resposta biológica e psíquica (SHERRINGTON, 1947). Sabendo disso, a Associação de Internacional para Estudo da Dor (IASP), classificou a dor como uma resposta gerada após o reconhecimento de um estímulo nocivo, sendo descrita como uma experiência emocional e sensorial desagradável, associada ou não a uma lesão tecidual real ou potencial (RAJA et al, 2020).

Sendo assim, mesmo a dor possuindo seu papel fisiológico e anatômico na detecção e transmissão de mensagens compreendidas como dolorosas, mediadas pelos receptores sensoriais específicos (nociceptores) (NOBACK et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999), a dor se torna única para um indivíduo devido ao seu vínculo com o emocional, havendo sempre uma experiência passada associada, o que desencadeia a aprendizagem e conseqüentemente a lembrança (LOESER; MELZACK, 1999).

Fisiologicamente a dor está envolvida com a evolução e sobrevivência das espécies, pois constitui um mecanismo de proteção evocado por um estímulo nocivo (SHERRINGTON, 1947), contudo a dor também pode ser classificada como patológica, quando perde seu papel fisiológico de proteção do corpo contra

possíveis danos e lesões (WOOLF, 2010). Vista disso, a dor patológica pode ser classificada principalmente em inflamatória e neuropática.

A inflamatória está relacionada com a resposta a uma lesão tecidual ou após o reconhecimento de um agente estranho ao organismo pelo sistema imunológico, que produzirá mediadores inflamatórios como citocinas, ATP e bradicinina (KIDD, URBAN, 2001), na tentativa de remoção desse organismo ou toxina, além de levarem a ativação mecanismos de reparo tecidual. Os mediadores inflamatórios levam à alteração na plasticidade neuronal, e assim ao aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de dor a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor (FLÓREZ, 1993; MILLAN, 1999). Sendo assim, a dor de origem inflamatória pode ser compreendida como a interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios.

Contudo, a dor pode se tornar prolongada, apresentando duração maior que 3 meses passando a ser classificada como crônica. Dentro da dor crônica se destaca a dor neuropática, que é compreendida como reações musculoesqueléticas e psicocomportamentais, induzindo incapacidade (CLAPHAN, 2003). A dor neuropática apresenta uma incidência de 17,9% na população mundial (SMITH; TORRANCE, 2012).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo de Dor (do inglês International Association for the Study of Pain - IASP) a dor neuropática está relacionada a lesão ou doenças associadas ao sistema nervoso somatossensorial (IASP, 2012), podendo ser desencadeada por estímulos como diabetes, quimioterápicos e por compressão ou lesão do nervo (CAMPBELL; MEYER, 2006), levando a alterações na percepção da dor, como o surgimento da anodinia, isso é, um estímulo que antes em condições normais não era doloroso e passa a apresentar uma resposta dolorosa (IASP, 2012).

Entretanto, a percepção da dor, tanto fisiológica como patológica, está relacionada com dois componentes principais, a percepção e nocicepção. A percepção da dor é uma função integradora modulada por condições emocionais e psicológicas, como já discutido anteriormente. Já a nocicepção, ou a sensação nociceptiva, resulta da ativação de subpopulações específicas de neurônios sensoriais primários especializados em reconhecer e transmitir estímulos

nocivos, chamados de como neurônios sensitivos nociceptivos (NSN) ou nociceptores (VERRI et al, 2006).

## **1.2. Nociceptores**

O reconhecimento de diferentes estímulos pelos nosso corpo ocorre por meio de neurônios especializados, chamados de neurônios sensoriais, tal reconhecimento é fundamental para permitir que consigamos interagir com o ambiente a nossa volta. E não é diferente quando falamos do reconhecimento de estímulos nocivos, como mecânicos, térmicos e químicos; porém há um subtipo de neurônios sensitivos específico para tal e são denominados neurônios sensitivos nociceptivos (NSN).

Os corpos celulares dos NSN se encontram localizados nos gânglios, tanto nos da raiz dorsal quanto nos trigeminais, e possuem um ramo axonal distal, que inerva a periferia e será responsável pela detecção dos estímulos nocivos nos tecidos e pela transmissão do potencial de ação gerado para o corpo celular e um outro prolongamento axonal proximal, que se comunica com neurônios na medula espinhal e do tronco encefálico (dependendo do gânglio), que são responsáveis pela condução dos potenciais de ação do corpo do neurônio (após reconhecimento do estímulo) para as vias superiores para que ocorra o entendimento do sinal, reconhecimento da dor e se de início ao processo resolutivo (BASBAUM, 2009; GARLAND, 2012).

Com o tempo, viu-se que havia diferença entre as fibras aferentes distais, ou seja, havia a necessidade de uma classificação dos NS e conseqüentemente do NSN, sendo assim, estudos começaram a propor uma classificação inicial onde os NS foram agrupados de acordo com sua morfologia e função (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2000; JULIUS, BASBAUM, 2001; BROOKS, TRACEY, 2005).

Inicialmente, foram criados três grupos de neurônios sensoriais: A $\beta$ , A $\delta$  e C. As A $\beta$  são fibras mielinizadas, possuem grande diâmetro e conseqüentemente uma condução rápida dos sinais, acreditava-se que elas eram responsáveis somente pelo reconhecimento de estímulos mecânicos inóculos, porém um estudo mais recente evidencia que a ativação de fibras A $\beta$  poderiam ativar vias nociceptivas na medula espinhal, o que estaria envolvido no desenvolvimento alodinia durante a dor patológica, como as neuropatias

periféricas (BASBAUM et al, 2009). Ainda dentro do grupo das fibras A, temos as A $\delta$ , que também são mielinizadas, possuem diâmetro médio, possuem uma rápida condução e são responsáveis pela dor aguda localizada. Dentro do grupo das A $\delta$  ainda ocorre outra subdivisão, podendo ser do tipo I, que respondem a estímulos mecânicos e químicos, com alto limiar para estímulos de calor; ou do tipo II, com um baixo limiar para estímulos de calor e alto limiar para estímulos mecânicos (BROOKS, TRACEY, 2005; BASBAUM et al, 2009; GARLAND, 2012).

Já as fibras C são caracterizadas por não possuírem bainha de mielina, sendo assim a velocidade de condução dos estímulos por essas fibras é lenta, apresentam característica polimodal, ou seja, respondem a diferentes estímulos, como mecânico, térmico e químico, também tem a capacidade de responder ao prurido. As fibras C são responsáveis pelo que conhecemos como dor difusa e de longa duração. (BROOKS, TRACEY, 2005; BASBAUM, 2009; GARLAND, 2012).

Ao longo do tempo as fibras C passaram por mais uma subdivisão de acordo com a expressão e síntese de alguns peptídeos. Devido a isso, temos então, atualmente, as fibras do tipo C peptidérgicas, que liberam peptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O outro grupo então de fibras C passou a ser conhecido como não peptidérgicas, e são caracterizadas pela expressão de canais específicos ativados por ATP, o P2X<sub>3</sub> (JULIUS, BASBAUM, 2001), e apresentam ligação para a isolectina IB4.

Contudo a classificação dos NSN foi estabelecida somente considerando marcadores morfofuncionais. Contudo, estudos começaram a demonstrar que havia controvérsia em relação ao real envolvimento dos neurônios sensitivos no reconhecimento de diferentes estímulos, como por exemplo. Foi demonstrado que o desenvolvimento da alodinia está relacionado com alterações nos neurônios sensitivos não nociceptivos A, responsáveis por estímulos inócuos, passando a atuarem como NSN, outros demonstraram que os NSN de limiares de ativação baixo sofrem alteração na plasticidade e passam a reconhecer estímulos inócuos como nocivos (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; MA, 2012; DHANDAPANI et al., 2018; CHAMESSIAN et al. 2019).

Devido ao fato de ter sido determinado a necessidade de uma nova classificação, mais detalhada, dos grupos de fibras nervosas sensitivas e do

envolvimento de cada uma nos diferentes tipos de dor. Sendo assim, diferentes grupos veem tentando definir, principalmente por meio dos transcriptomas de gânglios da raiz dorsal (GRD), como dos neurônios isolados, uma nova classificação, com características mais robustas (LACROIX-FRALISH et al., 2011; USOSKIN et al, 2015). Recentemente foi proposta uma classificação baseada em estudos transcricionais desses neurônios sensitivos, foram determinados novos marcadores e um novo arranjo para os diferentes neurônios sensitivos periféricos (Anagrama 1) fundamentada em dados obtidos através do sequenciamento de RNA de uma única célula (“single-cell RNAseq”) (USOSKIN et al, 2015).

### **1.3. Nova classificação neuronal**

Recentemente foi proposta uma classificação baseada em estudos transcricionais desses neurônios sensitivos, foram determinados novos marcadores e um novo arranjo para os diferentes neurônios sensitivos periféricos fundamentada em dados obtidos através do sequenciamento de RNA de uma única célula (“single-cell RNAseq”) (USOSKIN et al, 2015).

A nova classificação se fez necessária pois, estudo demonstraram que fibras classificadas como não-nociceptivas teriam envolvimento no desenvolvimento da neuropatia, atuando na sensibilização central em circunstâncias de lesões nos neurônios, sendo assim os dados demonstraram que as fibras A $\beta$ , que em homeostasia respondem apenas a estímulos inócuos, passam a atuar como nociceptoras, sendo responsáveis pela alodinia mecânica em casos de neuropatia (LATREMOLIERE, WOOLF, 2009; CHAMESSIAN et al, 2019). Além disso, também foi observado que o bloqueio seletivo das fibras A $\beta$  levou a uma redução da hiperalgesia em pacientes com dor neuropática (CAMPBELL et al, 1988). Ademais, também existem evidências que a depleção específica de um subgrupo de neurônios A $\beta$ , os Trib.+, é capaz de prevenir o desenvolvimento da alodinia mecânica em camundongos após a indução da dor neuropática (DHANDAPANI et al, 2018).

Ficou evidente a necessidade de uma nova reclassificação das fibras sensoriais. O trabalho de Usoskin e colaboradores (2015), vem sendo considerado uma das melhores alternativas para uma nova classificação, pois empregando a técnica de sequenciamento RNA de célula única (single-cell RNA-

Seq) em células de GRD lombar de camundongos, eles conseguiram encontrar e agrupar os neurônios através de marcadores transcricionais expressos em comum entre eles, permitindo então reagrupá-los em diferentes populações que possuíam característica transcricionais. A nova classificação proposta para os

NF1	NF2	NF3	NF4	NF5	NP1	NP2	NP3	PEP1	PEP2	TH
LDHB CACNA1H TRKB <sup>high</sup> NECAB2	LDHB CACNA1H TRKB <sup>low</sup> CALB RET	LDHB TRKC <sup>high</sup> FAM19A1 RET	LDHB TRKC <sup>low</sup> PV SSP1 CNTNAP2	LDHB TRKC <sup>low</sup> PV SSP1 CNTNAP2	PLXNC1 <sup>high</sup> P2X3 GFRA2 MRGPRD	PLXNC1 <sup>high</sup> P2X3 TRKA CGRP MRGPRA3	PLXNC1 <sup>high</sup> P2X3 SST	TRKA CGRP KIT TAC1 PLXNC1 <sup>low</sup>	TRKA CGRP KIT CNTNAP2 FAM19A1	PIEZO2 <sup>high</sup> VGLUT3 GFRA2
LTMR's		Proprioceptors			Non-Peptidergic			Peptidergic		C-LTMR's
Myelinated		Myelinated			Unmyelinated			Myel.		Unmyel.
NEFH	NEFH RET	NEFH RET	NEFH ASIC1	NEFH ASIC1	RET TRPA1 TRPC3 NAV1.8/9	RET TRPV1 TRPA1 TRPC3 NAV1.8/9	RET TRPV1 TRPA1 TRPC3 NAV1.8/9	TRPV1 NAV1.8/9	Myel. NEFH NAV1.8/9	Unmyel. RET TRPA1 NAV1.8/9

neurônios sensoriais periféricos é apresentada no Anagrama 1 (USOSKIN et al, 2015).

Anagrama 1 - Proposta de nova classificação de neurônios sensoriais com base em análises de transcriptoma de RNA. Os produtos genéticos no topo são novos marcadores sugeridos para identificação de subtipos de neurônios sensitivos (em vermelho os novos marcadores; e em preto, marcadores previamente selecionados). Os marcadores ao final são exemplos de uma distribuição de produtos genéticos comumente estudados no campo. Enquanto que a classificação funcional anterior é indicada abaixo dos parênteses (Myel. Ou Mielinizado; e Unmyel ou não mielinizado) (adaptado de Usoskin et al, Nature Neuroscience, 2015).

Já se iniciou uma avaliação mais detalhada do envolvimento de cada novo subtipo de neurônios na detecção de diferentes estímulos, buscando assim compreender o papel dessas novas subpopulações tanto no reconhecimento da dor nociceptiva (fisiológica) quanto na dor patológica (BANGASH et al., 2018). Destacamos os subgrupos de fibras sensitivas NF1, que utiliza como marcador específico o Trkb (anteriormente classificadas como fibras sensitivas do tipo A $\beta$ ), e as NP3 utilizando como marcador específico a Neurotensina (classificadas anteriormente como fibras sensitivas não peptidérgicas do tipo C).

Os neurônios NF1 são neurônios mecanorreceptores de baixo limiar de ativação, são mielinizados e anteriormente eram classificadas como fibras A $\beta$ , além disso as NF1 apresentam uma alta expressão do receptor de tirosina

quinase B (Trkb) (USOSKIN et al, 2015). O Trib. já era proposto como um marcador de mecanorreceptores A $\beta$  de rápida adaptação, além disso tais neurônios por serem mecanorreceptores extremamente sensíveis sempre estiveram presentes nas discussões dos mecanismos de sinalização da alodinia mecânica durante a dor neuropática, contudo as evidências de seu envolvimento começaram a surgir recentemente (DHANDAPANI et al, 2018).

Os neurônios NP3 possuem pequenos diâmetros e foram agrupados por apresentarem a expressão de receptores de histamina, serotonina e substâncias relacionadas com o prurido, sendo um indicativo para o provável papel dessas fibras sensitivas, envolvimento na transdução da coceira inflamatória (USOSKIN et al, 2015). Também foi observado, que diferentemente do que era mostrado na classificação anterior, a população NP3 não apresenta marcadores clássicos de fibras C não peptidérgicas, como o P2X3 e o IB4 (STANTCHEVA et al, 2016). O perfil de expressão gênica das NP3 causa controvérsia quanto ao seu real papel, se teriam realmente envolvimento na nocicepção ou somente na coceira.

Já que a Neurotensina (Nts) e a somatostatina (Sst) foram identificados como marcadores específicos do grupo NP3 por conta de sua expressão exclusiva (USOSKIN et al, 2015), pois é bem descrito na literatura o envolvimento desses peptídeos na sinalização do prurido (HUANG et al, 2018; SHARIF et al, 2020).

Sabe-se que a Neurotensina é um peptídeo presente no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal, atuando principalmente na modulação de vias dopaminérgicas e neuroendócrinas (ST-GELAIS, JOMPHE, TRUDEAU, 2006). Contudo nesse trabalho ela foi usada exclusivamente como marcador específico dos neurônios NP3.

Sabe-se que ainda há controvérsia no envolvimento desses neurônios sensitivos nas vias de nocicepção, a elucidação do envolvimento dessas novas subpopulações de fibras sensitivas na detecção de diferentes estímulos nocivos, contribuirá para uma compreensão mais precisa das sinalizações nociceptivas periféricas e centrais, e assim auxiliará diretamente futuros trabalhos que busquem o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento da dor. Sendo assim, nossa hipótese é que os subgrupos de fibras sensoriais Trkb+ e Nts+, anteriormente fibras A $\beta$  e C não peptidérgicas, respondem a estímulos de forma distinta à relatada na classificação tradicional.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivos gerais**

Caracterização do envolvimento das fibras nervosas sensitivas Trkb+ e Neurotensina+ em resposta a estímulos nocivos.

## **2.2. Objetivos específicos**

### **2.2.1. Caracterização dos neurônios sensitivos Trkb+ e Neurotensina+.**

Sabendo-se da alteração da classificação das fibras nociceptivas periféricas, o primeiro passo foi investigar então o arranjo e localização das novas subpopulações no sistema nervoso periférico e central.

### **2.2.2. Avaliação do envolvimento dos neurônios sensitivos Trkb+ e Neurotensina+ na dor nociceptiva e neuropática**

**Experimentos de ganho de função.** Para esse objetivo foram utilizados os camundongos das linhagens Ntrk2-CreERT2, Nts-Cre e Nav1.8-Cre cruzados com os camundongos Dredd-hM3Dq- Flox (Zhu et al., 2016). Os animais Dredd expressam receptores desenhados especificamente para drogas comumente inertes, como no caso dos nossos animais onde são ativados pela closapina-N-óxido (CNO), que em condições normais é inerte. Sendo assim, os animais gerados desse cruzamento possuem o receptor expresso somente nas fibras de interesse, e quando foram tratados com o CNO localmente (na pata) somente essas fibras foram ativadas, permitindo avaliar se essas fibras isoladamente são capazes de levar ao desenvolvimento de nocicepção. Outro modelo utilizado para o ganho de função foi o de optogenética, foram utilizadas as linhagens de camundongos Ntrk2-CreERT2, Nts-Cre e Nav1.8-Cre cruzados com os camundongos Ai-32-Flox, que expressão o canal de rodopsina, foto sensível ao comprimento de onda 647, sendo assim quando os camundongos provenientes desse cruzamento foram estimulado na pata com LED com comprimento de onda de 647, ocorreu ativação específica dos subtipos neuronais, permitindo avaliar isoladamente o papel de cada um deles

**Experimentos de perda de função.** Para esse objetivo foram utilizados os camundongos das linhagens Ntrk2-CreERT2, Nts-Cre e Nav1.8-Cre cruzados com os camundongos Dredd-hM4Di- Flox (Zhu et al., 2016). Os animais Dredd expressam um receptor desenhado especificamente para reconhecer somente

drogas inertes, como a closapina-N-óxido (CNO), que em condições normais é inerte para o animal. Sendo assim, os animais gerados desse cruzamento possuem o receptor expresso somente nas fibras de interesse, e quando foram tratados com o CNO localmente (na pata) somente essas fibras foram bloqueadas, permitindo avaliar se essas fibras isoladamente são capazes de reduzir o desenvolvimento de nocicepção.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

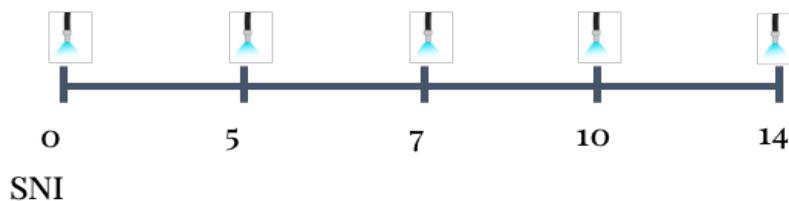
### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos machos C57/Bl6, de linhagem isogênica selvagem, camundongos C57/Bl6 Ntrk2-Cre-ERT2 (RUTLIN et al, 2014), camundongos C57/Bl6 Nts-Cre (LEINNINGER et al., 2011), camundongos C57/Bl6 Nav1.8-Cre (STIRLING et al., 2005), camundongos C57/Bl6 TdTomato-Flox (MADISEN et al., 2010), camundongos C57/Bl6 Dredd-hM3Dq-Flox (ZHU et al., 2016), C57/Bl6 Dredd-hM4Di-Flox (ZHU et al., 2016) e camundongos ChR2(H134R)-EYFP-Flox (Ai32) (MADISEN et al., 2012) provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP)- Campus de Ribeirão Preto, do Centro de Criações de Camundongos Especiais (CCCE) Campus de Ribeirão Preto ou do biotério de criação da Clínica Médica do Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas pela IASP (do inglês International Association for the Study of Pain) com a finalidade de minimizar o sofrimento animal durante todo o curso do procedimento experimental. E todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob o número 173/2019. Para controle da expressão genica dos marcadores foram feitas as confirmações por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **3.2. Modelos experimentais**

#### **3.2.1. Dor neuropática induzida por lesão do nervo periférico**

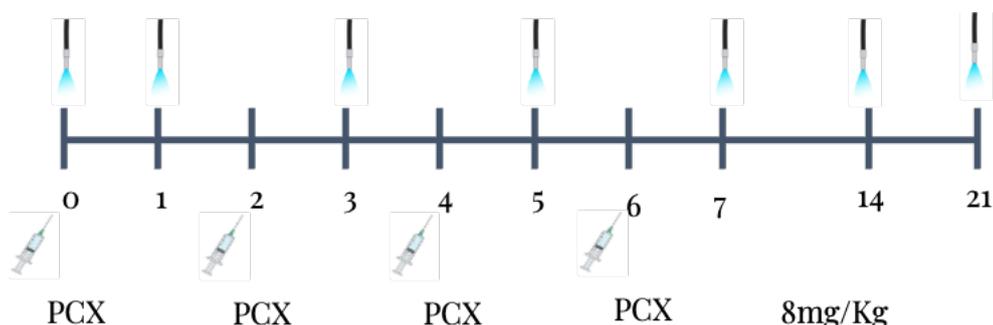
Os animais, após anestesiados com isoflurano 1,5% (via inalatória), foram submetidos ao modelo de lesão do nervo SNI (Spared Nerve Injury), que consiste na ligadura por fio de sutura seguido da transecção de dois (peroneal e tibial) dos três ramos do nervo isquiático, como descrito por Bourquin e colaboradores (2006). Para estabelecer os limiares basais de cada animal foram feitos os testes comportamentais 24h antes da indução da lesão. E avaliados os dias 5, 7, 10, 14 após a lesão (Anagrama 2).



Anagrama 2 – Desenho experimental da indução do modelo de SNI no dia 0. E as avaliações comportamentais foram feitas no dia 0 antes da lesão nos dias 5, 7, 10 e 14 dia após a lesão.

### 3.2.2. Dor neuropática induzida por quimioterápico

Os camundongos receberam por via intraperitoneal 4 doses de 8 mg/kg em dias alternados de paclitaxel (ONTAX®), totalizando ao fim do tratamento 32 mg/kg por animal (WANDERLEY; MAGANIN et al, 2022). Para estabelecer os limiares basais de cada animal foram feitos os testes comportamentais antes do início dos tratamentos. E avaliados os dias 1, 3, 5, 7, 14, 21 após a primeira administração do quimioterápico (Anagrama 3).



Anagrama 3 – Desenho experimental do tratamento dos animais com Paclitaxel nos dias 0, 2, 4 e 6 com totalizando quatro dose de 8mg/Kg cada. E as avaliações comportamentais foram feitas no dia 0 antes do tratamento e sempre 24h após o tratamento, sendo avaliado até o 21º dia após início do tratamento.

### 3.3. Avaliação dos limiares nociceptivos

A sensibilidade a estímulos mecânicos foi avaliada pelo teste pelo teste de Von Frey filamentos e a dos limiares térmicos foi feita por meio dos testes de acetona.

#### 3.3.1. Teste de Von Frey filamentos

Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 30-40 minutos antes

do experimento, para habituação ao ambiente. Os limiares de retirada da pata foram determinados usando uma série de filamentos de von Frey (0,008 a 1,4 g) pressionados contra a superfície plantar da pata traseira em ordem ascendente começando com a fibra mais fina. A resposta nociceptiva é caracterizada por flexão seguida de súbita retirada da pata. O filamento de menor força capaz de induzir resposta nociceptiva foi apresentado como limiar mecânico (g).

### **3.3.2. Optogenética.**

A expressão do canal de rodopsina 2 (ChR2) ocorreu por meio da utilização da Cre-LoxP. O ChR2 é um canal de cátions fotossensível que possui sua ativação máxima no comprimento de onda 473 nm, o que leva à despolarização dos neurônios, somente nas fibras de interesse (Trkb+, Nts+ e Nav1.8+) (LAKSO et al, 1992; BRITT, MCDEVITT, BONCI, 2012).

O sistema Cre-LoxP funciona por meio do reconhecimento dos sítios flanqueados por sequências *loxP* pela enzima recombinase Cre que é responsável por catalisar sua excisão do sítio. Nos camundongos Nav1.8-Cre ou Nts-Cre, a enzima Cre é expressa sob controle do promotor do gene que codifica a Neurotensina ou o canal Nav1.8, portanto somente nas células que expressão essas proteínas ocorre a expressão da Cre (KIM et al, 2016). Já nos animais Ntrk2-Cre-ERT2, a expressão de Cre está vinculada ao receptor de Tamoxifeno, sendo necessário primeiro tratar os animais com o Tamoxifeno (ver item 3.6). Nos animais ChR2(H134R)-EYFP-Flox (Ai32), o gene que codifica o canal ChR2 é controlado por um promotor com expressão ubíqua, e está separado do gene do ChR2 por um sinal de parada flanqueado por sequências *loxP* (KIM et al, 2016). Após o cruzamento dos animais das linhagens Cre com os camundongos Ai32, a prole gerada apresenta atividade da enzima Cre nas fibras de nosso interesse.

Os animais gerados dos cruzamentos então nos permitem estimular as fibras de forma exclusiva, através da utilização de um LED em comprimento de onda de 473nm. Sendo assim avaliamos as respostas dos animais das diferentes linhagens em condições *naive* (sem nenhuma neuropatia), tratados com paclitaxel (ONTAX®) e os que foram submetidos ao modelo de SNI. Os animais que não apresentaram a recombinação pela Cre (chamados aqui somente de Ai32-Flox) foram utilizados como controle negativo.

Para os experimentos foram utilizados os equipamentos da Thor Labs: LED de 470nm M470F3 (Thor Labs); LED Driver LEDD1B (Thor Labs); cabo de fibra ótica RJASF2 (Thor Labs); e o gerador de pulsos PulserPlus (Prizmatix), programado pelo software PulserPlus.

Os animais foram colocados em caixas de acrílico com um assoalho de malha de arame não maleável, 40 min antes do estímulo, para ambientação. Após a ambientação, foram feitos estímulos com LED na pata traseira direita durante 10 segundos e os comportamentos foram avaliados durante o período de estímulo e mais 10 segundos posterior ao estímulo. O pulso luminoso utilizado foi 5ms, e as frequências foram de 2, 5 e 10 Hz. As intensidades variaram durante os experimentos, sendo de 1, 2, 5, 9, 22, 41 e 54 mW/mm<sup>2</sup> (adaptado de CHAMESSIAN et al., 2019). Os comportamentos avaliados foram descritos na Tabela 1. E foi feito um intervalo de 5 minutos entre uma intensidade e outra e 10 minutos de uma frequência para outra.

Tabela 1: Comportamentos avaliados

<b>Comportamentos que serão avaliados</b>	<b>Especificação</b>
Elevação / Flutter	Movimento rápido para cima e para baixo; Elevações rápidas e repetidas em sucessão
Guarda / Segurar	Levantar a pata e segurar lateralmente no meio do corpo; Pata puxada para cima em direção ao fundo e segurar
Lamber	Levar a pata para a boca e lamber
Salto	As duas patas traseiras saem do chão
Vocalização	Som audível
Rear	O camundongo estende o corpo verticalmente e fica sobre as patas traseiras com o suporte do gabinete

Adaptado de CHAMESSIAN, et al. (2019)

### **3.3.3. Quimiogenética.**

#### **Ativação por quimiogenética**

Para tal os camundongos Ntrk2-Cre-ERT2, Nts-Cre e Nav1.8-Cre foram cruzados com os animais DREADD-hM3Dq-Flox. Foi utilizado os mesmos princípios do Cre-LoxP do item 3.4 para esse experimento. Sendo assim, os animais obtidos expressam o receptor hM3Dq somente nas fibras de interesse. O hM3Dq é um receptor que tem como função a ativação das células de interesse (que expressam ele), ele foi projetado baseado no receptor muscarínico humano M3, acoplado à proteína Gq, e só é ativado pelo seu ligante inerte, a clonazepina N-óxido (CNO), levando assim, a uma liberação de cálcio e a excitação neuronal (ZHU et al, 2016).

Os animais foram postos para ambientar na sala de experimentação por 40 min. Posterior a ambientação, foram injetados 10µL de CNO diluído em salina e DMSO, nas concentrações de 2,5, 5 ou 10 ng por pata, na região subplatar da pata traseira direita dos camundongos e as respostas comportamentais foram avaliadas durante 40 min. Os comportamentos considerados foram: elevação da pata, manter a pata erguida ou em guarda, saltar, lambe a pata e morder a pata.

Para o tratamento de CNO subcutâneo a dose utilizada foi de 1000 ng em 100 µL de uma solução de salina e DMSO (concentração de 10ng/µL) na nuca de animais Nts + Nav1.8+ e foi avaliado o tempo que o animal passada apresentando comportamento de coceira, a avaliação foi feita durante 30 min e os comportamentos avaliados foram de acordo com artigo publicado na revista “Neuron” por Sharif e colaboradores (2020).

#### **Bloqueio por quimiogenética**

Para tal os camundongos Ntrk2-Cre-ERT2, Nts-Cre e Nav1.8-Cre foram cruzados com os animais DREADD-hM4Di-Flox. Sendo assim, os animais obtidos expressam o receptor hM4Di somente nas fibras de interesse. O hM4Di é um receptor que tem como função o bloqueio das células de interesse (que expressam ele), ele foi projetado baseado no receptor acoplado à proteína Gq humano, e só é ativado pelo seu ligante inerte, a clonazepina N-óxido (CNO), levando assim, a um bloqueio da liberação de cálcio e assim bloqueio da excitação neuronal (ZHU et al, 2016).

Os animais foram postos para ambientar na sala de experimentação por 40 min. Posterior a ambientação, foi injetado 1µg de CNO subcutâneo diluído 100 µL de uma solução de salina e DMSO (concentração de 10ng/µl) na nuca dos animais Nts + e em seguida foi administrada histamina na dose de 100 µg

de histamina na nuca dos animais, e o o tempo que o animal passada apresentando comportamento de coceira foi avaliado, a avaliação foi feita durante 30 min e os comportamentos avaliados foram de acordo com artigo publicado na revista “Neuron” por Sharif e colaboradores (2020).

### **3.4. Tratamento com Tamoxifeno**

Os animais Ntrk2-Cre-ERT2; Ai-32 -flox, Ntrk2-Cre-ERT2; Dredd-hM4Di-Flox com 6 semanas foram tratados 5 dias consecutivos com a dose 2mg de Tamoxifeno (Sigma) diluído 200µl em óleo de milho para que ocorresse a recombinação da Cre (RUTLIN et al, 2014).

### **3.5. Coleta das amostras**

Os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.). Para a realização dos experimentos de imunofluorescência, os animais foram perfundidos com PBS (phosphate- buffered saline, pH 7,2- 7,4), em temperatura ambiente, por 2 minutos (5 ml/min) seguida de perfusão com paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,0) a 4°C por 6 minutos (5 ml/min). Em seguida, foi feita uma incisão craniocaudal no dorso do animal, seguida de abertura por planos, até a exposição das lâminas ósseas da coluna vertebral. Após laminectomia, a medula espinal lombar (L4-L6) foi exposta para coleta juntamente com os GRD correspondentes. Além disso, as patas e os nervos ciáticos foram coletadas para avaliar as terminações livres dos NS na periferia.

### **3.6. Imunofluorescência**

Os tecidos coletados foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado, pH 7,0, por 24 horas, a 4°C. As amostras fixadas foram criopreservadas com sacarose 30% a 4°C. Em seguida, as amostras foram congeladas em meio preservante Tissue- Tek® O.C.T. e crio-seccionadas (14 a 16 µm). Crio-seções foram deixadas 20 minutos em temperatura ambiente para secagem seguida de duas lavagens com 0,3% Triton-X 100 em tampão fosfato e salina esterilizado (PBS, pH 7.2-7.4) e uma lavagem com PBS apenas. Para reduzir as ligações a proteínas inespecíficas, as crio-seções foram incubadas com soro bovino 10% por 1 hora. Por utilizarmos animais reportes não foram aplicados anticorpos primários e secundários sobre as crio-seções. Após as lavagens foi aplicado o

anticorpo para núcleo (DAPI). As expressões dos marcadores fluorescentes foram analisadas por meio da microscopia confocal (Leica TCS-SP5 AOBS).

### **3.7. Citometria de fluxo**

Após coleta da pele o do DRG dos animais NTS-Cre;TdTomato-flox as amostras foram colocadas em colagenase 8 (Sigma) e meio de cultura incompleto para a suspensões de células e depois da dissociação a colagenase foi inativada usando soro fetal bovino 10%, as células foram marcadas com os anticorpos conjugados à fluorocromo, utilizamos o anticorpo de viabilidade e anti CD45, anti CD11b e anti Ly6G para determinar se as células imunes expressam NTS. As células foram adquiridas no citometro FACSCanto (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o software FlowJo (BD Biosciences).

### **3.8. Reanálises de dados de sequenciamento de RNA de célula única**

O banco de dados GSE154659 (USOSKIN et al, 2015) foi analisado usando o pacote Seurat versão 4.3.0 (STUART et al., 2019). Esses dados foram filtrados, log normalizados, integrados e dimensionados antes da redução de dimensionalidade e identificação de cluster. Para cada conjunto de dados, removemos células de baixa qualidade que têm mais de 10% de conteúdo de gene mitocondrial e contêm menos de 500 features (genes únicos). A análise de componentes principais foi utilizada definidas pelos autores dos bancos de dados. Com base nessas determinações, escolhemos os primeiros 20 PCs para identificação do vizinho mais próximo e uma resolução de agrupamento de 1,0 para localização de agrupamento. Finalmente, escolhemos o UMAP e tSNE como uma abordagem de redução de dimensionalidade não linear para visualizar clusters. A nomenclatura dos clusters foi definido a partir da anotação disponibilizada pelos próprios autores principais. Toda a análise scRNA-seq foi feita usando o software R versão 4.2.2 (R Core Team). Todos os gráficos scRNA-seq foram feitos usando ggplot2 versão 3.4.0 (WICKHAM, 2016).

### **3.9. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Comparações foram feitas utilizando análise de variância de duas vias (ANOVA two-way) seguida de teste de Bonferroni e Teste t de Student com múltiplas

comparações seguinte de teste de Holm-Sídák no software Graphpad Prisma  
8.4.3. O nível de significância foi considerado para valores de  $P < 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Caracterização das fibras Neurotensinas (Nts)+ e Trkb+

Iniciamos buscando compreender melhor as fibras Nts+ e se o Nts poderia ser usado como um marcador para essa subpopulação na nova classificação, buscamos compreender primeiro a expressão de Nts por meio da reanálise do sequenciamento de célula única (RNAseq) publicado por Usoskin e colaboradores (2015) e também por meio da imunofluorescência compreender melhor a localização dos neurônios que expressam Nts na periferia (pata) e no gânglio da raiz dorsal (GRD).

A reanálise do banco de dados de GRD nos mostrou que a população SST (somatostatina +) que também podemos descrever como a população NP3, apresenta de forma quase que exclusiva a expressão de Nts (Figura 1). Além disso, nossas análises demonstraram que mesmo as NP3 (SST) estarem anteriormente agrupadas com as Fibras C não peptidérgicas (Cnp), elas não compartilham características com a outra subpopulação (NP) que também era do grupo de fibras Cnp (Figura 2).

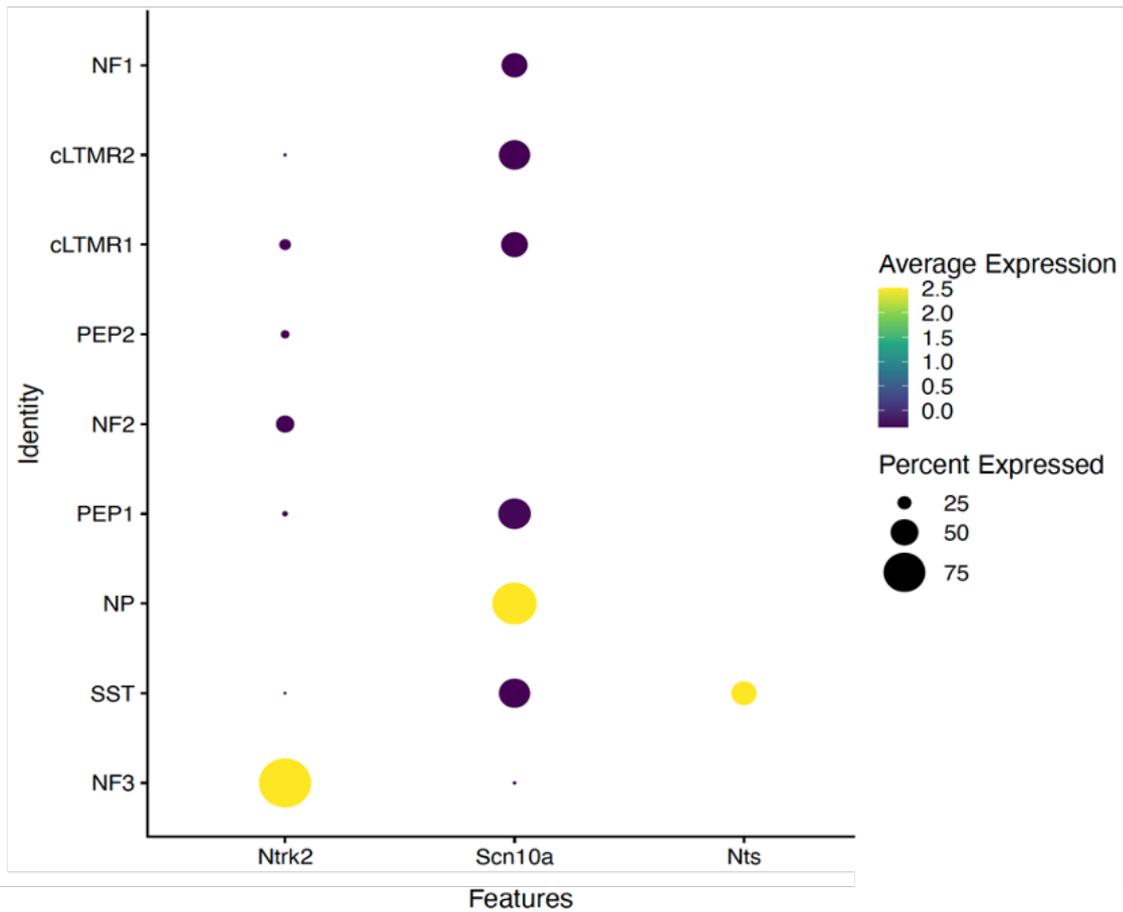
Já a expressão de Trkb ocorre de forma majoritariamente na subpopulação NF1 (Figura 1), contudo podemos ver expressões, baixas, em outras populações, como NF2. Nossa reanálise nos mostra que a subpopulação NF1 apresenta características de fibras mecanorreceptores de baixo limiar de ativação (Figura 2). Além disso, nossa reanálise nos mostrou que em situações de neuropatia, a expressão de Trkb aumenta na população NF2, que em situação homeostática (ou *naïve*) quase não apresenta tal expressão (Figura 3). Ademais podemos observar que as fibras da população NF1 não apresentam uma expressão significativa do canal Nav1.8 (Scn10a), um dos canais relacionados com a sinalização da dor, contudo na população de fibras SST vemos uma expressão mais significativa do Nav1.8, porém ainda é mais baixa que a expressão em outras populações, como NP (população anteriormente também classificada como Cnp) (Figura 1).

Dados anteriores do nosso grupo (WERLANG, 2022) já haviam demonstrado parte da caracterização dos neurônios Nts+, e demonstrara que tais neurônios exibiam uma colocalização com os neurônios que apresentam a expressão do canal Nav1.8 corroborando os dados de nossa reanálise (Figura 1). Utilizando animais Nts reporters, que expressam os neurônios Nts em verde,

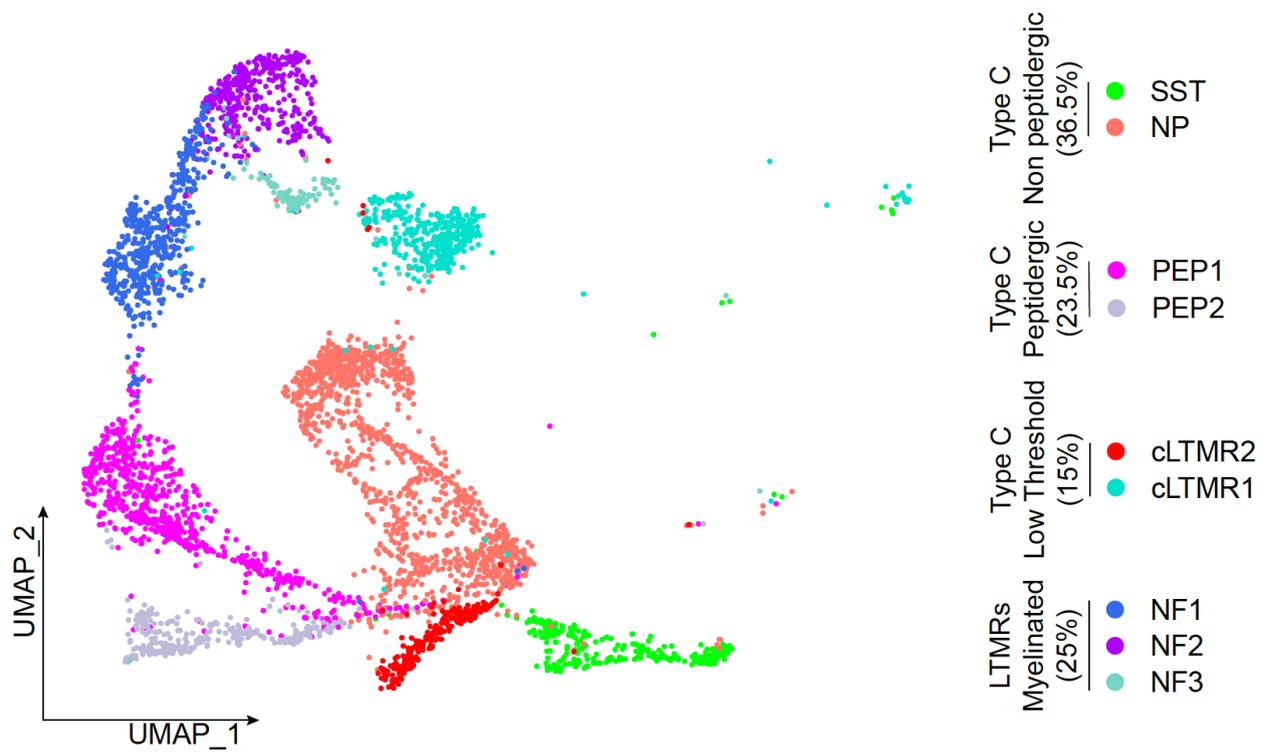
pudemos observar que Nts está expresso em uma pequena população de neurônios no GRD (Figura 4), como visto também na nossa reanálise do RNAseq. E analisando a imunofluorescência da pata dos animais podemos observar que as fibras Nts apresentam terminações nervosas livres e vemos que as fibras Nts possuem uma baixa inervação nas patas condizendo com o baixo número de neurônios no GRD que expressam Nts (Figura 5).

Nossos dados demonstram que existe uma população de células não neuronal que expressa Nts na região dos gânglios como mostrado pelas setas brancas (Figura 4), contudo não se sabe ao certo qual população celular estaria expressando neurotensina. Na tentativa de compreender melhor qual célula seria, utilizamos a técnica de citometria de fluxo da pele e do GRD dos camundongos Nts-Cre;Ai32-flox (animal que apresenta o repórter YFP nas células Nts), contudo nossos dados demonstram que a população Nts não está presentes em células hematopoiéticas envolvidas na regulação e ativação do sistema imunológico, marcadas por CD45+ observamos a populações Nts está nas células CD45-, (Figura 6 e Figura 7), possivelmente não sendo uma célula imune a expressar Nts.

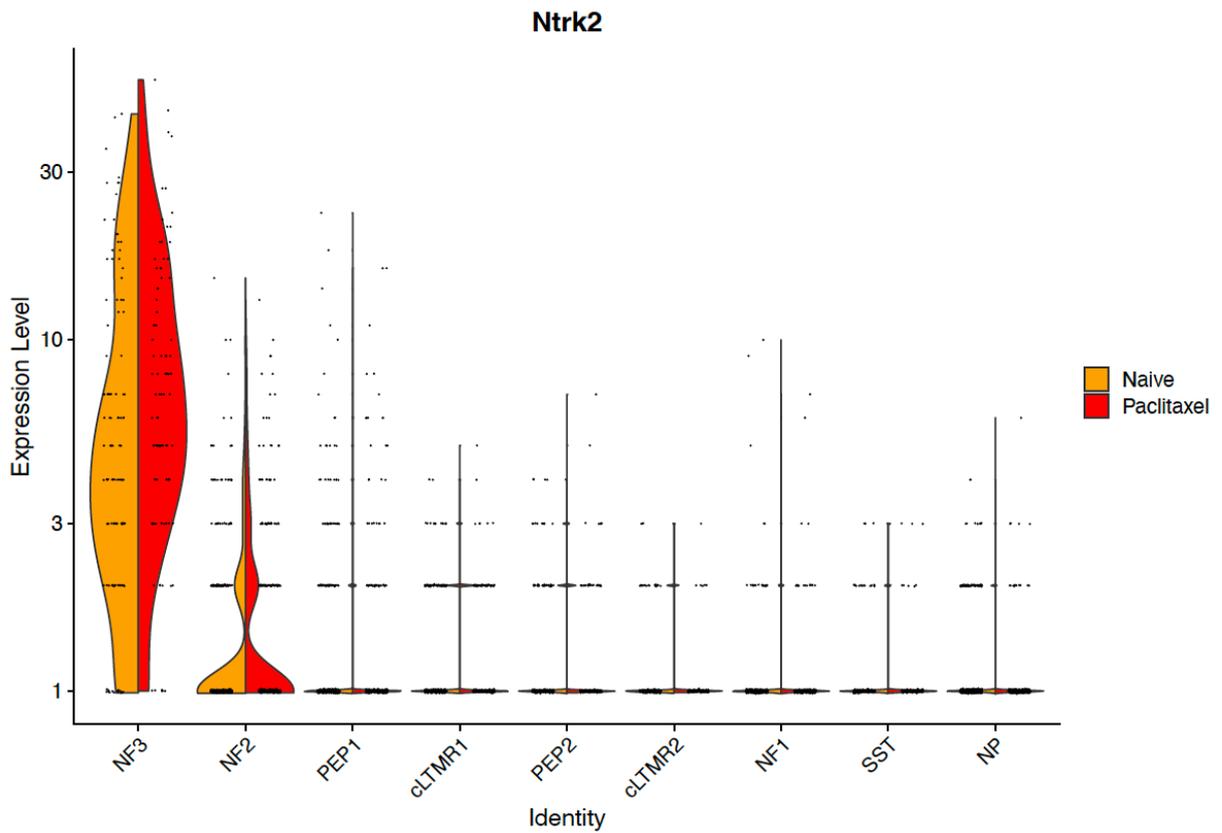
Sendo assim, nossos dados demonstram que o Nts é um marcador bastante exclusivo da subpopulação SST (NP3) e apesar de anteriormente ser classificada como fibras Cnp, as fibras Nts+ apresentam agrupamento distinto das outras fibras Cnp. Além disso nosso ensaio de imunofluorescência corroborou o achado da nossa reanálise, demonstrando que os neurônios Nts+ fazem parte de um pequeno subgrupo de neurônios de terminação livre, que expressam Nav1.8, podendo ter relação com as vias nociceptivas. Já as fibras NF1 o Trkb mesmo não sendo exclusivo é um bom marcador, devido a alta expressão dessa população e como na classificação antiga, as NF1 são mecanorreceptores de baixo limiar, contudo durante a neuropatia vemos uma alteração na expressão de Trkb nessas células.



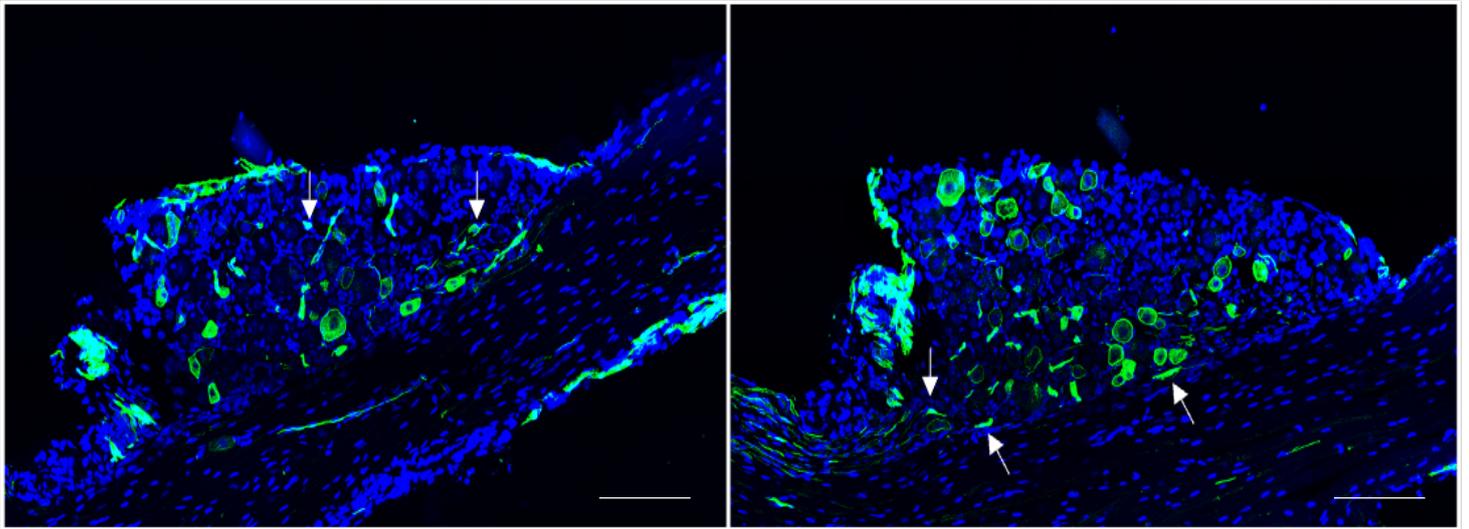
**Figura 1: Análise *Dotplot* da expressão genica dos marcadores neuronais em camundongos *naive*.** Os gráficos *dotplot* exibem a distribuição destacada de Ntrk2 (Trkb), Scn10a (Nav1.8) e Nts para cada população neuronal indicada.



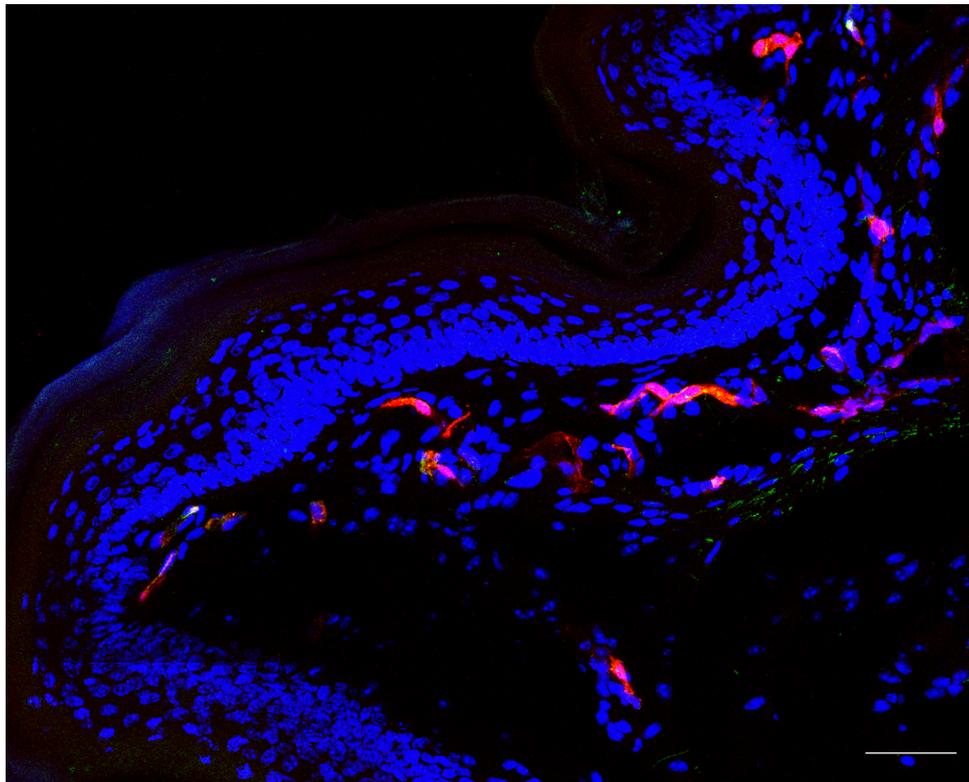
**Figura 2 : Análise UMAP (*Uniform manifold approximation and projection*) de GRD murino em modelo em condições *naive*. Distribuição das subpopulações neuronais de acordo com a nova classificação neuronal.**



**Figura 3: Análise da expressão de Ntrk2 no GRD de animais em condições *naïve* e neuropática.** Expressão de Ntrk2 (Trkb) nas diferentes populações neuronais em condições *naïve* e de dor neuropática induzida por quimioterápico (Paclitaxel).

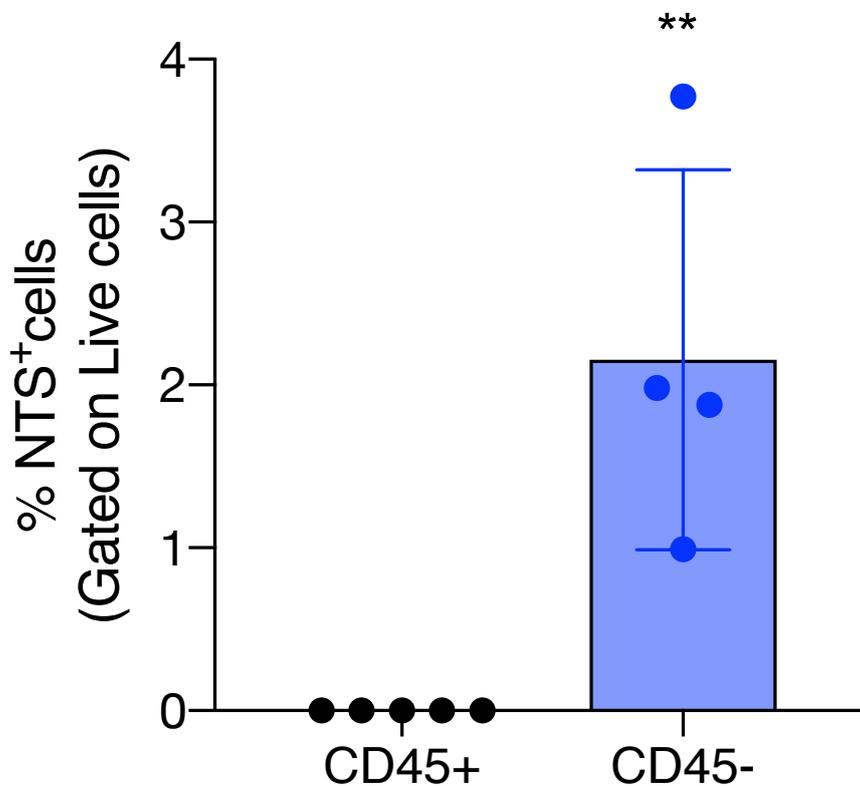


**Figura 4: Expressão de NTs no GRD de animais em condições *naive*.** Expressão de Nts (verde) no gânglio da raiz dorsal de camundongos. Em azul a marcação de núcleo (DAPI) em verde a expressão de Nts nos animais repórter Nts-Cre,Ai-32-flox. Escalas indicada de 100 $\mu$ m.

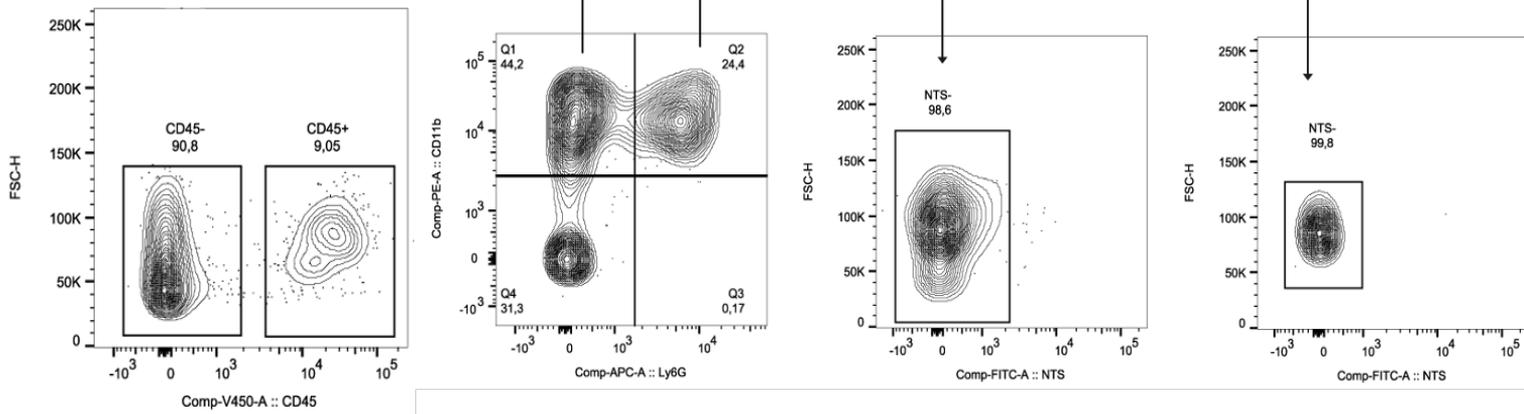


**Figura 5: Expressão de NTs na pata de animais em condições *naive*.** Expressão de Nts (vermelho) na pata de camundongo Nts-cre,TdTomato-Flox. Em azul a marcação de núcleo (DAPI) em vermelho a expressão das fibras Nts,

onde é possível ver as terminações livres dos neurônios Nts +. Escalas indicada de 100µm.



**Figura 6: População de células não neuronais do DRG que expressão Nts.** Porcentagem de células CD45+ e CD45- que expressão Nts, demonstrando que as células hematopoiéticas envolvidas na regulação e ativação do sistema imunológico. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 4-5 por grupo). Teste t não paramétrico, \*\* P< 0.005.



**Figura 7: Gates utilizada por citometria de fluxo.** Estratégia de *gates* utilizadas por realização da citometria de fluxo utilizada no experimento da figura 6, utilizamos mais marcadores dentro da população CD45+, para comprovação da não expressão de Nts nas células CD 45+.

## **4.2. Os neurônios Nts+ e Trkb+ não apresentam envolvimento na dor nociceptiva**

Buscando compreender a resposta das fibras Nts+ e Trkb+ quando ativadas, utilizamos os animais Nts-cre; Ai32-flox e Ntrk2-Cre-ERT2;Ai-32 associado com a optogenética e para levar a ativação específica dos neurônios em condições *naive*.

Os animais Ntrk2-Cre-ERT2;Ai-32 possuem a condição da Cre estar associada ao receptor de Tamoxifeno, sendo assim para que haja a recombinação e expressão do canal de rodopsina nas células Trkb+ os animais foram tratados inicialmente por 1 semana com Tamoxifeno, como descrito o item 3.6 e esperado mais 4 semanas para que ocorresse a recombinação nos neurônios de interesse.

Após a ambientação os animais foram submetidos ao estímulo do Led azul na pata direita traseira durante 10 segundo e os comportamentos foram filmados e analisados seguindo a tabela 1. Observamos que com o aumento da frequência do Led e da intensidade do estímulo os animais Nts+ apresentaram um aumento do comportamento quando comparado com o controle (Figura 8). Sendo na frequência de 10Hz e nas intensidades de 22 a 54mW/mm<sup>2</sup> onde eles apresentaram mais comportamentos e comportamentos mais distintos, como a lamber a pata traseira e aumento no comportamento de guarda.

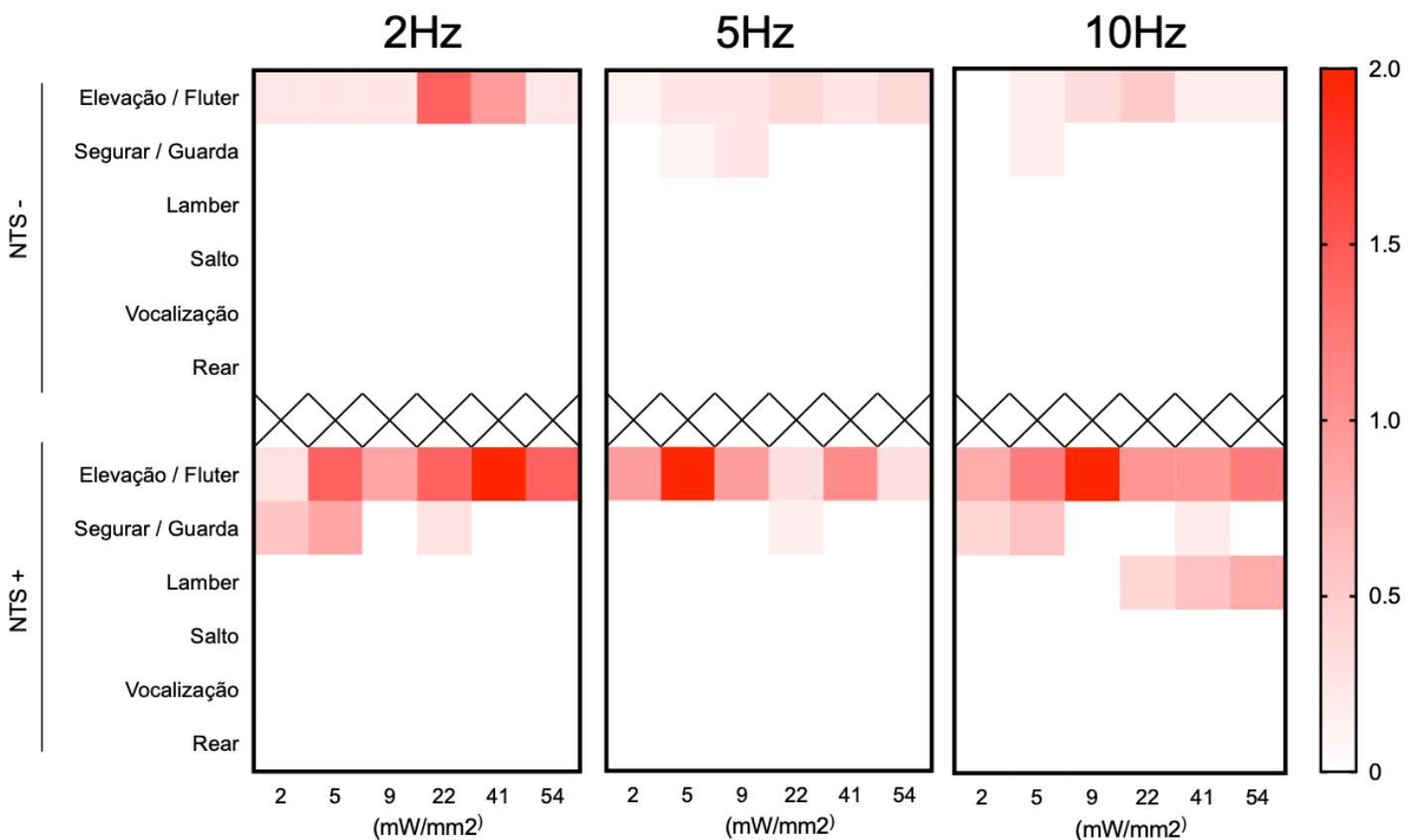
Já os animais Trkb+ não apresentaram resposta comportamentais de forma significativa, nem com o aumento da frequência e da intensidade (Figura 9), o que era esperado já que na classificação dessas fibras elas aparecem como sendo fibras que reconhecem estímulos inócuos.

Quando comparamos os animais Nts+ e Trkb+ com os animais Nav1.8-cre; Ai-32-flox os dois subgrupos não apresentam respostas comportamentais significativas (Figura 10). Os animais Nav 1.8+ foram utilizados como nosso controle positivo para comportamentos nocifensivos, devido ao fato de já existir a caracterização desses animais Nav1.8 na literatura (DAOU et al, 2013); foi possível observar que os animais Nav1.8 apresentam uma resposta nocifensiva muito mais exacerbada que os animais Nts+ Trkb+, e essa resposta aumenta de forma gradual com o aumento da frequência e da intensidade (Figura 10). Além disso, os animais Nav1.8 apresentam comportamentos como salto e vocalização

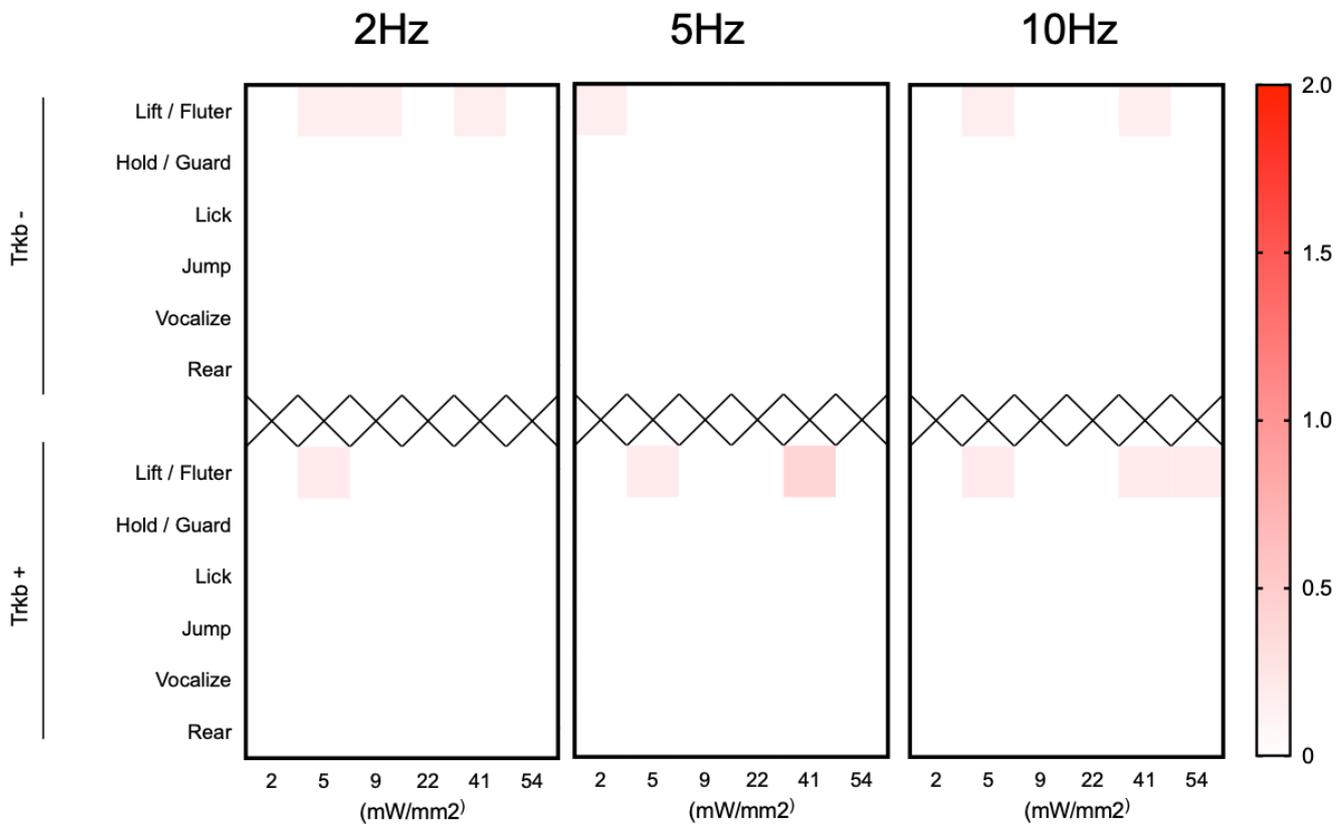
(audível sem o uso de equipamentos), marcadores que indicam uma resposta nocifensiva elevada, quando comparados com os Nts (Figura 10).

Após determinarmos os parâmetros dos comportamentos no basal e comparando com as respostas obtidas com os animais Nav1.8+ decidimos utilizar a frequência de 10Hz para os próximos experimentos, já que é a frequência onde os animais Nts e Trkb apresentam mais respostas.

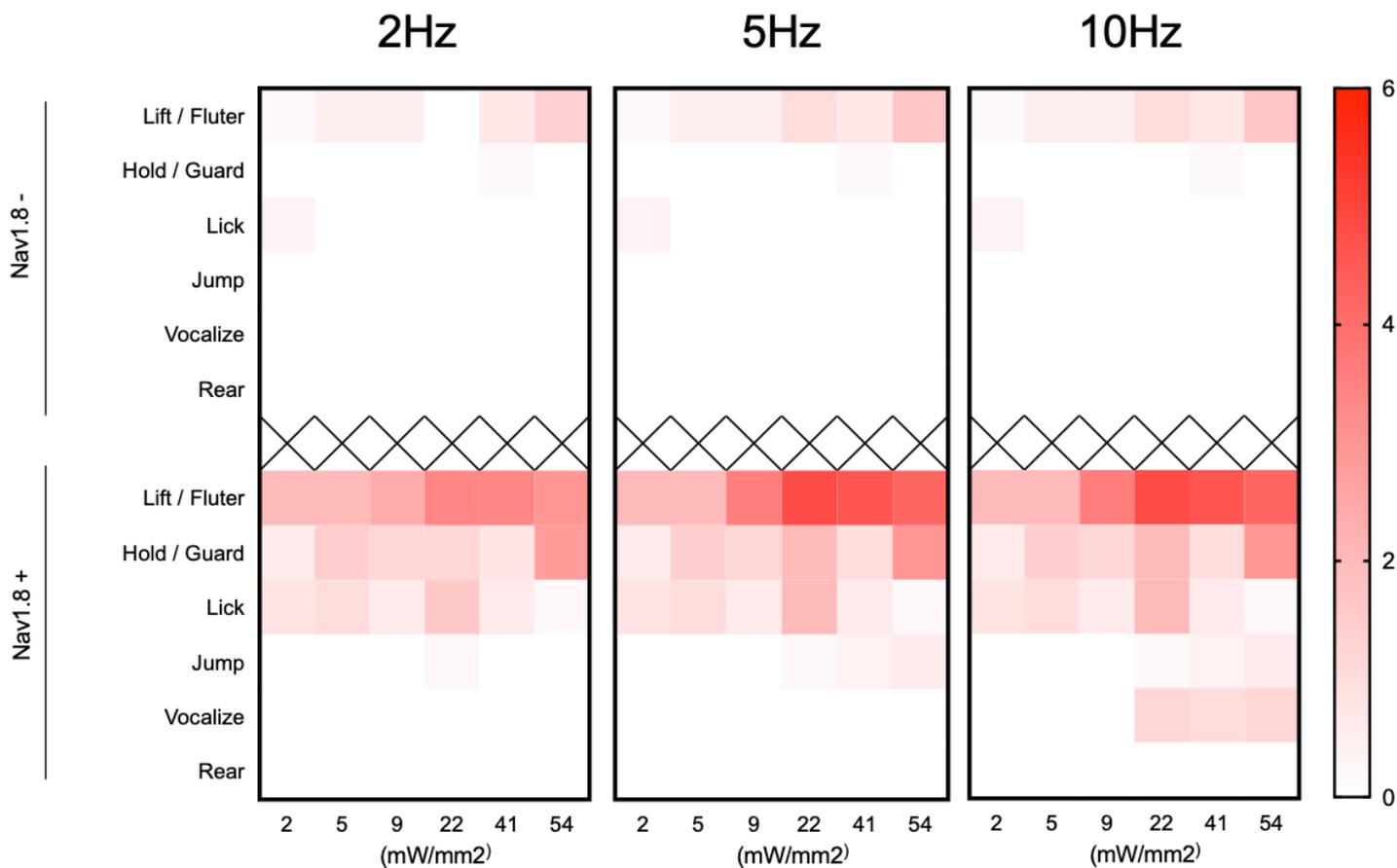
Nossos dados comportamentais utilizando a optogenética sugerem que aparentemente as fibras Nts+ e Trkb+ não apresentam um papel fundamental na sinalização de respostas nocifensivas em condições *naive*.



**Figura 8: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais Nts *naive*.** Animais Nts-cre,Ai32-Flox ou Nts-,Ai32-Flox estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequências de 2, 5 e 10 Hz. Demonstrando que com o aumento da frequência e da intensidade ocorre aumento da resposta comportamental nos animais Nts+, mas não nos Nts-. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 5-6 por grupo).



**Figura 9: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais *Trkb naive*.** Animais *Ntrk2-Cre-ERT2,Ai32-Flox* ou *Ntrk2-,Ai32-Flox* estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54  $mW/mm^2$  e frequências de 2, 5 e 10 Hz. Demonstrando que com o aumento da frequência e da intensidade não levou ao aumento da resposta comportamental nos animais *Trkb+*. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo ( $n = 6-7$  por grupo).



**Figura 10: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais Nav1.8+ *naive*.** Animais Nav1.8-Cre,Ai32-Flox ou Nav1.8-,Ai32-Flox estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequências de 2, 5 e 10 Hz. Demonstrando que com o aumento da frequência e da intensidade leva de forma gradual e dependente de frequência e intensidade ao aumento da resposta comportamental nos animais Nav1.8+, levando inclusive a comportamentos de vocalização. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 6-8 por grupo).

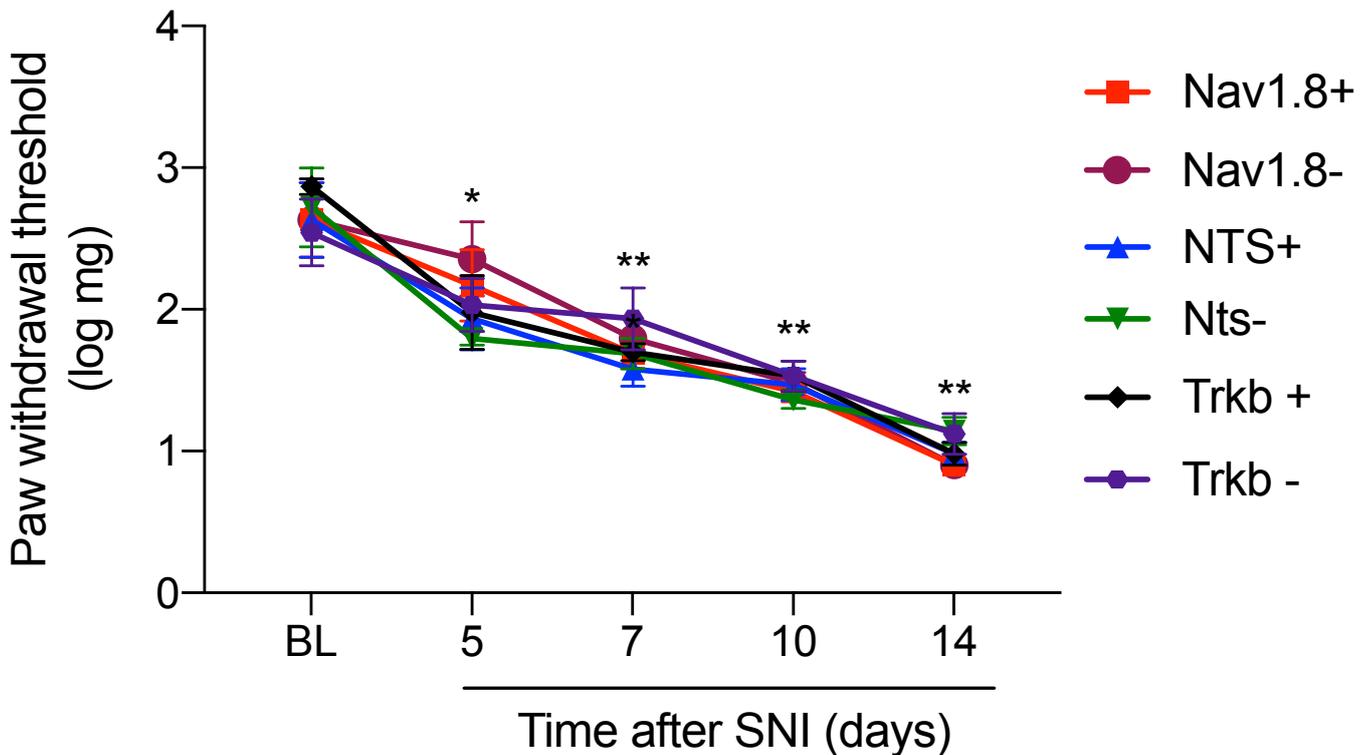
### **4.3. Os neurônios Trkb+, mas não os Nts+, apresentam envolvimento na dor neuropática induzida por lesão**

Após determinarmos a resposta em condições fisiológicas das fibras Nts e Trkb e observarmos que elas não apresentam um envolvimento com a resposta nocifensiva, fomos avaliar o seu papel na dor neuropática.

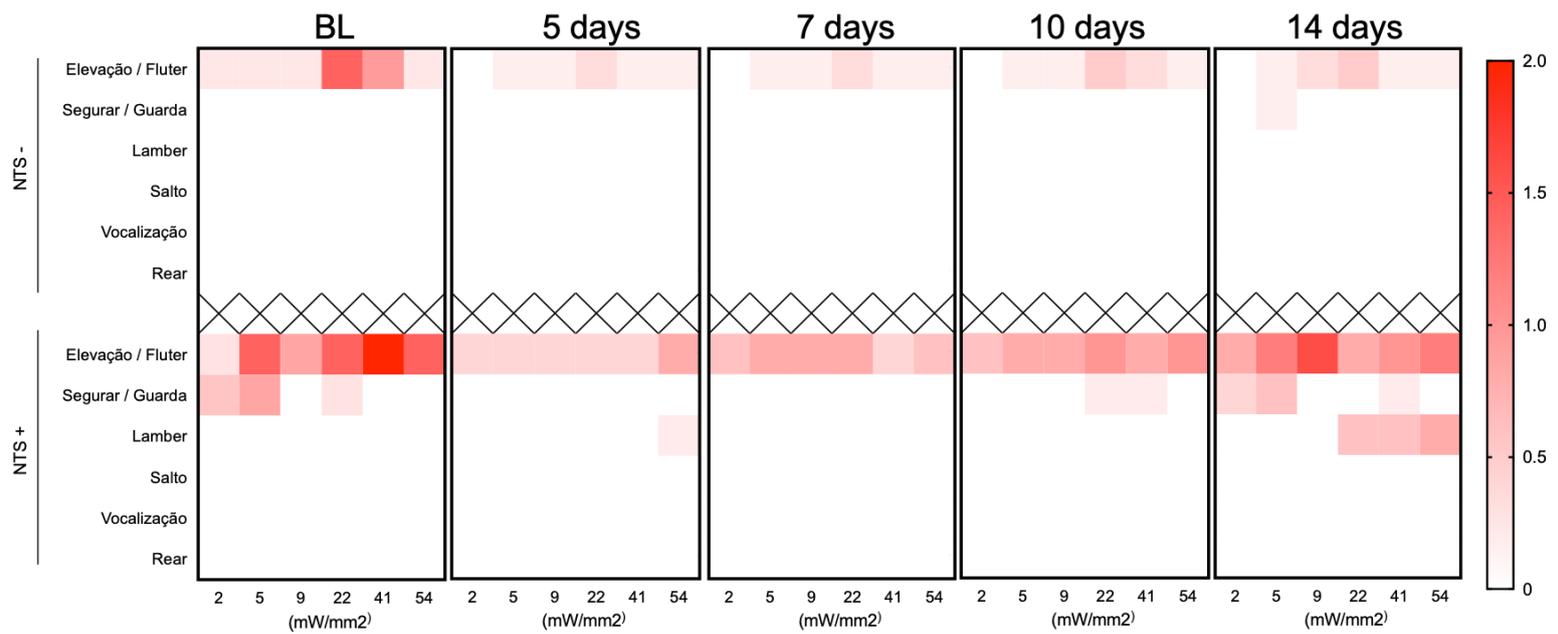
Inicialmente utilizamos o modelo de lesão do nervo ciático, o Spared Nerve Injury (SNI). Para determinarmos que o modelo estava levando ao desenvolvimento da neuropatia nos animais Nts-Cre;Ai32-flox e Ntrk2-Cre-ERT2;Ai-32 utilizamos o vonfrey filamento e o teste de acetona como controles, podemos observar uma redução do limiar de retirada de pata dos animais a partir do 5º dia após a indução do modelo de SNI e tal redução se mantém até o 14º dia, indicando que os animais desenvolveram dor neuropática (Figura 11). Junto à comprovação do modelo, avaliamos também a resposta comportamental dos animais por meio da optogenética.

Observamos que na frequência avaliada, de 10Hz, houve uma redução significativa dos comportamentos apresentados tanto dos animais Nts+ como dos Nav1.8+ nos dias 5 e 7 após SNI quando comparado com a resposta basal (Figura 12 e Figura 13). Contudo, os animais Trkb+ passaram a apresentar uma resposta comportamental de forma significativa no 7º e 14º dia após a lesão, quando comparado ao grupo controle, e com o aumento da intensidade pudemos observar um aumento das respostas, sendo na intensidade de 9mW/mm<sup>2</sup> onde os animais apresentaram maior número de comportamentos (Figura 14), contudo quando comparado com as respostas dos animais Nav1.8+ essa resposta não é significativa. A resposta dos animais Nav.18 e Nts+ na fase inicial da lesão possivelmente tenha relação com uma morte celular dos neurônios após a indução da lesão; contudo, a partir do 14º dia observamos uma recuperação das respostas dos animais, porém novamente o animal Nts+ apresenta menos resposta comparado com o basal e com os animais Nav1.8+ no 14º dia de lesão (Figura 12 e Figura 13). Tais resultado são esperados e consistente com os resultados aqui apresentados anteriormente, já que a população Nts+ expressa Nav1.8+, contudo em menor quantidade. Além disso a resposta dos animais Trkb condiz com a hipótese dessas fibras assumirem características de nociceptores em situações de neuropatia.

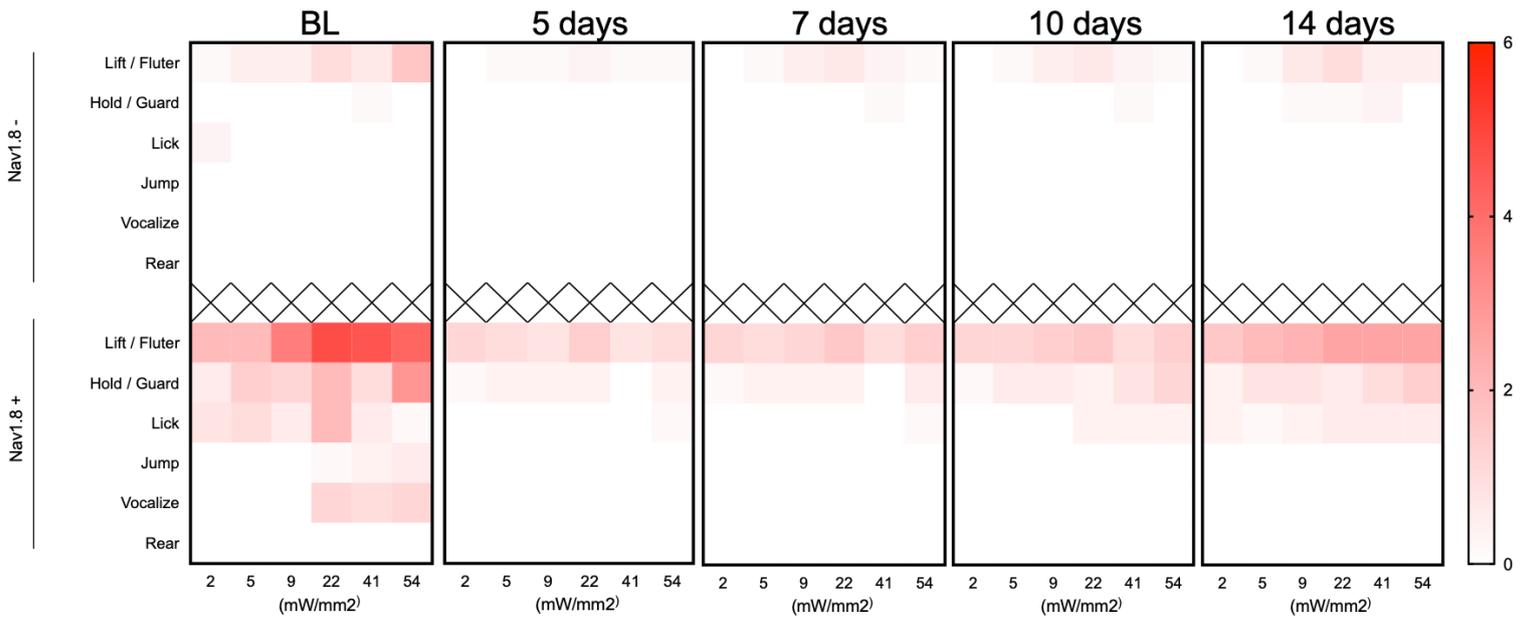
Devido ao fato de aparentemente ocorrer uma morte das populações Nts, buscamos outro modelo para compreender ainda mais o envolvimento dos neurônios NP3 e NF1 no desenvolvimento da neuropatia.



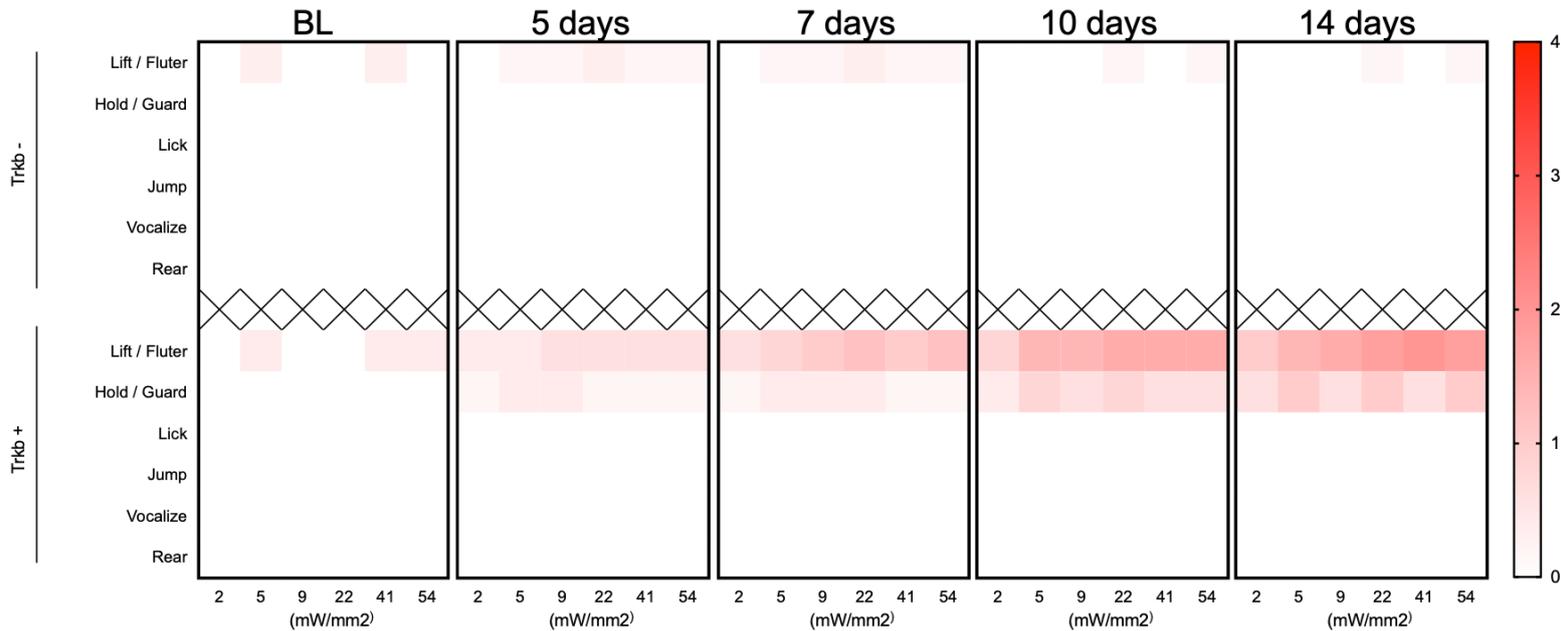
**Figura 11: Avaliação comportamental do desenvolvimento da neuropatia após a indução do SNI.** Limiar mecânico de retirada de pata por *von Frey* filamentos em nos animais Nav1.8-Cre,Ai32-Flox, Nav1.8-,Ai32-Flox, Nts-Cre,Ai32-Flox, Nts-,Ai32-Flox, Ntrk2-Cre-ERT2,Ai32-Flox e Ntrk2-,Ai32-Flox após a indução da neuropatia pelo modelo de SNI. Podemos ver que os animais apresentam redução do limiar de retirada de pata a partir do 5º dia, se mantendo até 14º dia após a lesão, quando comparado com o basal (BL). Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 5-8 por grupo. \*P<0,05, \*\*P<0,005 versus grupo BL, Teste t de Student múltiplas comparações, post-hoc Holm-Sídák).



**Figura 12: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais Nts+ após a lesão de SNI.** Animais Nts-Cre,Ai32-Flox ou Nts-,Ai32-Flox estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequência de 10 Hz. Demonstrando que após a lesão ocorre uma redução das respostas comportamentais dos animais Nts+ mesmo com o aumento da intensidade, com uma recuperação das respostas no 14<sup>o</sup> dia após a lesão. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 5-8 por grupo).



**Figura 13: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais Nav1.8+ após a lesão do SNI.** Animais Nav1.8-Cre,Ai32-Flox ou Nav1.8-,Ai32-Flox estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequência de 10 Hz. Os dados demonstram que mesmo com o aumento da intensidade ocorre uma redução da resposta comportamental nos animais Nav1.8+ logo no 5º dia após a lesão e uma recuperação leve das respostas no 14º dia. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 6-8 por grupo).



**Figura 14: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais *Trkb* após a lesão do SNI.** Animais *Ntrk2-Cre-ERT2,Ai32-Flox* ou *Ntrk2-,Ai32-Flox* estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequência de 10 Hz. Demonstrando que com o aumento da intensidade durante a neuropatia ocorre um aumento da resposta comportamental nos animais *Trkb+*, de forma gradual e dependente da intensidade. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 6-8 por grupo).

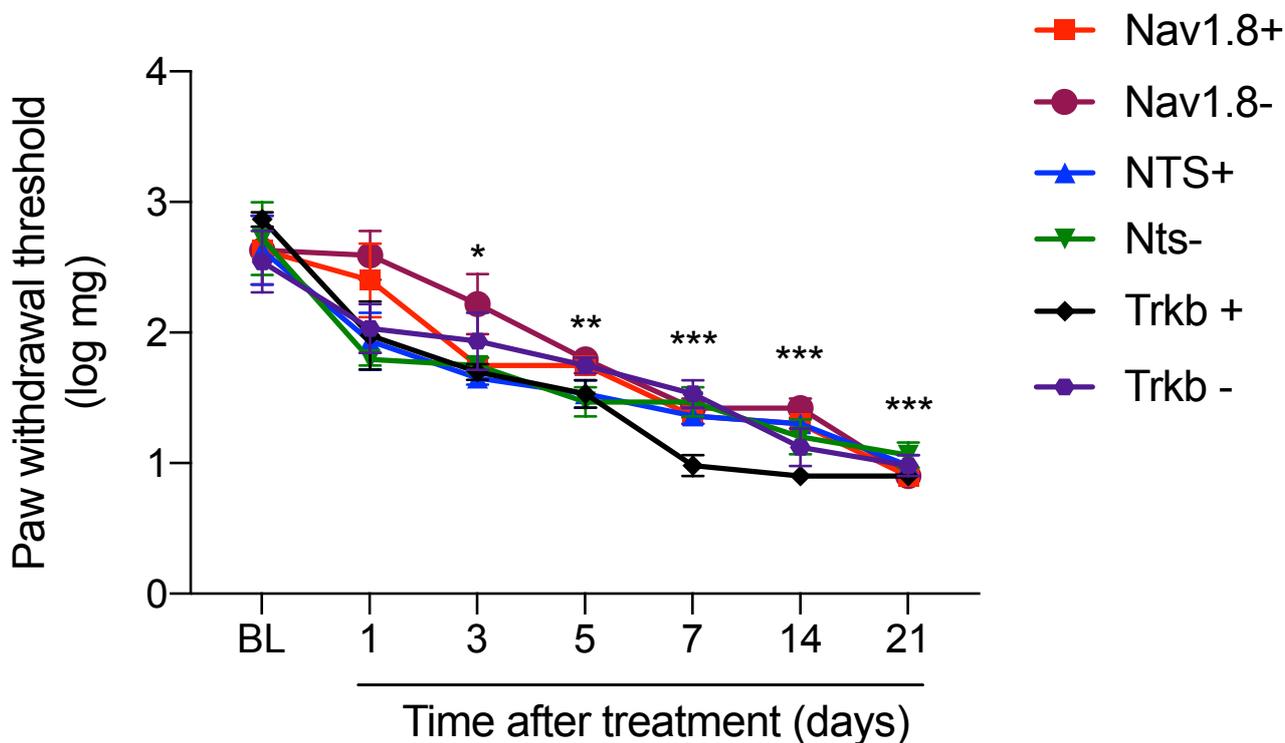
#### **4.4. Os neurônios Trkb+, mas não os Nts+, apresentam envolvimento na dor neuropática induzida por quimioterápico**

Para elucidar ainda mais se haveria de alguma forma ou não do envolvimento das NP3 e NF1 na neuropatia utilizamos o modelo de dor neuropática induzida por quimioterápico. O protocolo de tratamento com paclitaxel foi feito como demonstrado no Anagrama 3, sendo 4 injeções intraperitoneais em dias alternados, e utilizamos como controle do desenvolvimento da doença a avaliação comportamental por vonfrey.

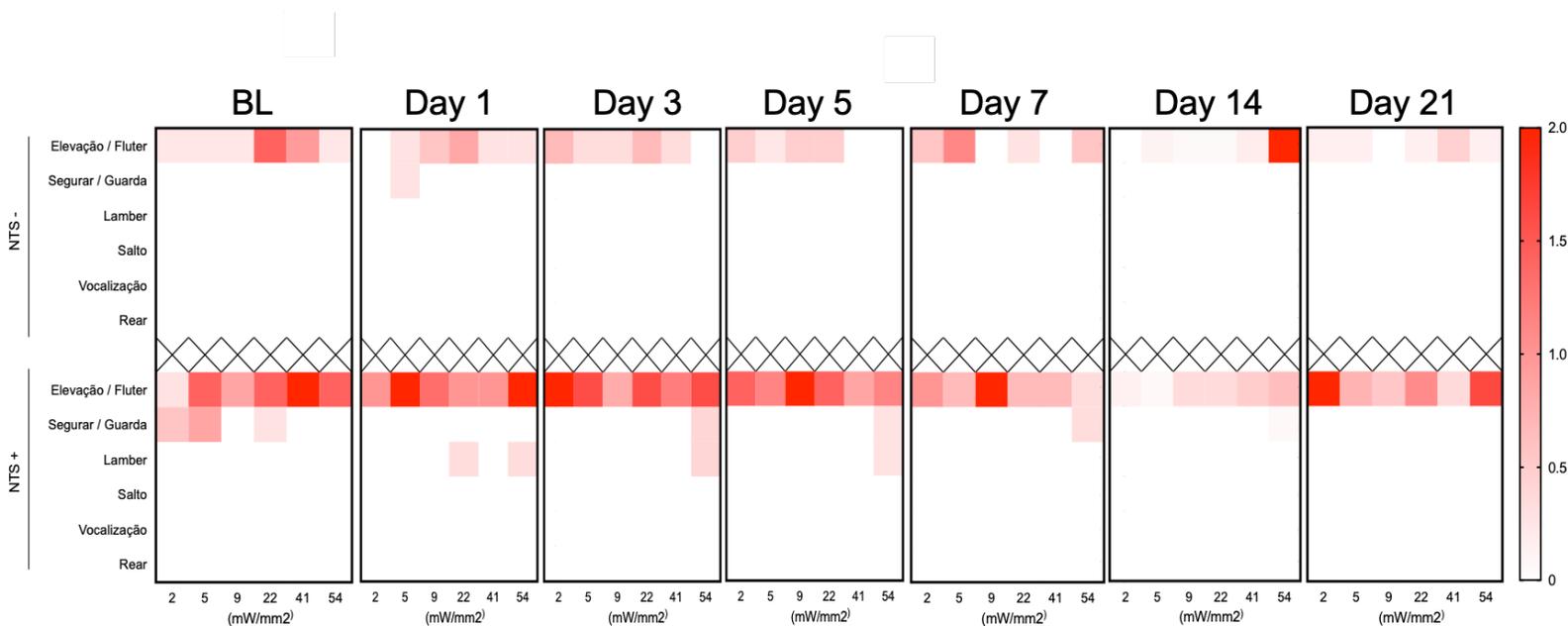
A avaliação comportamental dos animais pelo teste de vonfrey nos mostra uma redução no limiar de retirada de pata dos animais logo após o primeiro tratamento, chegando no pico do desenvolvimento da doença no 7º dia e se mantendo até o 21º dia (Figura 15).

Já na avaliação por optogenética dos comportamentos dos animais Nts+, observamos que há um aumento dos comportamentos, principalmente nos dias iniciais (1º, 3º e 5º), contudo observamos que ocorre um aumento do comportamento de Elevação/Flutter (Figura 16). Mesmo havendo uma alteração comportamental, os resultados demonstram não haver uma significância, o que nos indica então que as fibras Nts+ aparentemente não apresentam um envolvimento fundamental no desenvolvimento da dor neuropática como também não apresentam uma significância na dor nociceptiva. Os animais Nav1.8 apresentaram novamente uma redução da resposta comportamental que se manteve até o 21º dia (Figura 17)

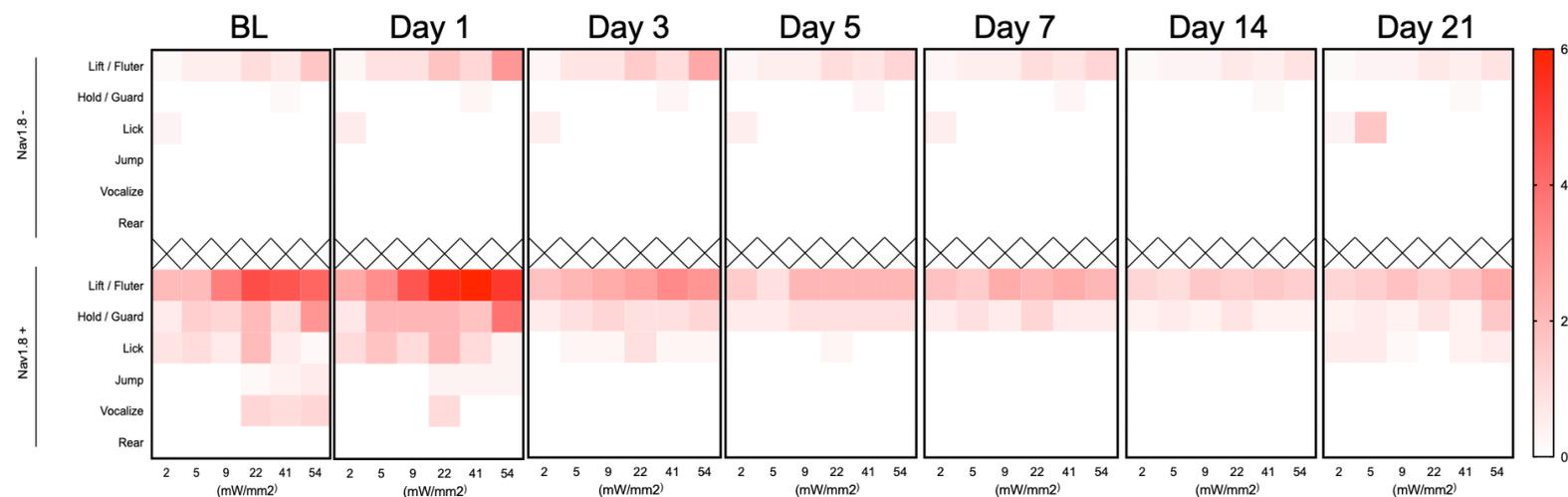
Já as fibras Trkb+ apresentam um aumento das respostas comportamentais de forma significativa a parti do 5º dia, que se sustenta até o 21º da doença (Figura 18). Sendo o pico de respostas entre as intensidades de 9 e 22 mW/mm<sup>2</sup>, corroborando nossos dados anteriores com a lesão de SNI, que aparentemente as fibras Trkb+ passam a desenvolver um papel noceptivo em situações de neuropatia.



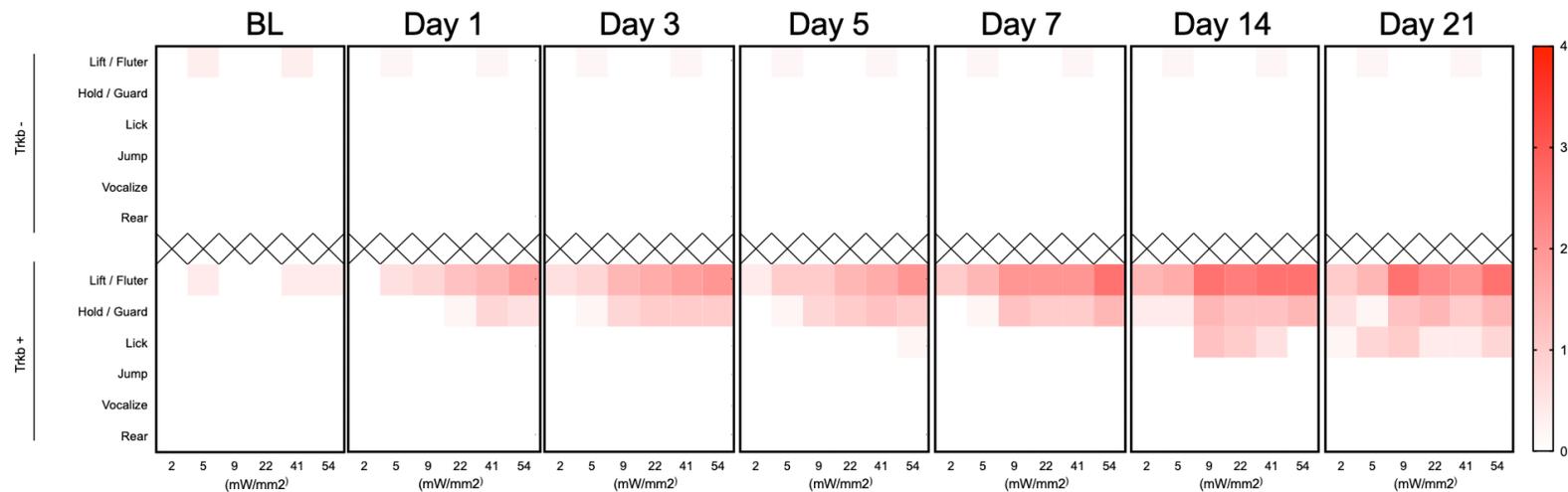
**Figura 15: Avaliação comportamental do desenvolvimento da neuropatia após tratamento com Paclitaxel.** Limiar mecânico de retirada de pata por *von Frey* filamentos em nos animais Nav1.8-Cre,Ai32-Flox, Nav1.8-,Ai32-Flox, Nts-Cre,Ai32-Flox, Nts-,Ai32-Flox, Ntrk2-Cre-ERT2,Ai32-Flox e Ntrk2-,Ai32-Flox após a indução da neuropatia por quimioterápico (Paclitaxel). Podemos ver que os animais apresentam redução do limiar de retirada de pata a partir do 3º dia, se mantendo até 21º dia após o início do tratamento, chegando no pico da doença no 7º dia de tratamento quando comparado com o basal (BL). Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 6-8 por grupo. \*P<0,05, \*\*P<0,005, \*\*\*P<0,0005 versus grupo BL, Teste t de Student múltiplas comparações, post-hoc Holm-Sídák).



**Figura 16: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais Nts+ após indução da neuropatia por quimioterápico.** Animais Nts-Cre,Ai32-Flox ou Nts-,Ai32-Flox estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequência de 10 Hz. Demonstrando que após a indução da neuropatia por paclitaxel ocorre uma pequena redução das respostas comportamentais dos animais Nts+ , porém não sendo significativas mesmo com o aumento da intensidade as respostas não se alteram em comparação com o basal (BL). Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 6 por grupo).



**Figura 17: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais Nav1.8+ após indução da neuropatia por quimioterápico.** Animais Nav1.8-Cre,Ai32-Flox ou Nav1.8-,Ai32-Flox estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequência de 10 Hz. Os dados demonstram que mesmo com o aumento da intensidade ocorre uma redução da resposta comportamental nos animais Nav1.8+ logo no 3<sup>o</sup> dia após a o início do tratamento e uma recuperação leve das respostas no 14<sup>o</sup> dia ao 21<sup>o</sup> dia após o início do tratamento. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 6-8 por grupo).



**Figura 18: Comportamento nocifensivo evocado pela luz azul nos animais Trkb após indução da neuropatia por quimioterápico.** Animais Ntrk2-Cre-ERT2,Ai32-Flox ou Ntrk2-,Ai32-Flox estimulados com Led azul, com intensidade de 2, 5, 9, 22, 41, 54 mW/mm<sup>2</sup> e frequência de 10 Hz. Demonstrando que com o aumento da intensidade durante a neuropatia induzida por quimioterápico (Paclitaxel) é capaz de levar à um aumento da resposta comportamental nos animais Trkb+, de forma gradual e dependente da intensidade e do decorrer da doença, com maior índice de respostas nos dias 7 a 21 após início do tratamento. Os dados são apresentados como médias de cada comportamento apresentado pelo grupo (n = 6-8 por grupo).

#### **4.5. Os neurônios Nts+ não apresentam envolvimento com respostas nocifensivas, mas sim com responder a coceira**

Após compreender que as fibras Trkb+, representando o grupo NF1, possuíam envolvimento com a dor neuropática, buscando compreender melhor então qual era a função das fibras NP3, optamos então pela abordagem quimiogenética para avaliar a resposta das fibras Nts+.

Para tal utilizamos inicialmente os animais Nav1.8-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox para possibilitar a padronização das respostas comportamentais no modelo de Dreadd excitatório. O primeiro passo foi determinarmos a dose que seria usada para avaliar a resposta comportamental dos animais, para tal iniciamos com 3 doses diferentes de CNO, de 2,5ng, 5ng e 10ng (Figura 19), como observado na figura 17 optamos pela menor dose, 2,5ng de CNO, já que a resposta foi similar a dose de 5ng após 30 minutos de avaliação comportamental.

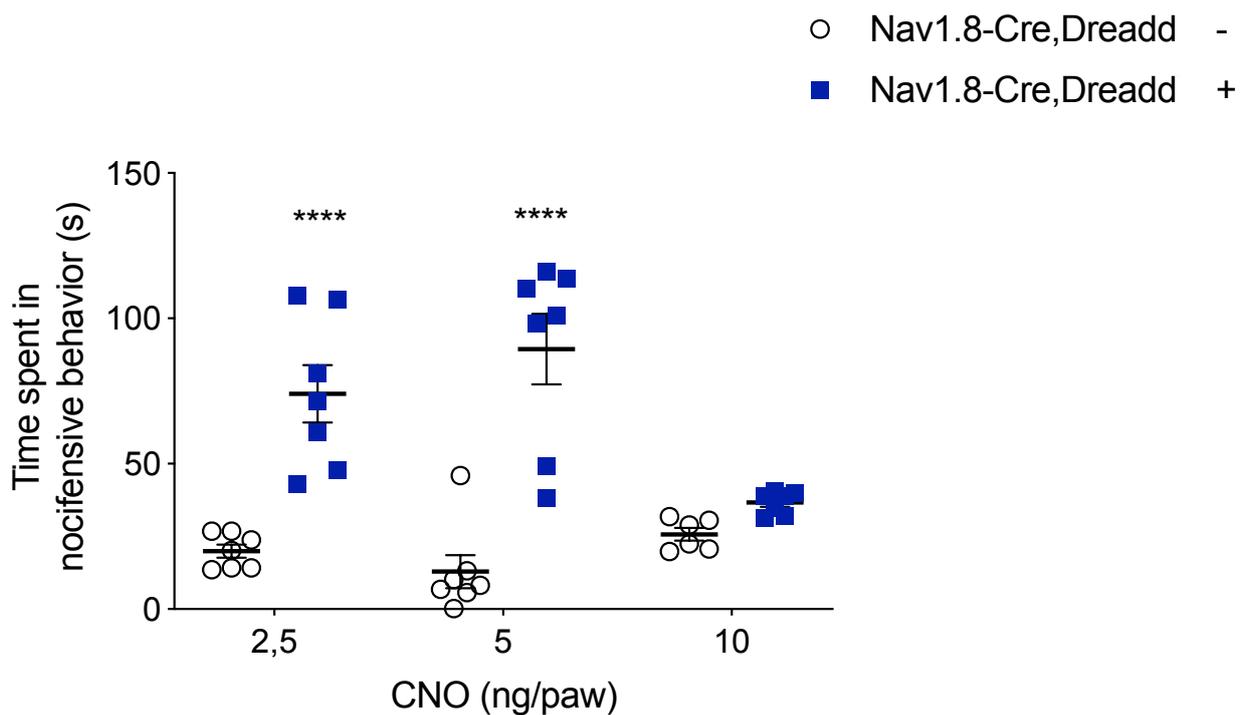
Após determinarmos a dose, avaliamos a resposta comportamental dos animais Nts+ (Nts-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox) após a injeção de CNO subplantar, quando comparados com os animais controles, Nts- (Dreadd-hM3Dq-Flox), também tratados com CNO, os animais Nts+ apresentaram um aumento significativo no tempo de resposta nocifensiva (Figura 20). Contudo, ao comparamos com a resposta dos animais Nav1.8+ essa resposta não era significativa (Figura 21), corroborando ainda mais o fato dos neurônios NP3 (representados pelos animais Nts+) não serem de suma importância na nocicepção.

Sabe-se que as fibras NP3 também são conhecidas como SST por apresentarem a expressão de somatostatina (como mostrado na Figura 1) e que é um neuropeptídeo envolvido com a transdução da coceira e embasado por artigos recentes publicados (MISHRA, HOON, 2015; SHARIF et al., 2020; STEELE et al., 2021), buscamos avaliar o envolvimento das fibras Nts+ no comportamento de coceira. Primeiro determinamos avaliar os comportamentos de coceira na pata dos animais Nts+, para isso seguimos os padrões comportamentais determinados por Steele e colaboradores (2021), onde ele descreve o animal morder a pata como um comportamento de coceira.

Sendo assim, injetamos 2,5ng de CNO na pata dos camundongos Nts+ e avaliamos por 30min, pudemos observar que os animais Nts+ apresentam uma resposta de coceira significativa quando comparada ao grupo controle (Figura

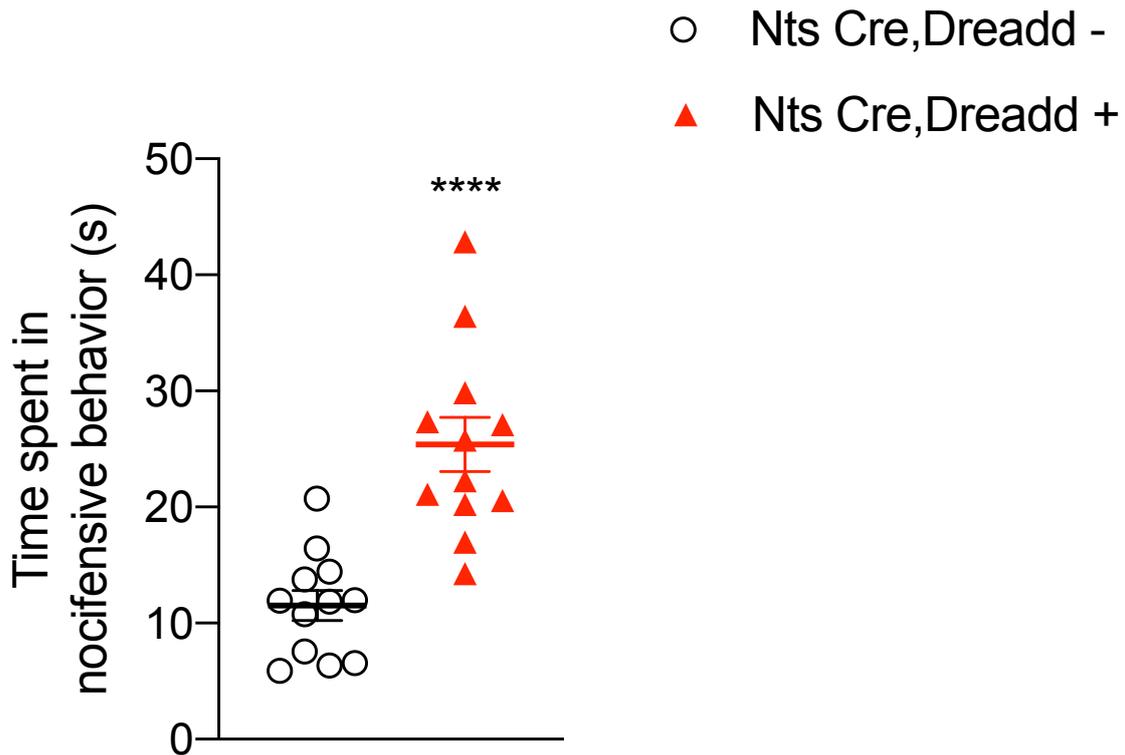
22). Contudo a avaliação de coceira na pata não é o melhor modelo para estudar esse tipo de resposta, por tanto utilizamos o modelo de coceira na nuca dos animais Nts+, já que é mais indicado para tal avaliação (SHARIF et al, 2020).

Seguindo então o protocolo publicado por Sharif e colaboradores (2020), administramos 1µg de CNO subcutâneo na nuca dos animais Nts+ e avaliamos o comportamento de coceira dos animais, levando em consideração somente o uso da pata traseira como coçar. Nossos dados demonstram que a administração de CNO na nuca dos animais Nts-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox foi capaz de levar à resposta de coceira (Figura 23) de forma significativa quando comparada com o grupo controle (Nts-), permitindo assim inferirmos que as fibras Nts+ apresentam um envolvimento com a percepção da coceira e não com a nocicepção como imaginávamos anteriormente.

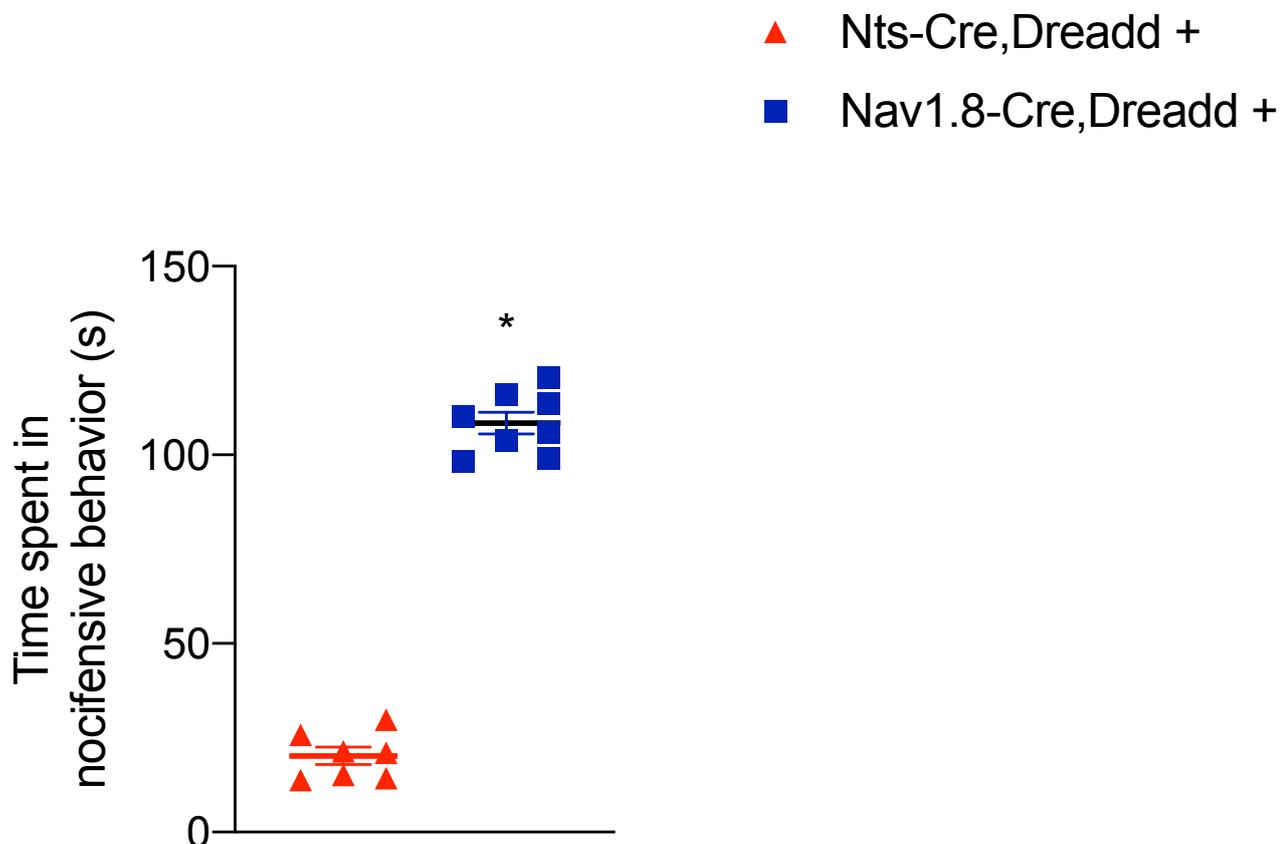


**Figura 19: Administração de CNO na pata dos camundongos Nav1.8+ gera resposta nocifensiva.** Camundongos Nav1.8-cre; Dreadd-hM3Dq-Flox foram tratados com CNO, em diferentes doses, na pata e avaliado a resposta comportamental. As doses de 2,5ng e 5ng foram capazes de desencadear resposta comportamental em animais Nav1.8-cre; Dreadd-hM3Dq-Flox. Os

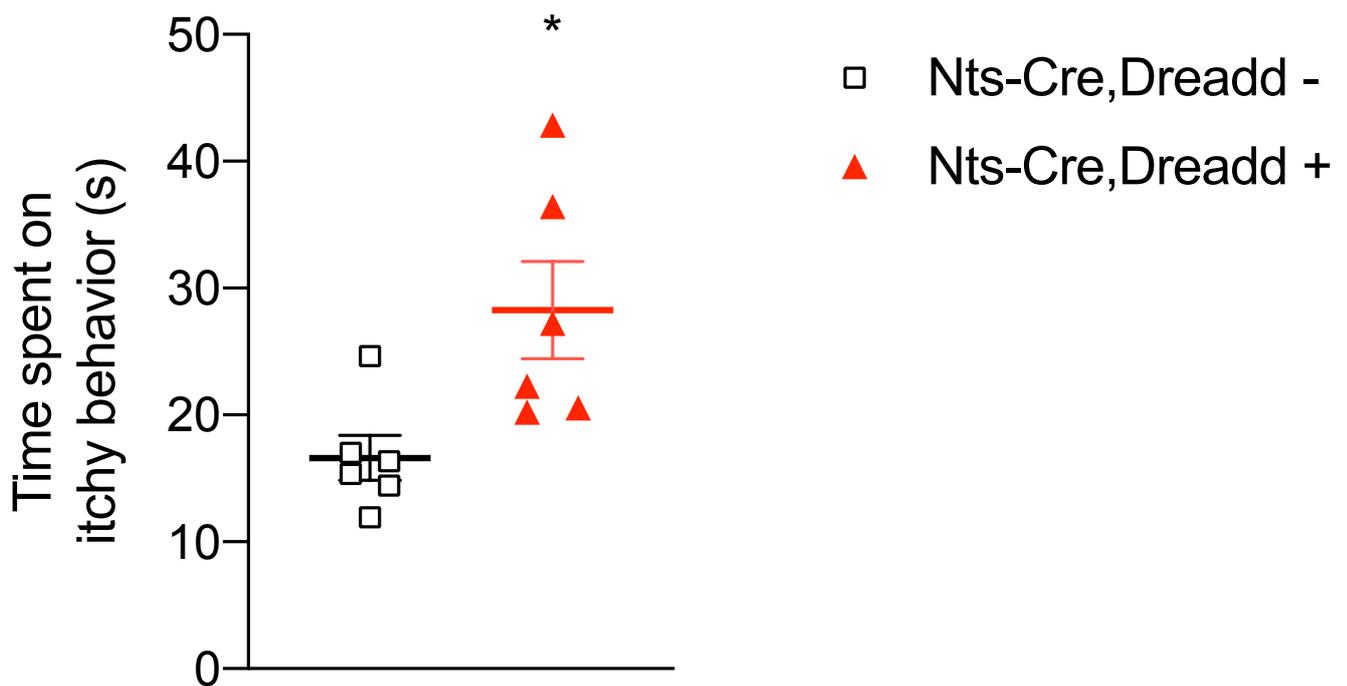
dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 6-7 por grupo. \*\*\*\*P<0,0005 versus grupo Nav1.8-Cre,Dreadd -. ANOVA two-way seguida de teste de Bonferroni.



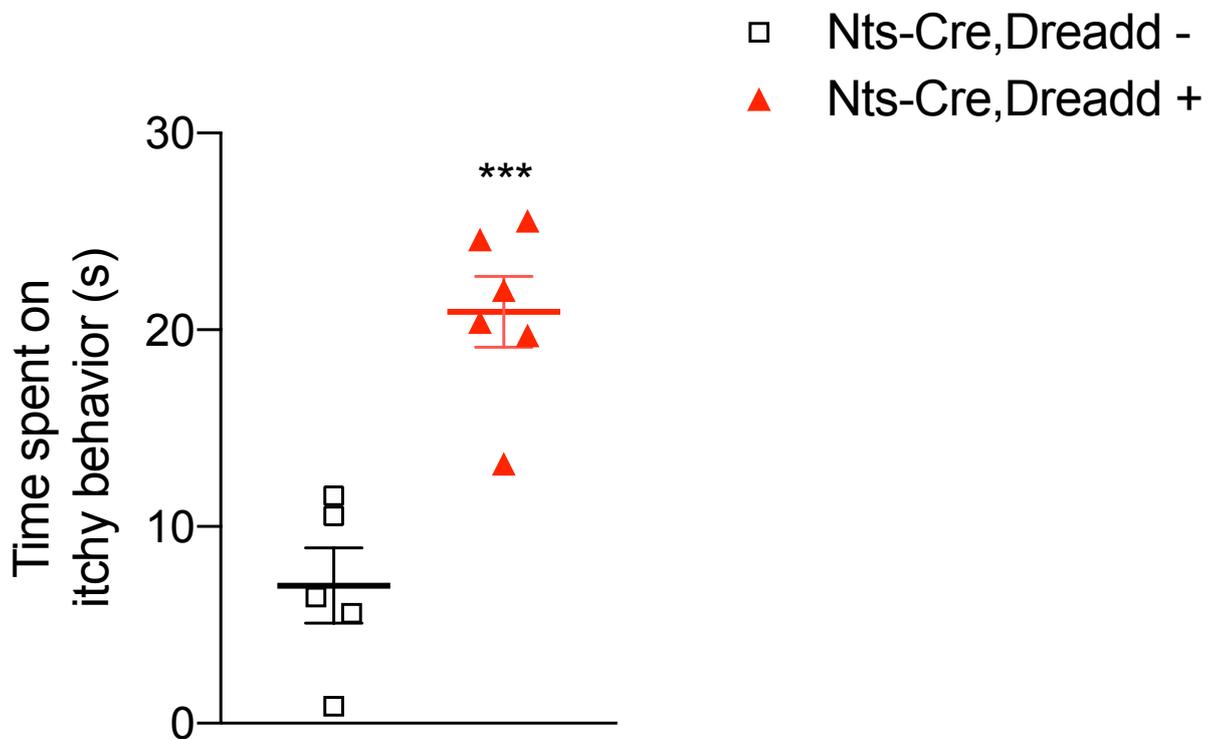
**Figura 20: Administração de CNO na pata dos camundongos Nts+ gera resposta nocifensiva.** Camundongos Nts-Cre; Dreadd-hM3Dq-Flox foram tratados com CNO, na dose de 2,5ng, na pata e avaliado a resposta comportamental. A administração de CNO foi capaz de desencadear resposta comportamental em animais Nts-Cre; Dreadd-hM3Dq-Flox. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 12 por grupo. \*\*\*\*P<0,0005 versus grupo Nts-Cre,Dreadd -. Teste t não paramétrico.



**Figura 21: Administração de CNO na pata dos camundongos Nts+ quando comparada com os animais Nav1.8+ não gera resposta nocifensiva.** Camundongos Nts-Cre; Dreadd-hM3Dq-Flox e Nav1.8-Cre; Dreadd-hM3Dq-Flox foram tratados com CNO, na dose de 2,5ng, na pata e avaliado a resposta comportamental. A administração de CNO foi capaz de desencadear resposta comportamental em animais Nav1.8+ e de forma mais branda nos animais Nts+, contudo o tipo de resposta comportamental apresentada foi diferente entre os grupos. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 7-8 por grupo. \*P<0,05 versus grupo Nts-Cre,Dreadd +. Teste t não paramétrico.



**Figura 22: Administração de CNO na pata dos camundongos Nts+ gera respostas de prurido.** Camundongos Nts-Cre; Dreadd-hM3Dq-Flox e Nts-Cre; Dreadd- foram tratados com CNO, na dose de 2,5ng, na pata e avaliado a resposta comportamental. A administração de CNO foi capaz de desencadear resposta comportamental relacionadas a coceira em animais Nts quando comparado ao grupo Nts-Cre,Dreadd -. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 6 por grupo. \*P<0,05 versus grupo Nts-Cre,Dreadd -. Teste t não paramétrico.



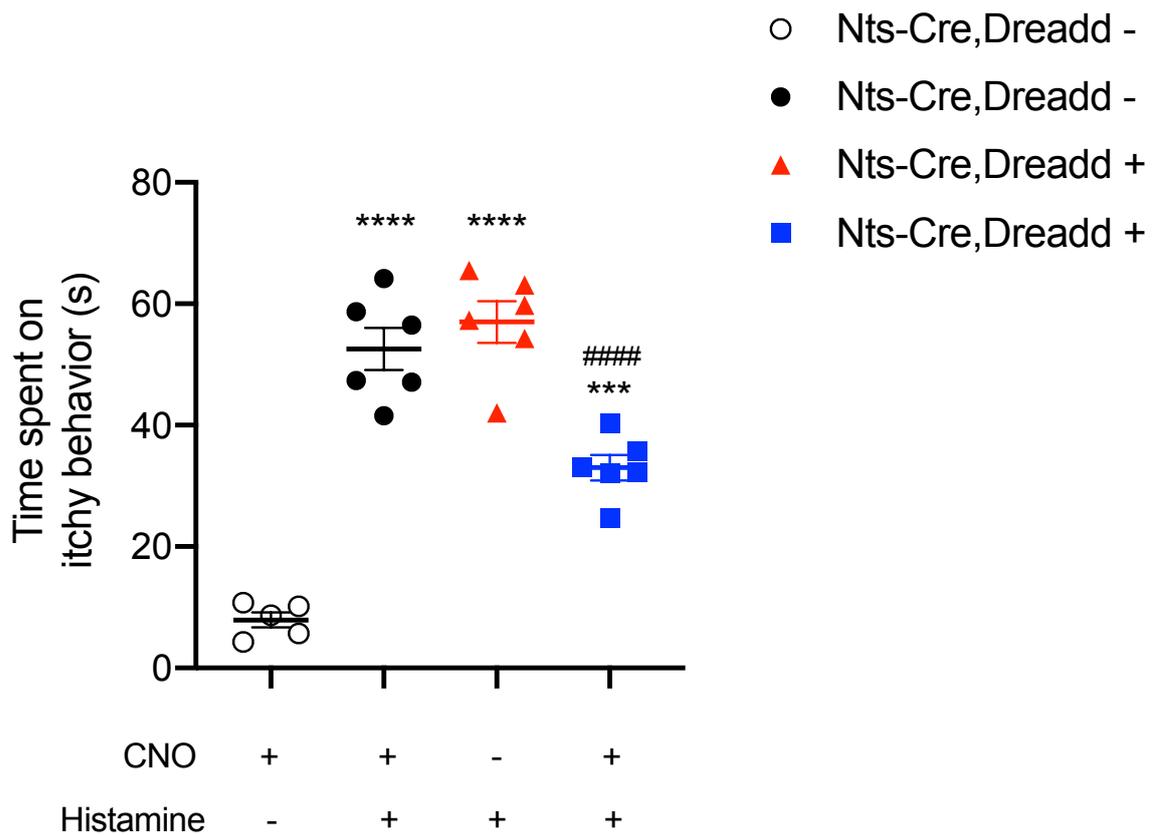
**Figura 22: Administração de CNO na nuca dos camundongos Nts+ gera respostas de prurido.** Camundongos Nts-Cre; Dreadd-hM3Dq-Flox e Nts-Cre; Dreadd- foram tratados com CNO, na concentração de 10ng/μL, na nuca e avaliado a resposta comportamental de coceira com a pata traseira. A administração de CNO foi capaz de desencadear resposta comportamental relacionadas a coceira em animais Nts quando comparado ao grupo Nts-Cre, Dreadd -. Os dados são apresentados como médias ± EPM (n = 5-6 por grupo). \*\*\*P<0,0005 versus grupo Nts-Cre, Dreadd -. Teste t não paramétrico.

#### **4.6. Bloqueio dos neurônios Nts+ leva a redução da coceira induzida por histamina**

Trabalho publicado na Nature Neuroscience (HUANG et al, 2018) demonstrou que a depleção de somatostatina nos neurônios do GRD inibe a coceira induzida por histamina. Sabendo disso fomos avaliar se há relação da histamina com nosso subgrupo, o NP3 (conhecido também com SST) na via da coceira. Utilizando o animal Nts-cre;Dreadd-hM4Di-Flox, que expressa no Nts, marcador específico dessa população, o receptor Dreadd inibitório.

Após a administração somente do CNO, não foi observado nenhum comportamento nos animais Nts+, contudo quando administramos somente histamina em um dos grupos observamos um aumento do comportamento de coceira de forma significativa (Figura 24). Contudo ao administrarmos inicialmente o CNO nos animais antes da histamina, pudemos observar uma redução significativa no comportamento de coceira dos animais Nts+ (Figura 24).

Considerando todos os nossos achados e o resultado obtido nesse experimento, podemos inferir que as fibras do subgrupo NP3, que tem como marcador específico a neurotensina, possuem papel fundamental no reconhecimento e sinalização do prurido.



**Figura 22: O bloqueio de Nts por administração de CNO na nuca dos camundongos inibe a resposta de prurido induzida por histamina.** Camundongos Nts-Cre; Dreadd-hM3Dq-Flox e Nts-Cre; Dreadd- foram separados em 4 grupos e tratados ou não com CNO e histamina (como no esquema), foi administrado CNO na concentração de 10ng/ $\mu$ L, na nuca e em seguida histamina, 100  $\mu$ g, também na nuca e avaliado a resposta comportamental de coceira com a pata traseira. A administração de CNO foi capaz de bloquear resposta comportamental relacionadas a coceira gerada pela histamina em animais Nts quando comparado ao grupo Nts-Cre,Dreadd + que não foram tratados com histamina. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 5-6 por grupo. \*\*\*P<0,005, \*\*\*\*P<0,0005 versus grupo Nts-Cre,Dreadd – e #####P<0,0005. ANOVA two-way seguida de teste de Bonferroni.

## **5. DISCUSSÃO**

Iniciamos caracterizando as fibras Trkb e Nts, os nossos dados corroboram os achados de Usokin e colaboradores (2015), contudo demonstramos a população NP3 expressa de forma exclusiva Nts, e também que a expressão de SST é elevada como também foi demonstrado por LaCroix-Fralish e colaboradores (Figura 1). Além disso, nossos dados demonstram que a população NP3 não apresenta características comuns com a população NP (Figura 2), anteriormente classificadas juntas fibras C não peptidérgicas, corroborando a necessidade de uma nova reorganização das subpopulações neuronais (LACROIX-FRALISH et al., 2011; USOSKIN et al, 2015). Nosso grupo já havia demonstrado com Werlang (2022) a expressão de Nav1.8 nas fibras Nts positivas no GRD, nossos dados demonstraram que a população Nts positiva é menor na região do gânglio quando comparado com população como a NP que possuem uma maior expressão de Nav1.8 (Scn10a) (Figura 1 e Figura 4), além disso nossos dados corroboram os de Werlang (2022) e Stantcheva e colaboradores (2016) que também mostraram que os neurônios NP3 apresentavam terminações livres na periferia (pata) (em vermelho, Figura 5), indicando que são receptores sensoriais e que apresentam envolvimento com o reconhecimento de estímulos mecânicos e térmicos dolorosos, tal característica condiz com a classificação antiga de fibras C.

Reanalizando as imagens anteriores dos nossos grupos e novas imagens observamos que também há células no gânglio que expressam Nts, porém não são células neuronais (Figura 4), contudo ao analisarmos nossos resultados de citometria de fluxo não conseguimos determinar a população celular, nossos dados indicam que não são células CD45+ (Figura 6 e Figura 7), podendo ser uma célula de suporte neuronal, contudo mais estudos se fazem necessário.

Já a população NF1, nossos dados corroboram a literatura onde vemos uma alta expressão de Trkb, contudo a expressão de Trkb ocorre nas populações NF2, assim como demonstrado por Usoskin e colaboradores (2014), além disso em nossa reanálise encontramos que em situações de neuropatia ocorre alterações na expressão de Trkb entre as populações NF1 e NF2 (Figura 1 e Figura 3). Ademais, dados de Shields e colaboradores (2012) demonstram que as fibras anteriormente classificadas com fibras A $\beta$ , mecanorreceptores de baixo limiar de ativação, podem apresentar expressão de Nav1.8, contudo nossos dados demonstram que a subpopulação NF1 não possuem uma

expressão significativa, essa diferença podem se dar pois vemos expressão em NF3 de Nav1.8, o que indica que a população de fibra A $\beta$  descritas por Shields e colaboradores (2012) seja a NF3, assim como demonstrado em nossos resultados (Figura 1). Assim sendo, demonstramos que como já proposto anteriormente (LACROIX-FRALISH et al., 2011; USOSKIN et al, 2015) uma nova classificação neuronal se faz necessária, e a nova proposta aparenta ser mais completa e separa melhor os subgrupos neuronais, contudo como demonstramos os marcadores apresentam alterações e expressões em outros grupos celulares. Além disso nossos dados demonstram uma alteração na subpopulação NF1 e do marcador Trkb durante a neuropatia (figura 3), assim como demonstrado anteriormente por Rutlin e colaboradores (2014) fazendo com que mais investigações dessa subpopulação em condições neuropáticas seja feita.

Após compreendermos melhor os subgrupos neuronais, buscamos compreender o envolvimento deles na sinalização da dor nociceptiva. Utilizamos os animais modificados geneticamente para que expressem o canal de rodopsina nos neurônios de interesse. Iniciamos avaliando as respostas dos animais Nav1.8, pois como já descrito por Daou e colaboradores (2013) e por Chameessian e colaboradores (2019) tal subgrupo neuronal tem forte envolvimento com a sinalização da dor, e nossos resultados comportamentais corroboram os Chameessian e colaboradores (2019) que também demonstraram um aumento da resposta comportamental com o aumento da frequência e da intensidade do estímulo na pata (Figura 10). Já os animais Trkb quando estimulados com o LED azul na pata nas frequências de 2, 5 e 10Hz e com a variação de intensidade não apresentaram respostas comportamentais (Figura 9), o que se era esperado, pois como classificadas como mecanorreceptores essas fibras em condições *naïve* não apresentam participação na sinalização da dor (LATREMOLIERE, WOOLF, 2009; CHAMESSIAN ET AL, 2019).

As fibras Nts+ apresentaram um aumento gradual das respostas comportamentais porem, não vimos uma relação de associação com o aumento dos comportamentos com a aumento da frequência e da intensidade (Figura 8). Beaudry e colaboradores (2017) demonstraram que após a ativação das fibras do tipo C não peptidérgicas, por optogenética, os animais apresentavam

comportamento de retirada da pata e guarda de mais branda e independente da frequência, assim como observados nos nossos dados.

Buscamos então compreender em condições neuropáticas, já que trabalhos demonstram que as fibras Cnp e as Trkb+ podem ter envolvimento na sinalização em condições de doença (LATREMOLIERE, WOOLF, 2009; CHAMESSIAN et al, 2019). Iniciamos utilizando o modelo de lesão do nervo ciático (SNI) (Figura 11) e nossos dados nos mostraram que após a lesão ocorre, na fase inicial do 3º ao 7º dia, uma redução da resposta das fibras Nts+ (Figura 12) e Nav1.8+ (Figura 13), porém ao 14º dia a resposta de Nav1.8 e Nts voltam a subir como observadas nas condições fisiológicas, acredita-se que tal redução ocorra devido a morte celular após a lesão (Figuras 12 e 13). Já quando analisamos os animais Trkb submetidos ao modelo de SNI (Figura 14) observamos alteração na resposta quando comparado com o controle, os animais Trkb SNI apresentaram mais respostas comportamentais a partir do 7º dia após a lesão (Figura 14), confirmando os dados de Dhandapani e colaboradores (2018), onde demonstraram que a estimulação com LED azul das patas de animais TrkB-ChR2+ após o SNI levou à alterações comportamentais, como retirada da pata, guarda e lambedura, demonstrando que diferente das condições *naive* as fibras NF1 passam a ter papel na nocicepção pós SNI.

Em seguida investigamos se as respostas observadas se manteriam em outro modelo de neuropatia, sendo assim induzimos neuropatia por quimioterápico (Figura 15) e avaliamos as respostas das fibras Nav 1.8+, Nts e Trkb durante o modelo.

Os animais Nav1.8+ apresentaram uma redução na resposta comportamental por optogenética que se manteve até o 21º dia após o tratamento com paclitaxel (Figura 17), isso ocorre devido ao fato do paclitaxel causar redução das fibras Nav1.8 na pata dos camundongos (WANDERLEY; MAGANIN et al, 2022). Já os animais Nts apresentam um aumento das respostas comportamentais durante o aumento da frequência e da intensidade (Figura 16), ocorrendo nos dias iniciais da lesão, contudo esse aumento não apresenta alteração significativa, e no 7º dia já observamos a redução na resposta comportamental dos animais Nts (Figura 16), o que se é esperado devido ao fato das fibras Nts apresentarem um comportamento mais brando além do fato dessa população apresentar expressão de Nav1.8 que são fibras

que podem estar sendo acometidas, levando a redução, durante o tratamento (WANDERLEY; MAGANIN et al, 2022).

Em contra partida os animais Trkb+ (Figura 18) tratados com paclitaxel novamente apresentaram um aumento da resposta comportamental significativa a partir do 5º dia de tratamento e se manteve até o 21º dia, corroborando novamente os dados da literatura que veem demonstrando o envolvimento das fibras Trkb positivas durante os modelos de neuropatia, passando de um papel de mecanorreceptores para nociceptores (RUTLIN et al, 2014; DHANDAPANI et al, 2018). Levando em consideração nossos achados e a literatura, demonstramos que as fibras Trkb mudam de papel durante o desenvolvimento da neuropatia, passando a sinalizar estímulos nocivos, enquanto que as fibras Nts não apresentam papel na sinalização da dor.

Buscando compreender a função das fibras Nts, buscamos outras metodologias, seguindo a literatura encontramos que uma mesma população por optogenética ou quimiogenética pode levar a respostas comportamentais diferentes (SHARIF et al, 2020). Sendo assim, utilizamos os animais Dredd excitatórios para estudarmos a sinalização das fibras Nts. Iniciamos a padronização utilizando os animais Nav1.8, definindo a dose de 2,5ng de CNO na pata como a ideal para levar ao desencadeamento de respostas nocifensivas (Figura 19), já que não há na literatura trabalhos que tenham usado a administração de CNO de forma local. Quando comparamos as respostas dos animais Nts com os Nav1.8, percebemos que os animais Nts apresentavam um aumento da resposta comportamental (Figura 20), porém a mesma era menor e diferente das apresentadas pelos animais Nav1.8 (Figura 21), os animais Nts apresentavam um comportamento de morder a pata após a administração de CNO, o que diferia dos Nav1.8 que apresentavam comportamentos de agitar e lambear, quando buscamos na literatura mais informações para compreendermos a resposta encontrada, nos deparamos com o trabalho de Steele e colaboradores (2021) onde eles descrevem a mordida como comportamento de coceira. Sabendo que os animais Nts apresentam comportamento de coceira após administração de CNO, e o fato das fibras NP3 apresentarem também expressão de SST que é descrito na literatura ter envolvimento direto nas vias da coceira (HUANG et al, 2018), fomos avaliar a resposta de coceira dos animais Nts, e observamos que após a administração de CNO na pata os animais tiveram

um aumento significativo no comportamento de coceira (Figura 22), após demonstrarmos na pata, buscamos um melhor modelo para o estudo da coceira, nos baseamos no trabalho de Sharif e colaboradores (2020) avaliamos a resposta a coceira na nuca dos animais, nossos dados corroboram a literatura demonstrando que a administração do CNO na nuca leva ao aumento do comportamento de coceira dos animais demonstrando envolvimento da população NP3 na via de sinalização da coceira (Figura 23).

Com o objetivo de comprovar o envolvimento das fibras NP3 na coceira, utilizamos os animais DREADD inibitórios para bloquear a via de sinalização dos neurônios, nossos resultados demonstraram que o tratamento com CNO antes da administração de histamina na nuca dos camundongos Nts+ foi capaz de reduzir a coceira de forma significativa quando comparado com o grupo controle (Figura 24), corroborando os dados da literatura que demonstram que o bloqueio e depleção de somatostatina nos camundongos reduz a coceira induzida por histamina (HUANG et al., 2018).

## **6. CONCLUSÃO**

Esse estudo caracterizou os subgrupos neuronais NF1 e NP3 descritos na nova classificação, demonstrando e validando o envolvimento deles na sinalização da dor. Demonstrando que a subpopulação NF1, marcada por Trkb, apresenta alteração funcional durante a dor neuropática, passando a se comportar como nociceptor e que as fibras NP3 não apresentam papel na nocicepção, porém são fundamentais na sinalização do prurido.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BASBAUM, A.L., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 139: 267-84 (2009).

BANGASH, M.A. Distinct transcriptional responses of mouse sensory neurons in models of human chronic pain conditions. *Wellcome Open Res.* 3:78 (2018).

BEAUDRY, H. et al. Distinct behavioral responses evoked by selective optogenetic stimulation of the major TRPV1+ and MrgD+ subsets of C-fibers. *Pain* 158(12), 2329–2339 (2017).

BONICA, J.J (1990). *The Management of Pain*. Philadelphia: W.B. Saunders & Co.

BOURQUIN, A.F. et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain*. 2006, 122(14): 11-14.

BRITT, J. P., MCDEVITT, R. A., BONCI A. Use of channelrhodopsin for activation of CNS neurons. *Current protocols in neuroscience Chapter 2: Unit2.16* (2012).

BROOKS, J., TRACEY, I. REVIEW: From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *Journal of Anatomy* 207, 19-33 (2005).

CAMPBELL, J. N. et al. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain* vol. 32,1: 89-94 (1988).

CHAMESSIAN, A. et al. Is Optogenetic Activation of Vglut1-positive A $\beta$  Low-Threshold Mechanoreceptors Sufficient to Induce Tactile Allodynia in Mice after Nerve Injury? *J Neurosci.* (2019).

DAOU, I., et al. Remote optogenetic activation and sensitization of pain pathways in freely moving mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(47), 18631–18640 (2013).

DHANDAPANI, R. et al. Control of mechanical pain hypersensitivity in mice through ligand-target photoablation of TrkB-positive sensory neurons. *Nature Communications*.9:1604. (2018).

FLÓREZ, J. *Terapéutica Farmacológica del dolor*, in *Dolor: mecanismos de transmission y control*. Flórez J ed, Madrid. 19-39. (1993).

GARLAND, E. L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Primary care* 39,3: 561-71 (2012).

HUANG, J. et al. Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. *Nature Neuroscience*. 21, 707-716. (2018).

IASP, International Association for the Study of Pain. *Classification of Chronic Pain*, 2 Ed., IASP Task Force on Taxonomy, IASP Press, Seattle, 2012.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.L. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413: 203-10. (2001).

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. The perception of pain. *Principles of neural science*. 4<sup>a</sup> ed. EUA: MacGraw-Hill, cap. 24, p. 472-91. (2000)

KIDD, B. L., URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87, 3–11 (2001).

KIM, H. et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory animal research* 34,4: 147-159 (2016).

LACROIX-FRALISH, M.L. et al. Patterns of pain: Meta-analysis of microarray studies of pain. *Pain*. 2011, 152: 1888-98.

LAKSO, M. et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14), 6232–6236 (1992).

LATREMOLLERE, A.; WOOLF, C.A. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain*. 2009, 10(9): 895-926.

LEINNINGER, G.M. et al. Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metab*. 2011, 14(3): 313-23.

LOESER, J.D., MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet* 353, 1607-9. (1999).

MA, Q. Population coding of somatic sensations. *Neurosci Bull*. 28(2): 91-9. (2009)

MADISEN, L. et al. A robust and high-throughput Cre reporting and

characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* 13,1: 133-40 (2010).

MADISEN, L. et al. A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nature neuroscience* 15, 793–802 (2012).

MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66, 355-474. (2002)

MISHRA, S. K, HOON, M. A. Transmission of pruriceptive signals. *Handbook of experimental pharmacology* 226: 151-62 (2015).

NOBACK, C.R., ET AL. The human nervous system: structure and function. *Pain and temperature*, 5a ed., Williams & Wilkins, New York, pp. 123-137. (1996).

PRITHVI RAJ, P. *Pain Medicine (A Comprehensive Review)*. Mosby Year Book Inc. (1996).

RAFFAELI, W., ARNAUDO, E. Pain as a disease: an overview. *Journal of pain research*, 10, 2003–2008 (2017).

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *PAIN* 161, 1976-1982 (2020)

RUTLIN, M et al. The cellular and Molecular Basis of Direction Selectivity of A $\delta$ - LTMRs. *Cell*. 159(7): 1640-51. (2014).

SHARIF, B. et al. Differential Coding of Itch and Pain by a Subpopulation of Primary Afferent Neurons. *Neuron* 106,6: 940-951.e4 (2020).

SHERRINGTON, C. *The Integrative Action of the Nervous System*. Cambridge University Press, London. (1947).

SHIELDS, S.D. et al. Nav1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system. *Pain*. 153 (10): 2017-2030. (2012).

SMITH, B.H.; TORRANCE, N. Epidemiology of Neuropathic Pain and Its Impact on Quality of Life. *Curr Pain Headache Rep*. 16:191–8. (2012).

STANTCHEVA, K. K. et al. A subpopulation of itch-sensing neurons marked by Ret and somatostatin expression. *EMBO reports*, 17(4), 585–600 (2016).

STEELE, H. R. et al. MrgprC11+ sensory neurons mediate glabrous skin itch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(15) (2021). e2022874118.

ST-GELAIS, F., JOMPHE, C., TRUDEAU, L. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN* 31,4: 229-45 (2006).

STIRLING, C.L. et al. Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous Nav1.8-Cre recombinase mice. *Pain*. 113(1): 27-36. (2005).

STUART, T. et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*. 177 (7), 1888–1902 e21. (2019).

TEIXEIRA, J.T., OKADA, M.O. Dor – evolução histórica dos conhecimentos. *DOR Contexto interdisciplinar*, Maio editora, Curitiba, pp.15-51. (2003).

USOSKIN, D. et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature neuroscience* 18,1: 145-53 (2014).

VERI Jr., W.A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*. 112: 116–38. (2006).

WANDERLEY, C.W.S., MAGANIN, A.G.M. PD-1/PD-L1 Inhibition Enhances Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain by Suppressing Neuroimmune Antinociceptive Signaling. *Cancer Immunol Res*. 10 (11). 1299-1308. (2022).

WERLANG, J.B. Caracterização morfológica e funcional dos neurônios sensitivos que expressam neurotensina (Nts). Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 56p. (2022).

WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-Verlag). (2016).

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? *The Journal of clinical investigation* 120,11: 3742-4 (2010).

ZHU, H. et al. Cre-dependent DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) mice. *Genesis* 54,8: 439-46 (2016).

**ANEXO**



## A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: “*Caracterização do papel das fibras sensitivas A (TRKb+) e fibras C (Galanina+ / Neurotensina+) na dor nociceptiva e patológica*”, registrado com o número do protocolo 173/2019, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha**, envolvendo 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). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 27 de julho de 2020.

Colaborador: Alexandre Gomes de Macedo Maganin

**Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.**

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			27/07/2020 a 20/11/2026	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-cre;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;TdTomato-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-cre;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;Brainbow-Flox	12	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;AdvillinDTA-Flox	168	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Camundongo / Nts-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;Dreadd-hM3Dq-Flox	72	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Ntrk2-Cre-ERT2;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nts-Cre;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Gal-Cre;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental
Camundongo / Nav1.8-Cre;Ai-32-Flox	24	20g / 42 dias	Fêmea	Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental

Ribeirão Preto, 27 de julho de 2020

**Prof. Dra. Katiuchia Uzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP