UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

RAFAELA MANO GUIMARÃES

Papel dos macrófagos no gânglio sensitivo na gênese e manutenção da dor neuropática

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

RAFAELA MANO GUIMARÃES

Papel dos macrófagos no gânglio sensitivo na gênese e manutenção da dor neuropática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

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

Mano Guimarães, Rafaela
Papel dos macrófagos no gânglio sensitivo na gênese e manutenção da dor neuropática

Ribeirão Preto, 2018.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Cunha, Thiago Mattar.

1. Macrófagos. 2. Dor neuropática. 3. Células CCR2+ e CX3CR1+. 4. Gânglio da raiz dorsal

Nome: Mano Guimarães, Rafaela

Título: Papel dos macrófagos no gânglio sensitivo na gênese e manutenção da dor neuropática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado (a) em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O trabalho recebeu auxílio financeiro do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias, FAPESP, CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, José Roberto e Rose Nadia, os quais me deram a vida e me ensinaram a vive-la dignamente. Obrigada por todo apoio e incentivo constantes, pelas palavras valiosas e sabias e por torcerem incondicionalmente pelo meu sucesso. A minha irmã Beatriz, por todo carinho, paciência e por sempre acreditar em minha capacidade. Amo vocês!

A toda minha família e aos meus velhos amigos, que mesmo distante, me deram suporte, aconchego e sempre demonstram companheirismo, vocês me dão força para superar os obstáculos!

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, por permitir que fizesse parte do seu grupo de pesquisa, pelos momentos de ensinamentos e discussões científicas, pelo constante incentivo, apoio e pelo exemplo de dedicação.

Aos professores Dr. José Carlos Alves-Filho e Dr. Fernando Cunha, pela atenção, discussões científicas e grande disponibilidade nos momentos necessários.

Aos meus colaboradores trabalho e também amigos: Marcela Davoli, Miriam Fonseca e Ricardo Kusuda. Obrigada pela paciência, disposição, ensinamentos, boa vontade e dedicação às longas horas de experimento, que se tornavam mais agradáveis ao lado de vocês! Sem vocês, com certeza, nada disso seria possível!

A todos os demais alunos do grupo da “Dor”: Andreza Urba, Mateus, Rangel, Isaac, Maria Cláudia, Alexandre, Joana, Guilherme, Alexandre Lopes, Fábio Bezerra, Nerry, Natália e agregados, pelas discussões científicas e por manterem um clima agradável de trabalho.

Aos demais amigos do LID, em especial: Bruno Marcel, Carlos Hiroki, Eduardo Damasceno, Guilherme Cebinelli, Flávio Protasio, Kalil, Fernanda Castanheira, Vanessa, Paulo Henrique, Cássia e Claudinha. Obrigada por esses dois anos de convivência e aprendizado. Pela companhia nos experimentos ao longo das noites e aos finais de semana, mas também nos momentos de descontração. Obrigada por terem me ajudado sempre que necessário e por terem tornado minha jornada dentro do laboratório mais leve, proveitosa e divertida.

Aos professores e discentes da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (IBA), pelas contribuições científicas e convívio diário.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Departamento de Farmacologia e Departamento de Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Ana Cristine, secretaria do IBA, pelo apoio e solicitude.

Aos membros da banca pela disponibilidade de avaliar e contribuir para melhoria do meu trabalho.

À FAPESP, CAPES, CNPq e FAEPA pelo incentivo financeiro através da concessão da bolsa, bem como pelo apoio para a participação em eventos científicos.

Os meus mais sinceros agradecimentos!

GUIMARÃES, R.M. **Papel dos macrófagos no gânglio sensitivo na gênese e manutenção da dor neuropática.** 2018. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

A dor neuropática é uma condição debilitante causada por danos no sistema nervoso somatossensorial, como lesões dos nervos periféricos. As células do sistema imune, em particular os monócitos/macrófagos, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento deste processo. Embora diversos estudos sugiram o envolvimento dessas células na medula espinal e gânglio da raiz dorsal (GRD) após a indução da neuropatia, a caracterização funcional e fenotípica, bem como a origem dessas células nesses órgãos, ainda não está esclarecida. Na medula espinal, estudos recentes têm demonstrado que apesar da massiva ativação e proliferação da micróglia residente, não há recrutamento de células mielóides para esse tecido após a indução da neuropatia, divergindo dos dados anteriormente descritos na literatura. Diante desses estudos controversos, iniciamos nosso trabalho demonstrando que possivelmente as células mielóides não são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica e infiltrar na medula espinal após a indução da neuropatia periférica pelo modelo de SNI e assim, a ativação microglial ocorre de maneira independente do infiltrado dessas células neste tecido. No que se refere aos GRDs, trabalhos anteriores demonstram que há um aumento dos marcadores de ativação de macrófagos nesse tecido após a lesão periférica. Com isso, nós caracterizamos as subpopulações de monócitos/macrófagos presentes no GRD e identificamos, células CX3CR1⁺ e células CCR2⁺. De maneira interessante, ao isolarmos as células CX3CR1⁺ observamos que esse subtipo celular possa ser as principais células responsáveis pela produção dos mediadores inflamatórios no GRD após indução de SNI, enquanto as células CCR2⁺ parecem contribuir apenas de maneira parcial para a produção de IL-1 β e TNF- α neste tecido, uma vez que a expressão desses mediadores não foi totalmente suprimida na ausência desse subtipo celular. Por fim, investigamos a origem desses subtipos de monócitos presentes no GRD. Por meio da parabiose entre animais *wild type* e GFP⁺, observamos que embora haja um pequeno aumento de células GFP⁺ no GRD de animais lesionados, essas células não são macrófagos. Corroborando com esses dados, ao realizarmos a parabiose de animais *wild type* com animais CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+} não observamos presença de células CX3CR1 ou CCR2 no GRD após SNI. Em conjunto, nossos dados demonstram que existem duas subpopulações de monócitos no GRD, sendo uma delas residente e contribuindo de maneira efetiva para a produção dos mediadores inflamatórios locais e outra população de células CCR2⁺ que podem ter um papel mais relevante no sítio da lesão e assim, a exacerbação da inflamação local pode interferir indiretamente, na ativação das células presentes nos GRDs, bem como na produção dos mediadores inflamatórios no tecido, que vão contribuir para o desenvolvimento da dor neuropática.

Palavras-chave: Macrófagos; Dor neuropática; Células CCR2⁺ e CX3CR1⁺; Gânglio da raiz dorsal

GUIMARÃES, R.M. **Role of sensitive ganglia macrophages in the genesis and maintenance of neuropathic pain.** 2018. Master's dissertation. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, 2018.

ABSTRACT

Neuropathic pain is a debilitating disease due to severe damage to the nervous system, induced by peripheral nerve injury. The cells of the immune system, especially monocytes/macrophages, played a critical role in these process. Several projects have been suggested the role of these cells in the spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) after neuropathic pain induction, but the functional and phenotypic characterization, as well as the source of cells, is still unclear. In the spinal cord, recent studies have shown that although massive activation and proliferation of the microglial occurred, there is no recruitment of myeloid cells to this tissue after the neuropathic pain induction, but this is contrary to previous findings in the literature. Based on this controversial studies, we first showed that myeloid cells are not able to overcome the blood-brain barrier and infiltrate in the spinal cord after the peripheral nerve injury by SNI model and thus, the microglial activation occurs independent of the infiltration of these cells in this tissue. With regard to DRGs, previous work has shown that there is an increase in the activation markers of macrophages after peripheral nerve injury. Thus, we characterized the subpopulations of monocytes/macrophages in the DRG and we identified CX3CR1⁺ and CCR2⁺ cells. Interestingly, when isolating the CX3CR1⁺ cells, we observed that this cell subtype may be the main cells responsible for the production of inflammatory mediators in the DRG after SNI induction, whereas CCR2⁺ cells appear to contribute only partially to the production of IL-1 β and TNF- α in this tissue, since the expression of these mediators was not completely suppressed in the absence of this cellular subtype. Finally, we investigated the origin of these monocyte subtypes present in the DRG. Through parabiosis between wild type and GFP⁺ animals, we observed that although there is a small increase of GFP⁺ cells in the DRG of injured animals, these cells are not macrophages. Corroborating with these data, when performing the wild type parabiosis with CX3CR1^{GFP/+} CCR2^{RFP/+} animals, we did not observe the presence of CX3CR1 or CCR2 cells in the GRD after SNI. Finally, our data demonstrate that there are two subpopulations of monocytes in the DRG, one of them residing and contributing effectively to the production of local inflammatory mediators and another population of CCR2 cells that may have a more relevant role at the lesion site and thus, the exacerbation of local inflammation may indirectly interfere, in the activation of the cells present in the DRGs, as well as in the production of inflammatory mediators in the tissue, which will contribute to the development of neuropathic pain.

Key words: macrophages; neuropathic pain; CCR2⁺ and CX3CR1⁺ cells; dorsal root ganglia

Lista de Figuras

Figura 1 – Indução da neuropatia pelo modelo de SNI induz ativação microglial.....	46
Figura 2 – Indução da neuropatia induz ativação microglial independente do infiltrado de células mielóides na medula espinal.....	48
Figura 3 - Geração de camundongos quimera com o uso da irradiação favorece o infiltrado de células mielóides na medula espinal.....	49
Figura 4 – SNI induz aumento da expressão de marcadores de ativação de macrófagos e mediadores pró-inflamatórios no gânglio da raiz dorsal.....	51
Figura 5 – Células CD11b presentes no GRD são as principais responsáveis pela produção dos mediadores inflamatórios no tecido.	53
Figura 6 – Caracterização das células CD11b presentes no GRD.	55
Figura 7 - Células CX3CR1 presentes no GRD são as principais responsáveis pela produção dos mediadores inflamatórios.....	57
Figura 8 - Células CCR2+ são importantes para produção de mediadores inflamatórios durante SNI.....	57
Figura 9 - Aumento dos marcadores de ativação de macrófagos no grd não está associado com infiltrado de monócitos.	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Dor.....	13
1.2 Dor neuropática.....	14
1.3 Resposta neuroimune no desenvolvimento da dor neuropática.....	17
1.4 Papel das células CCR2+ e CX3CR1+ na neuropatia.....	25
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais.....	32
3.2 Modelos experimentais in vivo.....	32
3.3 Citometria.....	33
3.4 Sorting celular.....	34
3.5 Ensaio de Imunofluorescência.....	35
3.6 PCR em tempo real.....	37
3.7 Construção de camundongos quimera.....	39
3.8 Estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1 Indução da neuropatia gera ativação microglial independente do infiltrado de células mielóides.....	44
4.2 SNI induz ativação de macrófagos e produção dos mediadores inflamatórios no gânglio da raiz dorsal (GRD).....	49
4.3 Caracterização dos macrófagos/monócitos presentes no GRD.....	52
4.4 Células CCR2+ e CX3CR1+ contribuem para a produção de mediadores inflamatórios do GRD após indução de SNI.....	54
4.5 O aumento dos marcadores de ativação de macrófagos no GRD é gerado, principalmente, pela ativação das células CX3CR1 residentes.....	57
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor é definida segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial emocional desagradável, associada à lesão real ou potencial dos tecidos, sendo sempre subjetiva para cada indivíduo (Loeser e Treede, 2008). Em outras palavras, a dor é uma experiência complexa que inclui não só a percepção consciente de um estímulo capaz de gerar lesão tecidual, mas também é dependente de componentes cognitivos e emocionais (Julius e Basbaum, 2001; Wieseler-Frank e Maier, 2004). Diante dessa definição entende-se porque a quantificação da experiência dolorosa é tão complexa e subjetiva em seres humanos e, especialmente, em animais de laboratório. Por isso, utiliza-se o termo “nocicepção” (“noci” significa “nocivo”; “cepção” significa “recepção”) para definir respostas comportais e neurofisiológicas da dor em modelos experimentais, dissociando do caráter cognitivo-afetivo da resposta que se observa na em pacientes com dor (Wieseler-Frank e Maier, 2004).

Em relação a duração, a dor pode ser dividida em aguda e crônica. A dor aguda é desencadeada por uma lesão primária e serve como um aviso e proteção a danos maiores, sendo que esta pode decorrer após estímulos nocivos, como térmico, mecânico ou químico e serem detectados pelo sistema nervoso periférico. A persistência desse tipo de dor é limitada a um determinado período de tempo que está relacionado ao restabelecimento da função tecidual, podendo durar até três meses. Além disso, existem vários medicamentos efetivos no mercado capazes de aliviar esse tipo de dor. Por sua vez, a dor crônica é uma síndrome que pode ser definida como dor que progride e/ou persiste por no mínimo três meses (Martinez et al., 2017; Wieseler-Frank et al., 2004; Yan et al., 2017). Essa condição representa um grave problema de saúde pública, devido ao seu caráter extremamente debilitante, intensa, constante e que normalmente está associada a problemas psicológicos, como depressão. Os pacientes afetados, de modo geral, são resistentes aos tratamentos disponíveis no mercado e muitos medicamentos

usados para o tratamento da dor crônica provocam intensos efeitos adversos, levando os pacientes a suspenderem o tratamento (Cohen e Mao, 2014; Johannes et al., 2010). No mundo, a taxa de adultos afetados por essa patologia pode chegar a 30%, enquanto no Brasil a dor crônica afeta quase 40% de adultos e idosos; por isso, cada vez mais, existe a necessidade de se compreender os mecanismos envolvidos na gênese e manutenção dessa doença, visando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Ji et al., 2014; Souza et al., 2017).

1.2 Dor neuropática

A dor crônica pode ser dividida em diferentes subclasses de acordo com sua origem: inflamatória, a dor do câncer e a dor neuropática (Ji et al., 2014). Embora a dor inflamatória tenha sua própria etiologia, tanto a dor do câncer como a dor neuropática compartilham componentes inflamatórios, o que faz da dor inflamatória o tipo mais amplo de dor. As dores crônicas de origem inflamatória são determinadas por injúria tecidual periférica e ativação persistente de nociceptores, resultando em plasticidade funcional do sistema nervoso (alterações na sensibilidade nociceptiva e expressão de receptores, canais iônicos, neurotransmissores e enzimas) contribuindo para a persistência do quadro doloroso, independentemente da resolução do processo inflamatório (Coutaux et al., 2005; Kandel et al., 2000;). Outro tipo de dor crônica que apresenta uma grande importância clínica é a neuropática.

A dor neuropática, por sua vez, foco de estudo desse trabalho, é definida pela IASP como uma dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial central ou periférico (Loeser e Treede, 2008). Essa patologia afeta em média de 7-10% da população mundial, sendo que no Brasil a frequência de dor crônica com predominância de componentes neuropáticos é de aproximadamente 4,2% na população (Colloca et al., 2017; Bouhassira et al., 2008;). A dor neuropática periférica pode resultar de lesões no sistema nervoso periférico provocadas por trauma mecânico, doenças metabólicas, como o diabetes, substâncias químicas

neurotóxicas, neuralgia pós-herpética e invasão tumoral. Já a dor neuropática central pode ser consequência de acidente vascular cerebral, lesão na medula espinhal e esclerose múltipla (Bouhassira et al., 2008; Colloca et al., 2017; Costigan et al., 2009; Nishikawa e Nomoto, 2017; Scholz e Woolf, 2002).

A caracterização da dor neuropática é complexa e heterogênea, pois os sintomas podem oscilar no tipo, na intensidade e no tempo. No entanto, as principais características da dor neuropática são: alodinia (dor resultante de estímulos normalmente não dolorosos, como por exemplo o contato com as roupas), hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo previamente doloroso), parestesia (sensação anormal dos sentidos ou uma sensibilidade geral que se traduz em uma sensação de dormência ou formigamento), disestesia (perda de sentido, em especial o tato) e dor espontânea. (Austin e Moalem-Taylor, 2010; Woolf e Mannion et al., 1999).

Em consequência ao dano no tecido nervoso ocorre uma amplificação da resposta nociceptiva frente a estímulos tanto nocivos como inócuos, que passam a ser percebidos como dolorosos e que estão relacionados a uma série de alterações na via de transmissão da dor (Baron e Binder, 2004; Walker et al., 1995). Essa amplificação, tanto periférica como central, ocorre devido à alteração da expressão de receptores, canais iônicos e neurotransmissores, aumento da excitabilidade neuronal e geração ectópica de potenciais de ação (independentes de qualquer estímulo periférico), alterações atróficas nos neurônios lesionados (como redução do calibre do axônio e do tamanho do corpo celular), perda do contato dos terminais dos neurônios aferentes com os neurônios da medula espinhal, até a morte das células neuronais, facilitação e desinibição da transmissão sináptica, além de mudanças na conectividade sináptica e reorganização dos circuitos nociceptivos centrais (Austin e Moalem-Taylor, 2010).

Brevemente, a via neural da dor se inicia nas terminações nervosas aferentes somatossensíveis que podem ser formadas pelas fibras A δ (mielinizadas e de rápida condução)

e as fibras C (amielinizada e lenta condução), cujos corpos celulares dos neurônios estão localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD). Assim, frente a um estímulo, essas fibras transduzem o sinal nocivo externo em atividade elétrica e dessa maneira, os potenciais de ação gerados são conduzidos até o corno dorsal da medula espinal onde estão localizados os neurônios de segunda ordem. Esse segundo neurônio envia a informação para os centros superiores através do trato espinotalâmico lateral até o tálamo, onde os neurônios de terceira ordem são projetados do tálamo para o córtex cerebral (Nishikawa e Nomoto, 2002; Scholz e Woolf, 2002).

O tratamento farmacológico para a dor neuropática é bastante limitado e geralmente se concentra no tratamento de sintomas, pois a causa da dor, dificilmente consegue ser tratada. As opções mais eficazes disponíveis atualmente são as mesmas de alguns anos atrás: analgésicos opióides, anticonvulsivantes, antidepressivos, antagonistas dos receptores N-metil-Daspartato (NMDA) e corticóides (mais eficaz na dor crônica inflamatória). Embora alguns indivíduos possam inicialmente responder a esses tratamentos, a terapia medicamentosa se torna falha ou perde a sua eficácia, além de causar diversos efeitos colaterais ao longo do tempo (Attal et al., 2006; Mika et al., 2013; Moulin et al., 2014; White et al., 2005).

Dada a complexidade dessa síndrome é necessário que haja o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da dor neuropática. Apesar da descoberta de numerosas moléculas consideradas essenciais para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, poucas terapias baseadas nessas moléculas foram bem-sucedidas (White et al., 2005). Uma razão para isso pode ser o negligenciamento do importante papel da resposta neuroinflamatória que acompanha frequentemente o dano nervoso periférico e toda a via de transmissão nervosa até o sistema nervoso central, resultando em dor neuropática (Watkins e Maier, 2002). Nesse sentido, fica claro que a elaboração de novos medicamentos para dor neuropática requer uma compreensão aprofundada dos mecanismos celulares e moleculares

envolvidos no desenvolvimento da dor crônica, incluindo aqueles relacionados à resposta inflamatória gerada após a lesão nervosa periférica.

1.3 Resposta neuroimune no desenvolvimento da dor neuropática

O desenvolvimento da dor neuropática envolve não apenas componentes neurais, mas também células não neuronais como células de Schwann, células satélites, células da glia (astrócitos, micróglia e oligodendrócitos) e células do sistema imune, que podem ser residentes ou recrutadas após a lesão do tecido nervoso (Mcmahon et al., 2005). Essas células podem interagir em condições patológicas ou normais com os nociceptores presentes em compartimentos anatômicos distintos: sistema nervoso periférico (SNP; tecidos presentes no local da lesão, nervos e gânglios da raiz dosal (GRDs) e com o sistema nervoso central (SNC; medula espinal e regiões supraespinais). Assim, em condições adversas, como durante a lesão de estruturas neurais, em que há alteração na homeostase do SNP e/ou SNC, essas células não neuronais podem produzir mediadores pró- ou anti-inflamatórios, que serão reconhecidos pelos nociceptores, resultando em maior ou menor percepção dolorosa (Ji et al., 2016; Woolf C., 2004).

Após a lesão do nervo periférico, quando a integridade do nervo é alterada, células residentes ou aquelas que são recrutadas para a região da lesão são ativadas e liberam uma série de mediadores que dão início a resposta inflamatória local (Mcmahon et al., 2005). As primeiras células a reagirem ao dano tecidual são as células de Schwann e células imunes residentes, como mastócitos e macrófagos. As células de Schwann, constituintes do nervo, desempenham um papel crucial na regeneração do nervo lesionado, através de um processo chamado de desdiferenciação, no qual as células voltam para um estado imaturo e, assim, recuperam a sua capacidade de reparação tecidual. Durante a regeneração dos axônios lesionados, as células de

Schwann produzem mediadores como o fator de crescimento neuronal (NGF) e fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) que promovem o crescimento axonal e a remielinização, bem como ativação e sensibilização dos nociceptores, contribuindo assim para o início da resposta dolorosa à lesão (Arthur-Farraj et al., 2012; Esper e Loeb, 2004; Malin et al., 2006). Essas células também secretam citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), quimiocinas (como CCL2), óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas e metaloproteases que juntos contribuem para o processo de recrutamento de leucócitos para o tecido lesionado (Machelska, 2011; Stein e Machelska, 2011).

Os mastócitos residentes, após o dano do nervo, desgranulam e também liberam mediadores inflamatórios, como: histamina, serotonina, NGF e leucotrienos, os quais podem sensibilizar os nociceptores e colaborar para o recrutamento de outras células imunes, como os neutrófilos (Kim e Moalem-Taylor, 2011; Smith et al., 2007; Zuo et al., 2003). Uma vez recrutados para o local da lesão, os neutrófilos, além de contribuírem para o aumento da hiperalgesia através da liberação de moléculas que atuam diretamente sobre nociceptores (como bradicinina, prostaglandinas e ATP), também promovem uma amplificação da resposta inflamatória local através da liberação de quimiocinas e citocinas. (Moalem et al., 2004; Kumar e Sharma, 2010; Perkins e Tracey, 2000;). A contribuição dessas células durante o processo neuropático foi avaliada por Perkins e Tracey 2000, em um estudo que demonstra que há um substancial infiltrado de neutrófilos no nervo lesionado, com pico de recrutamento 24 horas após o dano. De modo interessante, embora a depleção dessas células logo após a indução da lesão nervosa tenha sido capaz de reduzir o desenvolvimento da hipernocicepção, o tratamento tardio com anticorpos neutralizantes não reverteu os sintomas já estabelecidos, demonstrando que os neutrófilos atuam primordialmente em estágios iniciais do desenvolvimento da neuropatia (Morin et al., 2007; Perkins e Tracey, 2000;).

Embora em menores proporções, quando comparado a neutrófilos e macrófagos, os linfócitos também são recrutados para o local da lesão neural. A contribuição dessas células para o desenvolvimento e manutenção da neuropatia foi inicialmente descrita por Moalem-Taylor e colaboradores 2004, em um trabalho utilizando-se camundongos nudes (atímicos). Observou-se uma diminuição substancial da hipersensibilidade mecânica e térmica nos animais deficientes de linfócitos após a lesão periférica, as quais foram restauradas após transferência de células T tipo 1 helper (Th1), sugerindo um papel pró-nociceptivo deste subtipo celular (Moalem et al., 2004). Trabalhos posteriores também demonstraram que camundongos deficientes para o receptor de interleucina dezessete (IL-17), uma citocina primordialmente produzida por células T tipo 17 (Th17), também apresentam redução da hipersensibilidade térmica após lesão periférica, sugerindo que diferentes subtipos de linfócitos podem estar envolvidos no desenvolvimento e manutenção da neuropatia (Day et al., 2014).

Além dos subtipos de leucócitos previamente citados, observa-se um infiltrado massivo de macrófagos/monócitos no local da lesão. Essas células representam uma das subpopulações mais bem caracterizadas durante o processo inflamatório que se instala imediatamente após a lesão nervosa periférica (Mueller et al., 2001). Os macrófagos residentes, que configuram até 9% da população celular dos nervos periféricos intactos, juntamente com os monócitos circulantes recrutados para o local da lesão, secretam diversos mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , prostaglandinas, eicosanóides, fatores de crescimento e óxido nítrico, que podem levar a sensibilização dos neurônios aferentes primários (Gaudet et al., 2011; Sommer & Kress, 2004; Zelenka et al., 2005), contribuindo com o desenvolvimento da hipersensibilidade. Embora o papel proinflamatório dessa subpopulação seja mais bem caracterizado, os macrófagos, juntamente com as células de Schwann, também participam da regeneração do nervo lesionado por meio da sua atividade fagocítica, contribuindo para o processo denominado regeneração Walleriana, no qual é responsável por remover os detritos

de axônio e mielina (Dubový P. 2011; Ramer et al., 1997). Adicionalmente, trabalhos mais recentes demonstram que, em fases um pouco mais tardias após a lesão nervosa periférica, é observado um importante infiltrado de macrófagos alternativamente ativados (macrófagos M2), responsáveis por auxiliar no estabelecimento de um microambiente imunossupressor crucial para o início do reparo tecidual e restauração da homeostase local (Ydens et al., 2012).

De um modo geral, toda esta complexa resposta inflamatória gerada no nervo após a indução da lesão culmina na produção de diferentes mediadores hiperalgésicos tais como citocinas, quimiocinas, eicosanoides, substância P, prostaglandinas e radicais livres que podem atuar na superfície dos neurônios nociceptivos primários via receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) ou agirem diretamente em canais iônicos provocando sua ativação (Basbaum et al., 2009; Bevan e Wilson, 1999). Dessa forma, uma vez ativados, esses receptores ou canais podem regular direta ou indiretamente a permeabilidade da membrana neuronal, alterando o fluxo iônico dos neurônios e assim, facilitar a geração e transmissão de impulsos nervosos (Cunha et al., 1999; England et al., 1996; Ferreira et al., 1989). Apesar da grande importância das células não neuronais, é importante ressaltar que a interação sistema nervoso-sistema imune é bidirecional, pois tanto os neurônios podem responder aos mediadores inflamatórios, como também produzem citocinas, quimiocinas e neurotransmissores em resposta a esses estímulos, sendo que todos esses mediadores são capazes de modular a resposta inflamatória (Calvo et al., 2012). Desse modo, fica claro que os eventos periféricos gerados são cruciais para o desenvolvimento da alodinia, hiperalgesia e outros fenômenos que compõem a síndrome da dor neuropática.

Além da ativação local, na via neural de transmissão da dor também há ativação das células presentes nos GRDs e na medula espinal, sendo a ativação dessas células um processo crucial para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.

A transecção periférica dos axônios dos neurônios sensoriais primários gera profundas alterações no seu metabolismo, na sua capacidade regenerativa e excitabilidade (Costigan et al., 2002) e, assim, parece plausível que a lesão neural reflita em diversas alterações, não apenas no local da lesão, mas também no GRDs, onde estão localizados os corpos dos neurônios aferentes primários. Além dos corpos neuronais, os GRDs são estruturas formadas por células satélites e células imunes residentes, como macrófagos.

As células satélites, são células que circundam os corpos celulares dos neurônios sensoriais e possivelmente suportam, protegem e contribuem para a sobrevivência e plasticidade dos neurônios sensoriais especialmente após a lesão. Entretanto, após a lesão dos neurônios essa subpopulação sofre alterações fenotípicas, além de se dividirem e formarem novas conexões entre si através de junções gap (Christie et al., 2015; Hanani M., 2005; Kim e Moalem-Taylor, 2001).

Adicionalmente, entremeando essas células há a presença de macrófagos residentes, cuja origem ainda é desconhecida. Diversos estudos têm demonstrado que a indução da neuropatia por diferentes modelos (quimioterápicos ou lesão direta dos nervos) podem levar ao aumento de marcadores de ativação de macrófagos nos GRDs, especialmente da molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (Iba-1) e CD68 em tempos iniciais após a indução da neuropatia (Hu e Mclachlan, 2003; Kim et al., 2011; Komori et al., 2011; Kwon et al., 2014; Vega-Avelaira et al., 2009; Ton et al., 2013; Zhang et al., 2016). Embora diversos trabalhos afirmem que após a lesão de nervos periféricos ocorra um infiltrado de macrófagos nos GRDs ipsilaterais à lesão, ainda é controverso se este aumento dos marcadores de ativação de macrófagos observado está de fato associado ao recrutamento dessas células para o local ou apenas à ativação/proliferação de células residentes, uma vez que as técnicas utilizadas nos trabalhos em questão são apenas qualitativas ou semi-quantitativas. Apesar da origem das células em questão não estar bem estabelecida, é bem descrito que os macrófagos presentes no

GRD contribuem para o desenvolvimento da neuropatia, uma vez que diferentes estudos demonstram que a depleção sistêmica de macrófagos/monócitos circulantes por administração intravenosa de clodronato, bem como a aplicação intra-ganglionar de minociclina, reduzem a expressão de moléculas de ativação e de mediadores inflamatórios cruciais no desenvolvimento do processo neuropático neste tecido (IL-6 e LIF).

De maneira geral, pode-se dizer que a lesão periférica do nervo provoca a ativação de células do sistema imune, células satélites e neurônios que constituem os GRDs e essas células, uma vez ativadas, produzem mediadores proinflamatórios que modulam direta ou indiretamente a atividade neuronal, contribuindo com a sensibilização periférica (Coprav et al., 2001; Kwon et al., 2013; Ji et al., 2009; Nicol et al., 1997). Como exemplo desses mediadores produzidos, podemos citar TNF- α e IL-1 β , que sabidamente aumentam a excitabilidade e a sensibilidade dos neurônios sensoriais através da ativação dos canais TTX-resistentes ao sódio e os canais de cátions receptores de potencial transitório (TRPV1) levando à exacerbação da hipersensibilidade (ou desenvolvimento da hiperalgesia) (Jin e Gereau, 2006; Ji et al., 2009).

Uma vez sensibilizados pelos mecanismos descritos acima, os corpos dos neurônios que constituem os GRDs conduzem o potencial de ação gerado até o corno dorsal da medula espinal. Na medula espinal, onde estão localizados neurônios de segunda ordem, interneurônios e células da glia, também ocorrem importantes alterações em resposta a lesões periféricas.

Trabalhos prévios demonstram que, após a lesão de nervos periféricos ocorre intensa proliferação e ativação microglial, bem como aumento da expressão de proteínas de superfície consideradas marcadores de ativação dessas células, como Iba-1, CD11b e CD45. Além disso, diversas evidências suportam que a ativação microglial está relacionada com a patogênese da dor neuropática. (Calvo et al., 2012; Grace et al., 2014; Ji et al., 2016). Diversos sinais podem levar ativação microglial, o que inclui: ATP, fator 1 estimulante de colônia (CSF1), quimiocinas (CCL2/CX3CL1/fractalquina) e proteases, que podem ser oriundos da lesão ou de neurônios

sensoriais ativados. Paralelamente, a expressão dos receptores para ATP e CX3CL1 (P2X4/P2X7/ P2Y12 e CX3CR1, respectivamente) são aumentados seletivamente na micróglia em resposta a lesão neuronal (Ji et al., 2013; Grace et al., 2014). A ativação desses receptores ativa vias de sinalização intracelular que envolve, por exemplo, a fosforilação da proteína quinase P38 (proteína MAP) que assim conduz à produção e liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-18, fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF) e prostaglandina E2 (PGE2) (Sweitzer et al., 1999; Felts et al., 2005; Honore et al., 2006). Esses neuromoduladores são capazes de alterar as funções dos neurônios sensoriais e dos interneurônios, bem como dos astrócitos presentes na medula espinal, uma vez que essas células expressam receptores para grande parte desses mediadores e podem responder diretamente a eles, contribuindo para o desenvolvimento da neuropatia.

Os astrócitos em condições fisiológicas desempenham inúmeras funções no SNC, como a reciclagem de neurotransmissores, regulação da concentração de íons extracelulares, modulação da transmissão sináptica, dentre outras. No entanto, a lesão neuronal periférica induz várias alterações funcionais e morfológicas nessas células, como a perda da capacidade de manter as concentrações homeostáticas de potássio (K⁺) e glutamato, levando a hiperexcitabilidade neuronal (Ji et al., 2013). Além disso, os astrócitos também podem sinalizar diretamente para os neurônios através de junções gap, as quais estão aumentadas após lesão neuronal. Assim, a alteração na comunicação dessas células pode levar ao aumento da liberação de glutamato, ATP e quimiocinas e então potencializar a transmissão sináptica excitatória na medula espinal (Chen et al., 2014). Em comparação a resposta microglial, a astrocítica inicia-se em um tempo posterior, mas é sustentada por um período mais longo, o que indica sua contribuição para a perpetuação da dor (Gao e Ji, 2010; Ji et al., 2014).

Além do evidente papel desempenhado pela micróglia e astrócitos no desenvolvimento da neuropatia após lesões periféricas, alguns trabalhos também sugerem que células de origem

mielóide possam infiltrar a medula espinal e contribuir para o desenvolvimento da dor neuropática (Isami et al., 2013; Yao et al., 2016; Zhang et al., 2007). Esses trabalhos, entretanto, utilizaram a metodologia clássica de geração de animais quimera para investigar infiltrado de células circulantes no SNC, que consiste na irradiação dos animais seguida da transferência de células da medula óssea de camundongos doadores GFP+. No entanto, estudos mais recentes demonstram que diferentes doses de irradiação podem levar a um aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), bem como um aumento na expressão de moléculas de adesão e produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas na medula espinal, o que poderia então favorecer a entrada de células mielóides no SNC (Hwang et al., 2006; Kierdorf et al., 2013; Mildner et al., 2011; Yuan et al., 2003). Para confirmar tal fato, trabalhos recentes como o publicado por Tashima et al 2016, demonstra que o infiltrado de células circulantes na medula espinal de animais neuropáticos varia de acordo com a intensidade da irradiação aplicada no animal, mostrando que de fato as doses de radiação utilizadas em trabalhos anteriores poderiam estar provocando os efeitos secundários (rompimento da BHE, por exemplo) indesejáveis da técnica. Corroborando com esses dados, trabalhos posteriores que utilizaram ferramentas genéticas bastante específicas constataram que, ao contrário do que era previamente descrito, modelos de neuropatia periférica não induzem infiltrado de leucócitos na medula espinal (Gattlen et al., 2016; Gu et al., 2016; Kobayashi et al., 2016).

Assim, a intensa ativação microglial observada neste tecido após a lesão periférica parece depender apenas de modo indireto da resposta inflamatória gerada na periferia, embora essa seja crucial para a manutenção da dor neuropática, uma vez que quando há depleção de algum desses subtipos celulares que constituem a medula espinal, os sintomas da dor neuropática, como a nocicepção não se estabelecem.

Como é possível observar, a indução da neuropatia gera profundas alterações ao longo do eixo neural da dor, que se caracteriza especialmente pela ativação de diferentes subtipos celulares e consequente produção de mediadores inflamatórios que conduzem aos sintomas clássicos da dor neuropática. De modo interessante, dentre os subtipos celulares ativados nesse processo, células de origem mielóide se destacam pelo seu envolvimento desde o local da lesão até a medula espinal.

1.4 Papel de células CCR2+ e CX3CR1+ na neuropatia

As células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea podem originar continuamente monócitos a partir de precursores de células dendríticas e macrófagos e progenitores de monócitos comum, seguindo essa ordem. Assim, ainda em estado estacionário, dois subtipos de monócitos podem ser gerados: primeiro os monócitos Ly6Chi, os quais espontaneamente podem se tornar monócitos Ly6Clow na circulação (Geissmann et al., 2003; Hettinger et al., 2013).

As células Ly6Clow, conhecidas por serem um subtipo de célula residente menos prevalente do que as células Ly6Chi, patrulham a superfície do endotélio e controlam a sua integridade e, quando necessário, coordenam seu reparo, principalmente pela produção de mediadores anti-inflamatórios. Os monócitos Ly6Clow também expressam altos níveis do receptor de fractalquina (CX3CR1), considerado um importante fator de sobrevivência dessas células, e diferente dos monócitos inflamatórios, possuem baixa expressão de CCR2 (CD11b+CX3CR1hiCCR2lo) (Auffray et al., 2007; Carlin et al., 2013; Geissmann et al., 2003; Thomas et al., 2015).

O receptor CX3CR1 reconhece especificamente o CX3CL1 ou fractalquina, a qual também possui especificidade única para o receptor, e além de ser amplamente expresso por diferentes subpopulações de macrófagos, também apresenta elevada expressão em células microgliais

ativadas, mas não em astrócitos, neurônios ou oligodendrócitos (Clark e Malcangio, 2014; Staniland et al., 2010).

O CX3CL1 pode ser encontrado em duas formas: uma solúvel e outra associada a membrana, sendo constitutivamente expresso em neurônios do SNC e SNP. A lesão do nervo periférico não altera a expressão total dessa quimiocina nos neurônios da medula espinal e do GRD, mas facilita a clivagem do CX3CL1 presente na membrana, favorecendo o aumento da forma solúvel (Clark e Malcangio, 2014; Chapman et al., 2000; Verge et al., 2004; Zhuang et al., 2007). Este processo de clivagem de CX3CL1 associado a membrana para a forma solúvel é executada por várias proteases, como catepsina S (CatS), metaloproteases, ADAM10 e ADAM17 (Clark et al., 2007; Hundhausen et al., 2003; Hundhausen et al., 2007). Em condições em que há ativação de células do SNC, especialmente da micróglia, as células ativadas passam a secretar elevados níveis dessas proteases, como a CatS, favorecendo a produção de CX3CL1 solúvel (Clark et al., 2007; Clark e Malcangio, 2012). Uma vez que há a interação CX3CL1/CX3CR1, diferentes vias de sinalização podem ser ativadas, como a via das MAPKs, culminando na síntese de citocinas pró-inflamatórias pela micróglia, que regulam transmissão sináptica no corno dorsal da medula espinal e, assim, contribuem para o desenvolvimento da neuropatia (Gao e Ji, 2010; Jin et al., 2003; Zhuang et al., 2007).

O papel do CX3CR1 e seu ligante na dor neuropática ainda é reforçado por trabalhos que demonstram que animais deficientes para este receptor apresentam redução na ativação microglial e não desenvolvem hipersensibilidade mecânica e térmica após lesão do nervo periférico, ao contrário do observado em animais selvagens após administração intratecal de CX3CL1, que apresentam alodinia mecânica e hiperalgesia térmica de maneira dose-dependente mesmo na ausência de qualquer lesão (Staniland et al., 2010). Adicionalmente, a administração intratecal de anticorpo neutralizante contra CX3CL1 é capaz de reverter a dor neuropática via redução da expressão de CatS (Clark et al., 2007).

De modo interessante, a maioria das populações de macrófagos presentes em tecidos adultos não são de origem monocítica, mas derivados de progenitores embrionários que infiltram os tecidos em desenvolvimento antes do nascimento e não apresentam a necessidade de serem substituídos por células derivadas da medula óssea (Goldmann et al., 2016; Prinz e Priller, 2014). Dentre essas subpopulações encontram-se as células microgliais, que se destacam por ser uma linhagem única de macrófago, que se originam exclusivamente de precursores do saco vitelínico e, assim, possuem meia-vida longa e são capazes de se auto-renovar, garantindo a expansão celular (Prinz e Priller, 2014).

Já as células Ly6Chi conhecidas como “monócitos clássicos” ou “monócitos inflamatórios” possuem alta capacidade fagocítica e são rapidamente recrutados para os locais de inflamação, onde produzem altos níveis de mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-12 e TNF- α e ainda podem se diferenciar nos tecidos em células dendríticas ou macrófagos (Geissmann et al., 2003; Meisner et al., 2012; Swirski F. K., 2011; Ziegler-Heitbrock et al., 2013). Esses monócitos inflamatórios, além de Ly6Chi também expressam níveis elevados do receptor da quimiocina CCL2 (CCR2) e baixos níveis de CX3CR1 (CCR2^{hi}CX3CR1^{low}), representando 2-5% dos leucócitos circulantes presentes nos camundongos em condições fisiológicas (Serbina et al., 2008).

A ativação de CCR2 resulta na migração direcional das células portadoras desse receptor, mediada essencialmente por fatores quimiotáticos como o CCL2 (formalmente conhecido como MCP-1), o agonista principal envolvido na sinalização do CCR2 (Chu et al., 2014). Dessa forma, a interação CCL2-CCR2 parece estar presente e ser fundamental em diversas condições inflamatórias, inclusive, na neuropatia. Em modelos de dor inflamatória, por exemplo, a ausência de CCR2 pode levar a uma redução de até 70% da resposta induzida pela aplicação de formalina intraplantar. Já em modelos de neuropatia induzida pela ligação parcial do nervo ciático, o desenvolvimento da alodinia mecânica pode ser suprimido pela falta do

CCR2 (Abbadie et al., 2003; Zhang et al., 2007). O papel do CCR2-CCL2 na neuropatia também é demonstrado através da aplicação intratecal de CCL2 exógeno ou da super-expressão de CCL2 induzida por ferramentas genéticas, em ambos os casos há indução de alodinia mecânica de maneira rápida e consistente em animais saudáveis (Dansereau et al., 2008; Menetski et al., 2007; Tanaka et al., 2004).

Embora o papel deste receptor seja amplamente descrito em modelos de neuropatia, ainda não está claro se as células CCR2+ atuam apenas no local da lesão do nervo periférico ou se são capazes de migrar para o GRD e medula espinal, desempenhando papéis pró-nociceptivos nesses locais (Abbadie et al., 2003; White et al., 2005; Zhang et al., 2007; Zhu et al., 2014). Em modelos de doença que afetam diretamente o sistema nervoso central, como na doença de Parkinson e na encefalomielite autoimune experimental (EAE), a expressão e o papel do CCR2 estão descritas de maneira minuciosa, com ferramentas genéticas que deixam claro sua atividade. Já na neuropatia ainda é necessário uma caracterização mais rigorosa dos monócitos CCR2+, avaliando sua possível contribuição para a resposta inflamatória desencadeada no GRD e na medula espinal (Parillaud et al., 2017; Yamasaki et al., 2014).

Diante desses estudos, não há dúvidas sobre o papel que os macrófagos/monócitos desempenham durante a dor neuropática. No entanto, ainda é necessário que se realize uma caracterização mais ampla e minuciosa do papel que essa subpopulação exerce sobre a resposta inflamatória, especialmente nos GRDs e medula espinal, para que, futuramente, este conhecimento possa ser utilizado no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da dor neuropática.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o papel funcional de monócitos/macrófagos durante o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática gerada por lesão de nervos periféricos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 – Avaliar se a indução da neuropatia pelo modelo de SNI, por si só, pode induzir infiltrado de células mielóides na medula espinal;

2.2.2 – Investigar se a indução da neuropatia pelo modelo de SNI pode gerar aumento de monócitos/macrófagos no gânglio da raiz dorsal;

2.2.3 – Caracterizar o perfil fenotípico e funcional desses monócitos/macrófagos presentes no gânglio da raiz dorsal após indução da neuropatia

2.2.4 - Investigar a origem dos subtipos de monócitos/macrófagos presentes no gânglio da raiz dorsal após SNI;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), deficientes (-/-) para CCR2 e transgênicos, sendo esses os que expressam a proteína fluorescente verde (GFP) *total* ou os que expressam GFP apenas em células CX3CR1⁺ e a proteína fluorescente vermelha (RFP) apenas em células CCR2⁺ (CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}). Todos os animais utilizados apresentavam idade entre 6 a 10 semanas. Os camundongos C57BL/6 WT e CCR2^{-/-} foram obtidos no biotério do Centro de Criação de Camundongos Especiais e Serviço de Biotério – USP, enquanto os camundongos CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+} foram criados no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Durante todos os experimentos os animais foram mantidos no biotério do departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C), ciclo claro/escuro (12 horas) e recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais realizados foram conduzidos de acordo com as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais, recomendadas pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) (Zimmermann, 1983), e avaliados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP (protocolo n° 002/2017).

3.2 Modelos experimentais *in vivo*

Modelo experimental de dor neuropática: SNI (*Spared Nerve Injury*)

O modelo experimental de dor neuropática utilizado nesse estudo foi previamente descrito por Shields (Shields *et al.*, 2003). Brevemente, após anestesia inalatória (isoflurano a 2%), a pele da superfície lateral da coxa traseira passou por assepsia e em seguida foi incisionada, e o músculo femoral divulsionado, expondo as três ramificações do nervo ciático (peroneal comum, tibial e sural). A execução da técnica consistiu na amarração (fio de sutura 4.0) e imediata transecção das ramificações peroneal comum e tibial do nervo ciático, sendo que a ramificação

sural do nervo ciático permaneceu intacta, justificando o nome do modelo “lesão do nervo poupado” (SNI). Por fim, a pele dos animais foi suturada com fio de sutura adequado. Em alguns experimentos, o grupo experimental controle foi composto por animais falsamente operados (sham), ou seja, foi realizada incisão na pele, divulsão do músculo femoral e exposição do nervo ciático de modo similar ao grupo SNI, porém sem manipulação do nervo. A seguir, o músculo e a pele foram suturados.

Modelo experimental de encefalomielite autoimune: EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

EAE foi induzida em camundongos machos com 10 semanas de idade. Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) com emulsão contendo 300µg do antígeno peptídeo MOG35-55 (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) em CFA (adjuvante completo de Freund; Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, Difco) em ambos os lados dos flancos traseiros. Adicionalmente, cada animal recebeu 200 ng de toxina pertussis (PTx; Sigma-Aldrich) em 200 µL de solução salina por via intraperitoneal (i.p.) nos dias 0 e 2 após imunização. Os animais foram imunizados sob anestesia com isoflurano (2%). Os sinais clínicos da EAE foram monitorados diariamente como descrito previamente (Stromnes e Goverman, 2006).

3.3 Citometria de Fluxo

Suspensões celulares provenientes do baço, medula espinal (extraída na porção L4-L6) e GRDs (L3-L5) de camundongos lesionados e seus respectivos controles (animais naïve ou induzidos com EAE) foram analisadas por citometria de fluxo. Primeiramente, os tecidos em questão foram coletados de animais previamente perfundidos transcardialmente com tampão fosfato salino (PBS 1M, essa concentração foi utilizada durante todos os procedimentos). Em

seguida, para isolamento das células do baço, o tecido foi macerado com PBS 1X (pH 7.2) e filtrados em *cell strainer* de 70 μ M (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) para obtenção de uma solução de células únicas (*single cell suspension*). As células obtidas foram centrifugadas a 500 $\times$ g durante 10 minutos a 4°C e, posteriormente, incubadas com tampão de lise de hemácias a temperatura ambiente durante 4 minutos. Por fim, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X e a quantificação e análise de viabilidade celular foram feitas utilizando-se Azul de Trypan em Câmara de Neubauer. Para isolamento das células dos GRDs e medula espinal, os órgãos coletados foram cortados em pequenos pedaços e, posteriormente, incubados em solução contendo 2% de collagenase do tipo II (Sigma- Co, Saint Louis, EUA) por 1 hora a 37°C. A reação da enzima foi bloqueada com PBS 1X contendo 10% de soro fetal bovino. Em seguida, os órgãos foram macerados em *cell strainer* de 40 μ m, centrifugado a 500 $\times$ g por 10 minutos a 4°C e ressuspensos em PBS 1X para a quantificação e análise de viabilidade celular em câmara de Neubauer. Uma vez obtida as suspensões celulares dos órgãos em questão, as células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente e sob abrigo da luz, com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície a serem analisadas. Após incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e então adquiridas no aparelho BD FACSVerse (BD Biosciences). Os anticorpos utilizados para as marcações extracelulares foram: anti-CD45 (clone), anti-CD11b (clone) e anti-Ly6G (clone) (todos adquiridos das empresas BioLegend ou BD Bioscience, CA, EUA). Vale ressaltar que no caso do uso dos animais CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}, esses já possuem o fluoróforo acoplado ao marcador de superfície que está investigando, não sendo nesse necessário o uso de anticorpos. Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo X (Tree Star, Ashland, OR).

3.4 Sorting celular

Os *sortings* celulares foram realizados no aparelho BD FACSAria III (BD Bioscience). Células CD45⁻, CD11b⁺Ly6G⁻ ou CX3CR1⁺CD11b⁺ foram isoladas a partir de GRDs (L3-L5) de animais *wild type* ou CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+} neuropáticos ou naive. Para isso, os GRDs foram coletados de animais previamente perfundidos transcardialmente com PBS 1X e, posteriormente, foram digeridos e processados como descrito no item citometria acima. Em seguida, as células obtidas foram ressuspensas em PBS 1X e incubadas por 15 minutos com os anticorpos anti-CD45-BV421, anti-CD11b-APC e anti-Ly6G-PE (BD Biosciences). As populações de células CD11b⁺Ly6G⁻ ou CX3CR1⁺CD11b⁺ isoladas do GRD foram armazenadas em tampão de lise para posterior extração de RNA (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) e análise por PCR em tempo real.

3.5 Ensaio de Imunofluorescência

Primeiramente, animais neuropáticos ou naive foram anestesiados e perfundidos com PBS 1X por 2 minutos e, subsequentemente, com solução contendo paraformaldeído (PFA 4%, pH 7.3-7.4) por 4 minutos. Posteriormente, o linfonodo, a medula espinal (extraída na porção L4-L6) e os GRDs (L3-L5) extraídos foram mantidos em solução de PFA 4% por mais 24 horas e em seguida transferidos para solução contendo 30% de sacarose, na qual foram mantidos por 48h. Após este processo de pós-fixação/desidratação, os tecidos foram incluídos em meio para congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek), rapidamente congelados em gelo seco e estocados a -70°C. Os cortes (secções) foram realizados no criostato (Leica CM1850, Alemanha), sendo que os GRDs e linfonodos foram cortados com espessura de 16µm e as medulas seccionadas em cortes com 60µm de espessura, mantidas em 2ml de PBS 1X.

Para execução da imunofluorescência dos GRDs e baço, as lâminas contendo as secções foram inicialmente lavadas 3 vezes em PBS 1X por 5 minutos cada lavagem e em seguida,

incubadas em solução de glicina 0,1M por 30 minutos, para retirada completa de grupos aldeídos. Novamente, as lâminas foram lavadas em PBS 1X (3 vezes 5 minutos) e em seguida incubadas com solução contendo 1% de BSA e 0,1% Triton-X, para bloqueio de ligações inespecíficas e permeabilização dos tecidos. Após 1 hora de bloqueio/permealização, os cortes de GRDs e baço foram incubados com anticorpo primário, podendo ser: anti-GFP (1:500) conjugado produzido em cabra (Ab6662- Abcam) e anti-IBA-1 (1:400 - Wako) produzido em coelho.

Todos os anticorpos foram diluídos na solução de bloqueio e mantidos a 4°C em câmara úmida, *overnight*. Após mais um ciclo de 3 lavagens, as secções foram incubadas com anticorpo secundário específico conjugado a Alexa Fluor 594 (1:800 - Life Technologies) durante 2 horas a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas com PBS 1X e montadas utilizando-se o meio de montagem Fluormount™ (Southern Biotech, Birmingham, EUA).

Para execução da técnica com os cortes de medula seguiu-se os mesmos passos anteriores, entretanto, os cortes de 60µm foram mantidos durante todo o tempo em suspensão e não fixados a lâminas, método conhecido como *free floating*. Desse modo, as incubações foram realizadas em placas de 48 poços, contendo as soluções com o anticorpo anti-GFP, sob constante agitação, *overnight*. As incubações com os anticorpos secundários, bem como as subsequentes lavagens dos cortes, também foram realizadas em suspensão, sob constante agitação. Ao fim de todos os passos previamente descritos as secções foram estendidas sobre lâminas gelatinizadas e também montadas utilizando-se Fluormount™ (Southern Biotech).

No caso da imunofluorescência realizada a partir de tecidos coletados de animais CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}, os quais já possuem o fluoróforo acoplado a proteína de interesse, seguimos os mesmos passos anteriores até a etapa da glicina, posteriormente as lâminas já foram lavadas e finalizadas com meio de montagem.

Todas as lâminas foram posteriormente visualizadas e fotografadas em microscópio confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha).

3.6 RT- PCR em Tempo Real

Avaliação da expressão gênica: Extração de RNAm e RT-PCR em tempo real

As expressões do RNA mensageiro (RNAm) foram avaliadas por RT-PCR, que consiste na síntese de moléculas de DNA complementar (cDNA), a partir da ação da enzima transcriptase reversa (RT) sobre o RNAm de cadeia simples. Em seguida, fez-se a reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real), a qual consiste em sintetizar muitas cópias de uma região específica da região gênica de interesse, utilizando, sequência de *primers* específicas, diferentes temperatura e a enzima DNA polimerase.

Coleta das amostras

Amostras de medula espinal (extraída na porção L4-L6) e GRDs (L3-L5) foram coletadas de animais neuropáticos ou naive previamente perfundidos transcardialmente e estocadas em 500 µL de solução de Trizol (Sigma-Aldrich) à -70°. Em outros momentos, como no caso das células isoladas dos GRDs por *sorting*, essas foram estocadas em tampão de lise do kit para extração de RNA obtido pela empresa Qiagen (RNeasy Micro Kit®).

Processamento das amostras e extração do RNAm

Os tecidos juntamente com o Trizol foram homogeneizados, utilizando o homogenizador (IKAT 10 basic ultra-turrax). A extração do RNAm total foi realizada como se segue: para cada 500 µL de suspensão (tecido + Trizol), foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) e 100 µL de água (Sigma-Aldrich). Após agitação em vórtex, as amostras

foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa, contendo RNA, foi transferida para outro tubo, que já continha 400 µL de isopropanol (Merck) gelado. Em seguida as amostras foram agitadas no vórtex e incubadas *overnig* a -20°C. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após este procedimento, o líquido sobrenadante foi descartado cuidadosamente, ficando aderido aos tubos o precipitado de RNA. Esse precipitado foi lavado duas vezes de forma sucessiva, com 500 µL álcool etílico 80% e 500 µL álcool etílico absoluto. Em cada lavagem as amostras foram agitadas no vórtex e posteriormente centrifugadas a 7000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi ressuspensão em água ultra-pura (Sigma-Aldrich). A concentração de RNA foi determinada por meio da densidade ótica no comprimento de onda de 260nm, utilizando o aparelho nanoVue plus GE®.

Síntese do cDNA e RT-PCR em Tempo Real

A transcrição de RNAm para cDNA, foi feita por meio da atividade da enzima transcriptase reversa MultiScribe®, utilizando-se 300-500 ng de RNAm total, e os demais reagentes fornecidos pelo kit de transcrição reversa de RNAm em cDNA - High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Para essa reação foram utilizados tempos e temperaturas estabelecidos pelo fornecedor do Kit. A reação quantitativa do PCR em tempo real foi feita no aparelho stepOne Plus Real-Time PCR System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA). O PCR em tempo real foi executado com volume final de 6,25 µL usando SYBR-green (3,125µL SYBR-green® + 0,25 µL de *primer* sequência sense + 0,25 µL *primer* sequência anti-sense + 1,625 µL de água) e 1 µL de amostra de cDNA. A placa na qual esses reagentes e amostras foram pipetados foi mantida a 95 °C (10 min), e mais 40 ciclos de 94°C (1 min), 56° C (1 min) e 72° C (2 min). A curva de dissociação, para as amplificações com SYBR®, foram analisadas a 65-95°C, para

verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “*cycle threshold*” (CT) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram normalizados com base na expressão de GAPDH como controle endógeno. As sequências dos pares de primers (camundongo) utilizados estão demonstradas na tabela abaixo.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

SEQUÊNCIAS		
Gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
<i>Gapdh</i>	GGGTGTGAACCACGAGAAAT	CCTTCCACAATGCCAAAGTT
<i>Tgfb</i>	ACCGCAACAACGCCATCTAT	TCAAAAGACAGCCACTCAGGC
<i>Il10</i>	AACAAAGGACCAGCTGGA CAAC	GCAACCCAAGTAACCCTTAAAGTC
<i>Tnf</i>	AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG	GGCTTGTCACTCGAATTTGAGA
<i>Il6</i>	TTCCTACCCCAATTTCCAAT	CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC
<i>Il1b</i>	ATGGGCTGGACTGTTTCTAATG	ATTCACGAAAAGGGAGCTCC
<i>Aif1</i>	GCTTCAAGTTTGGACGGCAG	TGAGGAGCCATGAGCCAAAG
<i>Cx3cr1</i>	GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG	CGCCCAAATAACAGGCCTCAGCA
<i>Itgam</i>	GAGTCTGCCTCCGTGTCCGC	TACGTGAGCGGCCAGGGTCT
<i>Mcp-1</i>	GCATCCACGTGTTGGCTCA	CTCCAGCCTACTCATTGGGATCA
<i>Ccr2</i>	ACAGCTCAGGATTAACAGGGAC TTG	ACCACTTGCATGCACACATGAC

3.7 Construção de camundongos quimeras

Parabiose

Pares de camundongos fêmeas (*wild type* e GFP⁺ ou *wild type* e CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}) com peso e tamanhos semelhantes foram deixadas por duas semanas

na mesma caixa para habituação, antes da realização da técnica. Para execução da parabiose, os animais foram mantidos durante todo o procedimento anestesiados com vaporizador de isoflurano (2%). Assim, a lateral esquerda do camundongo posicionado à esquerda e a lateral direita do camundongo posicionado à direita foram completamente raspadas, começando aproximadamente 1 cm acima do cotovelo até 1 cm abaixo do joelho. As áreas raspadas passaram por assepsia e em seguida realizou-se as incisões cutâneas longitudinais. Após a incisão, a pele foi cuidadosamente separada da fáscia subcutânea e assim, iniciou-se a união dos animais: primeiramente, ligando o olécrano esquerdo de um animal ao olécrano direito do outro através de um nó cirúrgico duplo; em seguida, a pele dos animais foram conectadas através de sutura contínua utilizando um fio Vicryl 5.0 absorvível. Esse procedimento de união foi realizado com os camundongos em decúbito ventral e posteriormente em dorsal. Ao finalizar todas as etapas da técnica administrou-se 0,5ml de NaCl 0,9% por via subcutânea para cada camundongo para evitar a desidratação, além dos analgésicos: Carprofeno, a cada 24 horas (10mg/kg) e Buprenorfina a cada 12 horas (0,1mg/kg) administrados por via intraperitoneal durante dois dias. Como profilaxia, evitando possíveis infecções bacterianas, os animais também foram tratados por 15 dias que se seguiram à parabiose o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino diluído na água a uma concentração de 10mg/mL. O período estabelecido para a chamada ‘pega medular’ foi cerca de 2 meses após a irradiação e transferência da nova medula óssea. Para minimizar qualquer tensão ao alcançar o alimento na gaiola, a ração foi umedecida e deixada no chão da caixa.

Após um período de 10 semanas, suficientes para que haja o quimerismo do sangue, apenas os animais *wild type* foram submetidos a neuropatia. Assim, no sétimo dia pós indução do SNI, os animais foram anestesiados para coleta do sangue e confirmação do quimerismo por citometria de fluxo e em seguida separados, para que fossem perfundidos e tivessem os tecidos de interesse coletados. O sangue coletado dos animais *wild type* para confirmação do

compartilhamento das células hematopoiéticas, foram avaliados quanto a presença de células GFP⁺ por citometria de fluxo. As amostras foram processadas de modo que, nas amostras de sangue, células vermelhas foram eliminadas utilizando tampão de lise adequado. A frequência de células GFP⁺ foram determinadas em citômetro de fluxo (FACS-Verse; BD Bioscience).

Irradiação

Camundongos WT, com aproximadamente 8 a 9 semanas, foram considerados receptores e expostos a irradiação de 10 e 7 Grays (Gy) por aproximadamente 400 segundos, proveniente de uma fonte de raio X (Mark I (model 25) fonte Cs 137). No dia seguinte à irradiação, receberam 4×10^6 células tronco provenientes da medula óssea dos camundongos doadores GFP⁺, por injeção intravenosa no plexo orbital. Além disso, também mantivemos um grupo controle para comprovar o caráter letal da irradiação, no qual camundongos foram irradiados e não receberam células da medula óssea doadora.

Durante os 15 dias que se seguiram à irradiação os animais receberam tratamento com o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino diluído na água a uma concentração de 10mg/mL. O período estabelecido para a chamada ‘pega medular’ foi cerca de 2 meses após a irradiação e transferência da nova medula óssea.

De modo a confirmar a adequada transferência das células hematopoiéticas, o grupo de animais irradiados e que receberam células de animais GFP-totais, foram sacrificados 2 meses após a reconstituição e, seu baço, linfonodos e sangue total, foram avaliados quanto a presença de células GFP⁺ por citometria de fluxo. As amostras foram processadas de modo que, nas amostras de sangue e baço, células vermelhas foram eliminadas utilizando tampão de lise adequado (150 mM NH₄Cl; 1,25 mM- EDTA; 50 mM NaCO₃; pH=7,2). A frequência de células GFP⁺ foram determinadas em citômetro de fluxo (FACS-Verse; BD Bioscience). A

porcentagem de células GFP+ serviram como indicativo da eficiência da transferência de células hematopoiéticas.

3.8 Estatística

Foi utilizado análise de variancia ANOVA de uma via (*one way*), seguido do teste (*post-hoc*) de Bonferroni para comparacao entre os diferentes grupos. Para se comparar dois grupos de variaveis nao-pareadas, utilizou-se o teste t de *student*. Os dados foram expressos como Media $\pm$ E.P.M., sendo representativos de 2-3 experimentos independentes. Diferencas estatisticas foram consideradas quando $P < 0,05$. As analises estatisticas e confecção grafica foram realizadas atraves do programa estatistico *GraphPad Prism 7.0*.

4. RESULTADOS

4.1 Indução da neuropatia gera ativação microglial independente do infiltrado de células mielóides.

É bem descrito que a indução da neuropatia por diferentes modelos, como SNI, pSNL e SNL é capaz de induzir ativação microglial e que este processo está intimamente relacionado ao desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica (Berger *et al.*, 2011; Gwak *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Mika *et al.*, 2009; Staniland *et al.*, 2010; Zeinali *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2011). Embora diversos estudos sugiram que a indução da neuropatia pudesse induzir não apenas ativação da micróglia, mas também um infiltrado de monócitos na medula espinal, trabalhos mais recentes têm demonstrado que, apesar da massiva ativação e proliferação da micróglia residente, não há recrutamento de células imunes para este tecido após lesão nervosa periférica (Gu *et al.*, 2016; Isami *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2016; Perdiguero *et al.*, 2015; Tashima *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2007). Diante desses dados controversos existentes na literatura, nós iniciamos nosso trabalho investigando se o modelo de neuropatia periférica induzido por SNI, por si só, poderia induzir infiltrado de células mielóides na medula espinal.

Para isso, medula espinal de animais foram coletadas 3, 7 e 10 dias após a indução da lesão e a expressão de marcadores de ativação microglial e de monócitos/macrófago periféricos foi avaliada neste tecido. Observamos, por meio de RT-qPCR, um aumento na expressão de marcadores de ativação de micróglia na porção ipsilateral à lesão, como CX3CR1, CD11b e IBA-1 (figura 1A-C), bem como um aumento da população CD45^{interm} e CX3CR1⁺ uma marcação também considerada característica de células microgliais ativadas (figura 1D-E). Além disso, por imunofluorescência, também constatamos aumento de células CX3CR1⁺ especialmente na região do corno dorsal da medula espinal, após indução da neuropatia 3, 7 e 14 dias pós- SNI (figura 1F).

Figura 1 – Indução da neuropatia pelo modelo de SNI induz ativação microglial. (A-C) Camundongos C57BL/6 WT foram submetidos ao SNI e após 3, 7, 10 e 14 dias da cirurgia foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com PBS 1X. As regiões entre L4-L6 das medulas espinais foram coletadas para avaliação da expressão gênica, por RT-qPCR de alvos relacionados com ativação microglial: *Cx3cr1*, *Itgam* e *Aif1*. Para o RT-qPCR a expressão gênica de cada grupo foi calculada em relação ao grupo controle (0 dia pós-SNI ou *naive*) e normalizadas em relação à expressão de GAPDH (n=6, analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, ****p<0,0001 em relação ao grupo *naive*). (D-E) Medulas espinais de camundongos lesionados também foram coletadas 7 dias após indução do SNI para avaliação da frequência de células CD45^{int} e CX3CR1⁺ (micróglia ativada) por citometria de fluxo, adquiridos no aparelho FACS Verse (*BD Biosciences*) (n=4-5, analisados por teste t de *student*, **p<0,01 em relação ao grupo *naive*). Todos os dados estão expressos como média ± S.E.M. (F) Camundongos CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+} foram submetidos ao SNI e após 3, 7 e 14 dias foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardial com solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%). As regiões entre L4-L5 das medulas espinais foram coletadas para avaliação da ativação de micróglia (CX3CR1), por imunofluorescência. As imagens demonstram os tecidos em aumento de 10x e uma amplificação das regiões dos cornos dorsais (20x e 43x, demarcadas pelos quadros brancos nas figuras). A análise foi realizada por microscopia confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha).

De modo importante, corroborando os dados mais recentes da literatura, observamos que a indução do SNI não gerou aumento na expressão de CCR2, um marcador típico de monócito inflamatório, na porção da medula espinal ipsilateral à lesão (figura 2A). Além disso, ao compararmos o modelo de SNI com o modelo de EAE, no qual sabidamente há um infiltrado substancial de leucócitos (células CD45^{hi}) na medula espinal, observamos que os animais

neuropáticos apresentaram um aumento apenas da população $CD45^{interm}$, indicando ativação microglial, mas não migração de células imunes para o local (figura 2B). A ausência do infiltrado de células mielóides na medula espinal após SNI também foi confirmada por imunofluorescência, não observamos a presença de células $CCR2^+$ 3, 7 e 14 dias após a lesão (figura 2C).

Figura 2 – Indução da neuropatia induz ativação microglial independente do infiltrado de células mielóides na medula espinal. (A) Camundongos C57BL/6 WT foram submetidos ao SNI e após 3, 7 e 14 dias da cirurgia foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com PBS 1X. As regiões entre L4-L6 das medulas espinais foram coletadas para avaliação da expressão gênica, por RT-qPCR do alvo relacionado a células mielóides: *Ccr2*. Para o RT-qPCR a expressão gênica de cada grupo foi calculada em relação ao grupo controle (0 dia pós-SNI ou *naive*) e normalizadas em relação à expressão de GAPDH. (B) Medulas espinais de camundongos lesionados submetidos ao SNI ou ao EAE foram coletadas após 7 e 14 dias respectivamente, para avaliação da frequência de células CD11b⁺CD45^{interm} (microglia ativada) ou CD11b⁺CD45^{high} (células mielóides) por citometria de fluxo, adquiridos no aparelho FACS Verse (*BD Biosciences*). (C) Camundongos CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+} foram submetidos ao SNI ou ao EAE e após 3, 7 e 14 dias da neuropatia ou 14 dias da indução do EAE foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardial com solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%). As regiões entre L4-L5 das medulas espinais foram coletadas para avaliação da presença de CCR2⁺, por imunofluorescência. As imagens demonstram os tecidos em aumento de 10x e uma amplificação da região do sulco da medula espinal (43x, demarcada pelo quadro branco na figura). A análise foi realizada por microscopia confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha). Todos os resultados estão expressos em média $\pm$ S.E.M., n=4-6 animais por grupo, tendo sido analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni ou por teste t de *student* **p<0,01 e ****p<0,0001 quando comparados ao grupo *naive*).

Tendo em vista que trabalhos recentes demonstram que a irradiação pode induzir quebra da barreira hematoencefálica, favorecendo o infiltrado de células periféricas na medula espinal, nós subsequentemente avaliamos se de fato camundongos quimera apresentavam infiltrado de células hematopoiéticas na medula espinal. Para isso, os animais foram irradiados com diferentes intensidades de radiação, as mais comumente utilizadas na literatura: 7Gy e 10Gy, e posteriormente receberam células da medula óssea de camundongos GFP⁺. Podemos observar que ambas as irradiações, especialmente a de 10Gy, foram capazes de induzir infiltrado de células hematopoiéticas (GFP⁺) na medula espinal em animais *naives* (figura 3A). Observamos, entretanto, que ao contrário dos animais irradiados, animais quimera gerados pela técnica da parabiose não apresentaram infiltrado de células GFP⁺ na medula espinal (figura 3B).

Com estes dados, nós podemos inferir que, leucócitos circulantes não são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica e infiltrar na medula espinal após a indução da neuropatia periférica e assim, a ativação microglial ocorre de maneira independente do infiltrado dessas células neste tecido.

Figura 3. Geração de camundongos quimera com o uso da irradiação favorece o infiltrado de células mielóides na medula espinal. (A) Camundongos C57BL6/WT foram irradiados com duas intensidades distintas (7Gy e 10Gy) e em seguida receberam células da medula óssea de camundongos GFP⁺ total. Após 8 semanas da irradiação, os animais foram anestesiados e submetidos a perfusão transcardial com solução de paraformaldeído

4% (PFA 4%). As regiões entre L4-L5 das medulas espinais foram coletadas para avaliação da presença de células mielóides (GFP+), por imunofluorescência. **(B)** Camundongos C57BL/6 também foram mantidos unidos em parabiose com camundongos GFP+ total. Após 10 semanas da realização da parabiose, os mesmos procedimentos anteriormente citados foram realizados. As imagens demonstram os tecidos em aumento de 10x. (n=5). Baço e sangue de camundongos *wild type* previamente irradiados e transplantados com células GFP+ da medula óssea ou em parabiose com animais GFP+ foram coletados para avaliação da frequência de células GFP+ por citometria de fluxo, adquiridos no aparelho FACS Verse (BD Biosciences) (n=4-5).

4.2 SNI induz ativação de macrófagos e produção dos mediadores inflamatórios no gânglio da raiz dorsal (GRD)

Diversos trabalhos já demonstraram que a indução da neuropatia periférica pode levar ao aumento da expressão de marcadores de ativação de macrófagos no GRD, bem como produção de altos níveis de citocinas e quimiocinas nestes órgãos (Kwon *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). Embora diferentes trabalhos sugiram que essas células são as principais responsáveis pela produção desses mediadores inflamatórios, experimentos mais refinados seriam necessários para caracterizar a função dessas células no tecido. Assim, a fim de avaliar o papel das células mielóides no GRD, nós caracterizamos se a indução do SNI seria capaz de gerar aumento da expressão de marcadores de ativação de macrófagos e de mediadores pró-inflamatórios neste tecido. Como esperado, após indução do SNI observamos um aumento na expressão de IBA-1 e dos mediadores MCP-1, IL-6, IL-1 e TNF- α (figura 4A-E) por RT-qPCR, bem como um aumento da população CD45⁺CD11b⁺ nos GRDs ipsilaterais a lesão, por citometria de fluxo (figura 4F).

Figura 4 – SNI induz aumento da expressão de marcadores de ativação de macrófagos e mediadores pró-inflamatórios no gânglio da raiz dorsal (GRD). (A-E) Camundongos C57BL/6 WT foram submetidos ao SNI e após 3, 7 e 10 dias da cirurgia foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com PBS 1X. GRDs (L3-L5) foram coletados para avaliação da expressão gênica, por RT-qPCR de alvos relacionados com ativação de macrófagos e mediadores pró-inflamatórios: *Aif1*, *Ccl2*, *Il6*, *Tnfa* e *Il1*. Para o RT-qPCR a expressão gênica de cada grupo foi calculada em relação ao grupo controle (0 dia pós-SNI ou *naive*) e normalizadas em relação à expressão de GAPDH. (F) DRGs (L3-L5) de camundongos neuropáticos foram coletados após 7 dias da indução do SNI para avaliação da frequência de células CD45⁺CD11b⁺ por citometria de fluxo, adquiridos no aparelho FACS Verse (*BD Biosciences*). Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M., n=4-5 animais por grupo, analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni ou por teste t de *student*, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001 quando comparados ao grupo *naive*.

Com o intuito de caracterizar se esses macrófagos/monócitos presentes nos GRDs são as principais fontes de mediadores inflamatórios após indução da neuropatia periférica, células

CD11b⁺Ly6G⁻ (macrófagos) e CD45⁻ nesses tecidos foram isoladas por *sorting* 7 dias pós-SNI, como esquematicamente demonstrado na figura 5A. Em seguida, realizamos o RT-qPCR para avaliação da expressão dessas moléculas e observamos que as células CD11b⁺Ly6G⁻ de GRDs ipsilaterais à lesão expressam níveis mais elevados dos genes que codificam para *Il6*, *Il1b*, *Tnfa* e *Cx3cr1* em relação à mesma subpopulação isolada de GRDs contralaterais, bem como quando comparados à população CD45⁻ (figura X). Esses dados nos sugerem que os macrófagos/monócitos presentes nos GRDs e que se elevam após a neuropatia são os principais responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios importantes para o desenvolvimento da dor neuropática.

Figura 5 – Células CD11b presentes no GRD são as principais responsáveis pela produção dos mediadores inflamatórios no tecido. (A) Camundongos C57BL/6 WT foram submetidos ao SNI e após 7 dias da cirurgia foram anestesiados e perfundidos transcárdialmente com PBS 1X. GRDs (L3-L5) foram coletados para separação das células CD45⁻ e CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ presentes no tecido através do método de *sorting*, realizado no aparelho FACSAria III (BD Bioscience). (B) As células obtidas foram submetidas ao ensaio de RT-qPCR para análise da expressão gênica dos alvos: *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* e *Cx3cr1*. Os dados foram separados por grupo experimental e expressos por *heat map*; a intensidade da cor é proporcional a expressão de cada gene (10 animais equivalem a n=1) – representativo de 2 experimentos realizados separadamente.

4.3 Caracterização dos macrófagos/monócitos presentes no GRD

Sabe-se que os monócitos circulantes, originados continuamente da medula óssea, podem se apresentar com fenótipos distintos, que de maneira simplificada se dividem em: monócitos “residentes” ou de “patrulha” (Ly6C^{lo}CX3CR1^{hi}CCR2^{lo}) e monócitos “inflamatórios” ou “clássicos” (Ly6C^{hi}CCR2^{hi}CX3CR1^{low}), sendo que esse último pode se diferenciar nos tecidos em células dendríticas ou macrófagos (Hettinger *et al.*, 2013). Assim, baseado na existência de dois subtipos de monócitos, nós investigamos se essas células CD11b⁺Ly6G⁻ presentes no GRD poderiam exibir o perfil de macrófagos residentes ou periféricos, baseando na expressão dos receptores CX3CR1 e CCR2. Para isso, GRD de animais submetidos à indução do SNI foram coletados 3, 7 e 14 dias após a lesão e submetidos à avaliação da expressão desses receptores por diferentes metodologias. Nós observamos um aumento na expressão do mRNA que codifica para CX3CR1 a partir do terceiro dia, bem como de CCR2 a partir do sétimo dia (figura 6A-B). De maneira semelhante, também observamos um aumento da população CD45⁺ e CX3CR1⁺ por citometria de fluxo, 7 dias da indução do SNI (figura 6C). Como esperado, por imunofluorescência, nós também observamos um aumento substancial das células CX3CR1⁺ após a indução da neuropatia em todos os tempos analisados. Surpreendentemente, apesar do aumento significativo da expressão do mRNA que codifica para CCR2, um número ínfimo de células CCR2⁺ foi observado após indução do SNI (figura 6D). Além disso, pudemos observar que houve sobreposição de algumas marcações para CX3CR1 e CCR2, sugerindo que possam existir subpopulações celulares que co-expressam esses receptores. (figura 6E). Em conjunto, esses dados sugerem que existam duas subpopulações de macrófagos no GRD, sendo que as

células CX3CR1+ parecem ter um aumento mais importante/substancial após SNI em relação as células CCR2+.

Figura 6 – Caracterização das células CD11b presentes no GRD. (A-B) Camundongos C57BL/6 WT foram submetidos ao SNI e após 3, 7 e 10 dias da cirurgia foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com PBS 1X. GRDs (L3-L5) foram coletados para avaliação da expressão gênica, por RT-qPCR dos alvos: *Cx3cr1* e *Ccr2*. Para o RT-qPCR a expressão gênica de cada grupo foi calculada em relação ao grupo controle (0 dia pós-SNI ou *naive*) e normalizadas em relação à expressão de GAPDH (n=4-6, analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01 e ****p<0,0001 em relação ao grupo *naive*). (C) DRGs (L3-L5) de camundongos neuropáticos foram coletados após 7 dias da indução do SNI para avaliação da frequência de células CD45⁺ e CD11b⁺ CX3CR1⁺ por citometria de fluxo, adquiridos no aparelho FACS Verse (*BD Biosciences*). (n=4-5, analisados por teste t de *student*, **p<0,01 em relação ao grupo *naive*). (A-C) Dados expressos como média ± S.E.M. (D-E) Camundongos CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+} foram submetidos ao SNI e após 3, 7 e 14 dias foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardial com solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%). DRGs (L3-L5) e linfonodos inguinais foram coletadas para avaliação da presença de células CX3CR1 e CCR2, por imunofluorescência. As imagens demonstram os tecidos em aumento de 20x. A análise foi realizada por microscopia confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha).

4.4 Células CCR2⁺ e CX3CR1⁺ contribuem para a produção de mediadores inflamatórios do GRD após indução de SNI.

Uma vez identificada a presença de duas subpopulações de monócitos/macrófagos no GRD, o objetivo seguinte foi investigar o papel de cada um desses subtipos celulares no desenvolvimento da dor neuropática. Para isso, células CX3CR1⁺Ly6G⁻ e CD45⁻ foram isoladas

de GRDs ipsilaterais à lesão por *sorting* (figura 7A) e em seguida avaliada a expressão gênica de mediadores inflamatórios e de um marcador neuronal como controle do experimento. Com isso, observamos que as células $CX3CR1^{+}Ly6G^{-}$ obtidas de GRDs após a neuropatia periférica expressam níveis elevados dos genes que codificam para *Il1b*, *Tnfa*, *Tgfb* e *Il-10* em relação a mesma subpopulação isolada de GRDs contralaterais e também quando comparado a população $CD45^{-}$ (figura 7B).

Figura 7. Células CX3CR1 presentes no GRD são as principais responsáveis pela produção dos mediadores inflamatórios. (A) Camundongos CX3CR1^{GFP/+} foram submetidos ao SNI e após 7 dias da cirurgia foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com PBS 1X. GRDs (L3-L5) foram coletados para separação das células CD45⁻ e CD45⁺Ly6G⁺CX3CR1⁺ presentes no tecido através do método de *sorting*, realizado no aparelho FACS Aria III (BD Bioscience). (B) As células obtidas foram submetidas ao ensaio de RT-qPCR para análise da expressão gênica de alvos inflamatórios (IL-1b, IL-6, TNF- α) e anti-inflamatórios (TGF- β e IL-10). Os dados foram separados por grupo experimental e expressos por *heat map*; a intensidade da cor é proporcional a expressão de cada gene (10 animais equivalem a n=1) – representativo de 2 experimentos realizados separadamente.

Tendo em vista o pequeno aumento de células CCR2⁺ observado por imunofluorescência, tornou-se experimentalmente inviável isolar essas células após por *sorting* para avaliar a expressão dos mesmos mediadores. Por isso, utilizamos camundongos deficientes para CCR2 como um modo alternativo para avaliar o papel dessas células após indução da neuropatia. Através do RT-qPCR observamos que a expressão de IL-1 β e TNF- α nos GRDs de animais CCR2^{-/-} ipsilaterais à lesão praticamente não se alteraram em relação aos animais *wild type* naive e reduziram em relação aos animais *wild type* com SNI, enquanto a expressão de CX3CR1 e IL-6 apresentaram um perfil oposto (figura 8A-D).

Figura 8 – Células CCR2⁺ são importantes para produção de mediadores inflamatórios durante SNI. (A-D) Camundongos C57BL/6 WT ou CCR2^{-/-} foram submetidos ao SNI e após 7 dias da cirurgia foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com PBS 1X. GRDs (L3-L5) foram coletados para avaliação da expressão gênica, por RT-qPCR dos alvos: *Cx3cr1*, *Il1b*, *Tnfα* e *Il6*. Para o RT-qPCR a expressão gênica de cada grupo foi calculada em relação ao grupo controle (WT naive) e normalizadas em relação à expressão de GAPDH.

Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M., n=4-6 animais por grupo, analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

Assim, podemos inferir que as células CX3CR1⁺ possam ser as principais células responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios no GRD após indução de SNI, enquanto as células CCR2⁺ parecem contribuir apenas de maneira parcial para a produção de IL-1 β e TNF- α neste tecido, uma vez que a expressão desses mediadores não foi totalmente suprimida na ausência desse subtipo celular. Além disso, a ausência de variação na expressão de CX3CR1 nos animais deficientes para CCR2 em relação aos animais *wild type* neuropáticos nos leva a pensar que células as CCR2 são distintas das células CX3CR1, uma vez que a ausência de CCR2 não interferiu na expressão de CX3CR1.

4.5 O aumento dos marcadores de ativação de macrófagos no GRD é gerado, principalmente, pela ativação das células CX3CR1 residentes.

Embora tenhamos identificado dois subtipos de monócitos nos GRDs após a indução da neuropatia, ainda não seria possível responder à questão que permanece inconclusiva na literatura: a origem das células mielóides no GRD. Afim de responder a esse questionamento realizamos inicialmente uma parabiose de animais *wild type* com animais GFP⁺. Dois meses após a realização da parabiose avaliamos a frequência de células GFP positivas no baço e sangue de animais *wild type*, a fim de validarmos se esses animais de fato tiveram a circulação e células hematopoiéticas compartilhadas. Uma vez observado que os animais *wild type* apresentavam aproximadamente 50% de células GFP⁺, os animais *wild type* foram submetidos a neuropatia. Sete dias após a indução de SNI, pudemos observar, por imunofluorescência, um pequeno aumento de células GFP⁺ no DRG de animais lesionados, no entanto, de maneira interessante não há colocalização dessas células com células IBA-1⁺ (figura 9A), Por isso,

embora haja um infiltrado de células circulantes, esse infiltrado não parece ser composto por macrófagos. A fim de confirmar que as células GFP+ observadas de fato não correspondiam a uma subpopulação de macrófagos, nós realizamos uma parabiose de animais *wild type* com animais CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}. Após 10 semanas, a pega foi avaliada e embora a quantidade de células CX3CR1+ tenha sido substancialmente menor no sangue de animais *wild type*, nós não observamos presença de células CX3CR1 ou CCR2 no GRD após SNI (figura 9B).

Figura 9. Aumento dos marcadores de ativação de macrófagos no *grd* não está associado com infiltrado de monócitos. (A) Camundongos C57BL/6 foram mantidos unidos em parabiose com camundongos GFP+ total. Após 10 semanas da realização da parabiose, os animais foram anestesiados e submetidos a perfusão transcárdial com solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%). Os GRDs (L3-L5) foram coletadas para avaliação da presença de células mielóides periféricas (GFP+), por imunofluorescência. (B) Camundongos C57BL/6 também foram mantidos unidos em parabiose com camundongos $CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}$. Após 10 semanas da parabiose, os animais foram anestesiados e perfundidos com solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%). Os GRDs (L3-L5) foram coletadas para avaliação da presença de células CX3CR1 ou CCR2, por imunofluorescência. (A-B) Baço e sangue dos camundongos *wild type* em parabiose com os animais GFP+ ou $CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}$ foram coletados para avaliação da frequência de células GFP+, CX3CR1+ ou CCR2+ por citometria de fluxo, adquiridos no aparelho FACS Verse (BD Biosciences). As imagens demonstram os tecidos em aumento de 20x. (n=5)

5. DISCUSSÃO

Diversas formas de lesão do sistema nervoso central e/ou periférico (provocadas por trauma, agentes tóxicos, infecções, metabólitos ou doenças de caráter autoimune) resultam em alterações profundas na função dos neurônios sensoriais primários e nas suas vias de projeção central, mas também estão associadas a uma resposta imune robusta em quase todos os níveis do sistema somatossensorial (Calvo *et al.*, 2012). O recrutamento de células inflamatórias e a expressão de citocinas têm sido reportados não apenas em modelos murinos, mas também em biópsias de nervos de pacientes com neuropatia, sendo a gravidade da resposta observada nesses tecidos diretamente relacionada ao grau da dor neuropática apresentada por estes pacientes (Empl *et al.*, 2001; Lindenlaub e Sommer, 2003; Austin e Moalem-Taylor, 2010; Kim e Moalem-Taylor, 2011). A resposta inflamatória gerada em resposta a esses danos envolve tanto células do sistema imune inato, quanto do sistema imune adaptativo, sendo que os mediadores liberados por essas células, como citocinas e quimiocinas, são capazes de alterar diretamente a transdução e transmissão de informações nociceptivas para o SNC por neurônios sensoriais (Cui *et al.*, 2000; Abbadie *et al.*, 2003; Moalem *et al.*, 2004; Moalem *et al.*, 2005; Moalem e Tracey, 2006; Hu *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2008; Austin e Moalem-Taylor, 2010; Chen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Em conjunto, os neurônios lesionados também são capazes de liberar diferentes mediadores que induzem ativação e recrutamento de leucócitos, contribuindo com o estabelecimento e manutenção da resposta inflamatória, a qual tem início no local da lesão, mas se estende para os corpos celulares dos neurônios lesionados, localizados no gânglio da raiz dorsal, em seguida para a medula espinal e por fim para regiões supra- espinais (White, Bhangoo, *et al.*, 2005; White, Sun, *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2014). Nesse sentido, o estudo de mediadores/subtipos celulares que modulam a resposta inflamatória após lesão do SNC ou de nervos periféricos é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da dor neuropática crônica.

Dentre as células do sistema imune envolvidas na via neural da dor, destacam-se os macrófagos. A lesão dos nervos periféricos leva ativação de macrófagos residentes do tecido e recrutamento de monócitos circulantes para o local, os quais dão início a resposta inflamatória e participam do processo de degeneração Walleriana (Dubový P., 2011). Assim, a resposta à lesão se estende aos gânglios da raiz dorsal, onde vários trabalhos descrevem um aumento dos marcadores de ativação de macrófagos. Ao contrário da resposta estabelecida no local da lesão, o papel dos macrófagos nos GRDs ainda permanece pouco compreendido (Kwon *et al.*, 2013; Komori *et al.*, 2011). Por fim, alguns trabalhos também sugeriam que monócitos circulantes poderiam infiltrar na medula espinal após a indução da neuropatia periférica, no entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que esse tipo de lesão neuronal não seria capaz de induzir o recrutamento dessas células para o SNC (Zhang *et al.*, 2007; Tashima *et al.*, 2016). Assim, sabendo-se que os macrófagos desempenham um papel crucial em diversos processos inflamatórios (Zhang e Mosser, 2008), como no local da lesão neuronal, onde já está bem caracterizado, buscamos investigar neste estudo: se de fato a indução da neuropatia induz infiltrado de macrófagos/monócitos circulantes no GRD e medula espinal, bem como a caracterização fenotípica e funcional dessas células nos tecidos associados com a via neural da dor.

Demonstramos, inicialmente, que a indução da neuropatia pelo modelo de SNI induz ativação microglial independente do infiltrado de monócitos, ou seja, embora não haja infiltrado de células CCR2⁺ ou aumento da população CD45^{hi} na medula espinal após a lesão periférica, há um aumento expressivo dos marcadores de ativação de micróglia e da população CD45^{int}. Esse dado vai de encontro com os achados da literatura, que demonstram que a micróglia e os monócitos são ontogeneticamente distintos: a micróglia deriva de progenitores do saco vitelínico durante a embriogênese, enquanto os monócitos se diferenciam continuamente na vida pós-natal a partir de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea dependente do fator

de transcrição Myb (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012). Os precursores microgliais não dependem do fator de transcrição Myb e assim, a micróglia tem a capacidade de se auto-renovar independente de células mielóides (Gomez *et al.*, 2013).

Esse dado inicial, apesar de divergente daqueles anteriormente descritos na literatura, corroboram com os publicados em estudos recentes, que postulam que a lesão de nervos periféricos, por si só, não é capaz de induzir quebra efetiva e duradoura da barreira hematoencefálica e, portanto, não permite que ocorra o infiltrado de leucócitos na medula espinal (Gu *et al.*, 2016; Kobayashi *et al.*, 2016). Além disso, muitos dos trabalhos anteriores que demonstraram infiltrado de células mielóides na medula espinal após a indução da neuropatia se basearam no uso de animais quimera e para isso os animais foram previamente irradiados. Sabe-se, entretanto, que a irradiação é extremamente tóxica para o organismo, podendo induzir a produção de mediadores inflamatórios e alterações na BHE (Kaya *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2003; Kierdorf *et al.*, 2013; Mildner *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2006; Larochelle et al., 2016). Consistente com esses estudos, observamos que ao irradiarmos os animais com diferentes intensidades de radiação (7 Gy e 10 Gy), para geração de camundongos quimera, há um infiltrado de células mielóides na medula espinal. Esse resultado nos mostra que, de fato, o recrutamento de células mielóides para a medula espinal após neuropatia, como foi relatado em trabalhos anteriores, pode ser um artefato experimental. Esse artefato possivelmente resulta da irradiação que pode causar aumento da permeabilidade da BHE e da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, enquanto que a indução neuropatia periférica pelo modelo de SNI não é capaz, por si só, de induzir tal infiltrado. Como uma alternativa para geração de camundongos quimera, nós realizamos a parabiose entre animais *wild type* e GFP+ e observamos que, ao contrário da irradiação, não houve infiltrado de células mielóides na medula espinal. Esse dado corrobora com outros trabalhos da literatura, sugerindo que a parabiose possa ser a técnica mais adequada/refinada para avaliar modificações associadas a

migração e infiltrado celular (Ajami *et al.*, 2007; Tashima *et al.*, 2016). Assim, diante desses dados e dos diversos trabalhos já publicados na literatura, não há dúvidas de que a microgliose induzida após SNI é consequência da expansão e ativação da micróglia residente e portanto, não depende do infiltrado de monócitos.

Diferente dos diversos trabalhos sobre a medula espinal, o gânglio da raiz dorsal é um tecido ainda pouco explorado no que se refere ao perfil de macrófagos/monócitos que possam ser recrutados e/ou ativados no tecido após a lesão de nervos periféricos. Estudos demonstram que a indução da neuropatia periférica pode levar ao aumento da expressão de marcadores de ativação de macrófagos no GRD e aumento de mediadores inflamatórios, no entanto, a caracterização fenotípica e funcional dessas células, bem como sua origem, ainda é pouco conhecido (Zhang *et al.*, 2016; Kwon *et al.*, 2013; Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2014). Nossos dados iniciais com GRD, são consistentes com os da literatura, nós também observamos um aumento da expressão de marcadores como IBA-1 e de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , após a indução do SNI. Já está claramente demonstrado que esses mediadores inflamatórios possuem papel essencial no desenvolvimento da dor neuropática, no entanto, a fonte exata desses mediadores ainda não está finamente demonstrada. Para isso, realizamos o sorting das células CD11b+Ly6G- e observamos, como esperado, que essas são as principais células responsáveis pela produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , comparado as células CD45⁺ (neurônio e células satélites) no GRD. Assim, podemos dizer que os macrófagos presentes nos GRDs, quando ativados, são fonte de citocinas pró-inflamatórias, mediadores esses sabidamente importantes no desenvolvimento e manutenção do processo neuropático. (Austin e Moalem-Taylor, 2010; Kwon *et al.*, 2013; Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2014).

Diante da existência de diferentes perfis fenotípicos e funcionais dos macrófagos, nós finalmente caracterizamos essas células presentes no GRD. A princípio, utilizando a técnica de RT-qPCR observamos um aumento expressivo dos marcadores de células CX3CR1 e CCR2.

Embora haja um aumento substancial na expressão de CCR2 por RT-qPCR, nós não encontramos quantidades elevadas de células que expressam esse receptor no GRD por citometria de fluxo e imunofluorescência. Ainda não conseguimos esclarecer essa diferença, mas sabemos que existem diversos mecanismos pós-transcricionais que podem fazer com que a proteína não seja expressa. Adicionalmente, pode ser possível que essa pequena quantidade de célula que infiltra no tecido expresse grandes quantidades do receptor e por isso vejamos um aumento tão expressivo por RT-qPCR. Vale ressaltar que o uso do linfonodo como controle positivo na realização da imunofluorescência para a marcação de células CCR2+, descarta a possibilidade de ser um problema gerado na execução da técnica. Por outro lado, observamos um aumento significativo de CX3CR1 ao utilizamos outras técnicas, corroborando com o dado do RT-qPCR.

Uma vez identificado dois subtipos de monócitos/macrófagos no GRD fomos investigar o papel dessas células no tecido durante a neuropatia periférica. Para avaliar o papel das células CX3CR1+, nós realizamos um *sorting* dessa população celular e observamos que esses monócitos/macrófagos são os principais responsáveis pela produção dos mediadores anti- e pró-inflamatórios no GRD após SNI.

Em relação as células CCR2, nossos dados demonstram que a ausência desse subtipo celular pode prejudicar o aumento clássico da expressão de mediadores inflamatórios, como de IL-1 β e TNF- α , no GRD após neuropatia periférica, sugerindo que as células CCR2 sejam importantes para a produção desses mediadores no gânglio sensitivo. Esse dado, junto ao aumento ínfimo de CCR2 observado no GRD após SNI, nos sugere que as células CCR2+ possam ter um papel mais relevante no sítio da lesão e assim, a exacerbação da inflamação local pode interferir indiretamente, na ativação das células presentes nos GRDs, bem como na produção dos mediadores inflamatórios no tecido. Entretanto, mais experimentos serão

necessários para confirmar esse papel local das células CCR2+ que se reflete no GRD, após a indução da neuropatia.

Diante desses resultados e dos relatos da literatura, não há dúvidas de que a indução da neuropatia periférica é capaz de gerar um aumento de moléculas relacionadas à ativação de macrófagos no GRD, entretanto, isso não significa necessariamente que há infiltrado ou proliferação dessas células no local. Assim, afim de esclarecer se de fato o aumento dos marcadores de ativação de macrófagos está associado com infiltrado/recrutamento ou proliferação dessas células no GRD, inicialmente realizamos a parabiose de animais *wild type* e GFP+ e observamos que embora haja um aumento de células GFP+ no GRD de animais neuropáticos, essas células não IBA-1+. Isso nos mostra que diferente do que se afirmar na literatura, a indução da neuropatia pelo modelo de SNI não é capaz induzir infiltrado de células mielóides no GRD, sugerindo que o aumento da ativação dos marcadores de macrófagos sejam de células residentes. Esse dado foi reforçado com a realização da parabiose entre animais *wild type* e CX3CR1^{GFP/+}CCR2^{RFP/+}, onde não observamos nenhum tipo de infiltrado celular após a indução a neuropatia. Com estes dados, podemos inferir que a lesão nervosa periférica não é capaz de induzir um aumento substancial de células mielóides no GRD e assim, o aumento dos marcadores de ativação de macrófagos observado após a neuropatia pode estar associado com a proliferação/ativação de macrófagos residentes, possivelmente as células CX3CR1+.

6. CONCLUSÃO

Durante a lesão de nervos periféricos, a ativação microglial ocorre de maneira independente do infiltrado de células mielóides. Já no GRD, há um aumento da expressão de marcadores de ativação de monócitos/macrófagos, que caracterizam duas subpopulações distintas: as células CX3CR1+, possivelmente residentes no tecido e as principais responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios no GRD e as células CCR2+, que parecem contribuir de maneira parcial nesse processo, tendo um papel mais efetivo no local da lesão.

REFERÊNCIAS

ABBADIE, Catherine et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 7947-7952, 2003.

AJAMI, Bahareh et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 1538, 2007.

ARTHUR-FARRAJ, Peter J. et al. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. **Neuron**, v. 75, n. 4, p. 633-647, 2012.

ATTAL, Nadine et al. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. **European journal of neurology**, v. 13, n. 11, p. 1153-1169, 2006.

AUFFRAY, Cedric et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 666-670, 2007.

AUFFRAY, Cedric; SIEWEKE, Michael H.; GEISSMANN, Frederic. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 669-692, 2009

AUSTIN, Paul J.; MOALEM-TAYLOR, Gila. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **Journal of neuroimmunology**, v. 229, n. 1, p. 26-50, 2010.

BARON, R.; BINDER, A. How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept. **Der Orthopade**, v. 33, n. 5, p. 568-575, 2004.

BASBAUM, Allan I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BÉGIN-LAVALLÉE, Valérie et al. Functional inhibition of chemokine receptor CCR2 by dicer-substrate-siRNA prevents pain development. **Molecular pain**, v. 12, p. 1744806916653969, 2016.

BERGER, Julie V. et al. Enhanced neuroinflammation and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury in rats expressing mutated superoxide dismutase 1. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 33, 2011.

BEVAN, Mark D.; WILSON, Charles J. Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 17, p. 7617-7628, 1999.

BOUHASSIRA, Didier et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-387, 2008.

CALVO, Margarita; DAWES, John M.; BENNETT, David LH. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **The lancet neurology**, v. 11, n. 7, p. 629-642, 2012.

CAMPBELL, James N.; MEYER, Richard A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 77-92, 2006.

CARLIN, Leo M. et al. Nr4a1-dependent Ly6C low monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. **Cell**, v. 153, n. 2, p. 362-375, 2013.

CHAPMAN, Gayle A. et al. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. **Journal of neuroscience**, v. 20, n. 15, p. RC87-RC87, 2000.

CHEN, Gang et al. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. **Brain**, v. 137, n. 8, p. 2193-2209, 2014.

CHRISTIE, Kimberly et al. Intraganglionic interactions between satellite cells and adult sensory neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 67, p. 1-12, 2015.

CHU, Hannah X. et al. Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 34, n. 9, p. 1425-1429, 2014.

CLARK, Anna K. et al. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10655-10660, 2007.

CLARK, Anna K.; MALCANGIO, Marzia. Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 121, 2014.

CLARK, Anna K.; MALCANGIO, Marzia. Microglial signalling mechanisms: Cathepsin S and Fractalkine. **Experimental neurology**, v. 234, n. 2, p. 283-292, 2012.

COHEN, Steven P.; MAO, Jianren. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Bmj**, v. 348, n. f7656, p. 1-12, 2014.

COLLOCA, Luana et al. Neuropathic pain. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, p. 17002, 2017.

COPRAY, J. C. V. M. et al. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. **Journal of neuroimmunology**, v. 118, n. 2, p. 203-211, 2001.

COSTIGAN, Michael et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. **BMC neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 16, 2002.

COSTIGAN, Michael; SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 1-32, 2009.

CUNHA, F. Q.; TEIXERA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems—cyclic AMP and cyclic GMP—on inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 671-678, 1999.

DANSEREAU, Marc-André et al. Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats. **Journal of neurochemistry**, v. 106, n. 2, p. 757-769, 2008.

DAY, Yuan-Ji et al. Lack of interleukin-17 leads to a modulated micro-environment and amelioration of mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. **PAIN®**, v. 155, n. 7, p. 1293-1302, 2014.

DE VLOO, Philippe et al. Animal models for central poststroke pain: a critical comprehensive review. **Pain**, v. 158, n. 1, p. 17-29, 2017.

DUBOVÝ, Petr. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 193, n. 4, p. 267-275, 2011.

ENGLAND, J. D. et al. Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. **Neurology**, v. 47, n. 1, p. 272-276, 1996.

ESPER, Raymond M.; LOEB, Jeffrey A. Rapid axoglial signaling mediated by neuregulin and neurotrophic factors. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 27, p. 6218-6227, 2004.

FELTS, Paul A. et al. Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. **Brain**, v. 128, n. 7, p. 1649-1666, 2005.

FERREIRA, S. H. et al. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 13, p. S220-2, 1989.

GAO, Yong-Jing; JI, Ru-Rong. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 482-493, 2010.

GATTLEN, Christophe et al. Spinal cord T-cell infiltration in the rat spared nerve injury model: a time course study. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 352, 2016.

GAUDET, Andrew D.; POPOVICH, Phillip G.; RAMER, Matt S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 110, 2011.

GEISSMANN, Frederic; JUNG, Steffen; LITTMAN, Dan R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, 2003.

GINHOUX, Florent et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841-845, 2010.

GOLDMANN, Tobias et al. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. **Nature immunology**, v. 17, n. 7, p. 797, 2016.

GOMEZ PERDIGUERO, Elisa; SCHULZ, Christian; GEISSMANN, Frederic. Development and homeostasis of “resident” myeloid cells: the case of the microglia. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 112-120, 2013.

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

GU, Nan et al. Spinal microgliosis due to resident microglial proliferation is required for pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. **Cell reports**, v. 16, n. 3, p. 605-614, 2016.

GWAK, Young S. et al. Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. **Experimental neurology**, v. 234, n. 2, p. 362-372, 2012.

HANANI, M. et al. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. **Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 279-283, 2002.

HETTINGER, Jan et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. **Nature immunology**, v. 14, n. 8, p. 821, 2013.

HONORE, Prisca et al. Interleukin-1 α gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. **Behavioural brain research**, v. 167, n. 2, p. 355-364, 2006.

HU, P.; MCLACHLAN, E. M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 23-38, 2002.

HU, Ping; MCLACHLAN, Elspeth M. Distinct functional types of macrophage in dorsal root ganglia and spinal nerves proximal to sciatic and spinal nerve transections in the rat. **Experimental neurology**, v. 184, n. 2, p. 590-605, 2003.

HUNDHAUSEN, Christian et al. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 8064-8072, 2007.

HUNDHAUSEN, Christian et al. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1186-1195, 2003.

HWANG, So-Young et al. Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. **Neurobiology of disease**, v. 21, n. 3, p. 457-467, 2006.

ISAMI, Kouichi et al. Involvement of TRPM2 in peripheral nerve injury-induced infiltration of peripheral immune cells into the spinal cord in mouse neuropathic pain model. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e66410, 2013.

JASMIN, Luc et al. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 63-71, 2010.

JEON, Young Hoon. Herpes zoster and postherpetic neuralgia: practical consideration for prevention and treatment. **The Korean journal of pain**, v. 28, n. 3, p. 177-184, 2015.

Jl, Ru-Rong; XU, Zhen-Zhong; GAO, Yong-Jing. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 7, p. 533, 2014.

Ji, Ru-Rong et al. Matrix metalloprotease regulation of neuropathic pain. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 7, p. 336-340, 2009.

Ji, Ru-Rong; BERTA, Temugin; NEDERGAARD, Maiken. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? **Pain®**, v. 154, p. S10-S28, 2013.

Ji, Ru-Rong; CHAMESSIAN, Alexander; ZHANG, Yu-Qiu. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016

Ji, Ru-Rong; XU, Zhen-Zhong; GAO, Yong-Jing. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 7, p. 533-548, 2014.

Ji, Xi-Tuan et al. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60733, 2013.

JIN, Shan-Xue et al. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 4017-4022, 2003.

JIN, Xiaochun; GEREAU, Robert W. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 246-255, 2006.

JOHANNES, Catherine B. et al. The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 11, p. 1230-1239, 2010.

JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JUNG, Hosung et al. Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 104, n. 1, p. 254-263, 2008.

KALLENBORN-GERHARDT, Wiebke et al. Nox2-dependent signaling between macrophages and sensory neurons contributes to neuropathic pain hypersensitivity. **PAIN®**, v. 155, n. 10, p. 2161-2170, 2014.

KAYA, Mehmet et al. Effects of lipopolysaccharide on the radiation-induced changes in the blood–brain barrier and the astrocytes. **Brain research**, v. 1019, n. 1-2, p. 105-112, 2004.

KIERDORF, Katrin et al. Bone marrow cell recruitment to the brain in the absence of irradiation or parabiosis bias. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58544, 2013.

KIM, Cristina Fabiola; MOALEM-TAYLOR, Gila. Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice. **Brain research**, v. 1405, p. 95-108, 2011.

KIM, Donghoon et al. Toll-like receptor 2 contributes to chemokine gene expression and macrophage infiltration in the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. **Molecular pain**, v. 7, n. 1, p. 74, 2011.

KOBAYASHI, Masaaki et al. TREM2/DAP12 signal elicits proinflammatory response in microglia and exacerbates neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 43, p. 11138-11150, 2016.

KOMORI, Tadasuke et al. Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. **Neuroreport**, v. 22, n. 17, p. 911-917, 2011.

KWON, Min Jung et al. Contribution of macrophages to enhanced regenerative capacity of dorsal root ganglia sensory neurons by conditioning injury. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 38, p. 15095-15108, 2013.

LAROCHELLE, Antoine et al. Bone marrow-derived macrophages and the CNS: An update on the use of experimental chimeric mouse models and bone marrow transplantation in neurological disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 3, p. 310-322, 2016.

LATREMOLIERE, Alban; WOOLF, Clifford J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

LEES, Justin G.; DUFFY, Samuel Shaw; MOALEM-TAYLOR, Gila. Immunotherapy targeting cytokines in neuropathic pain. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 142, 2013.

LI, Zhilin et al. Spinal versus brain microglial and macrophage activation traits determine the differential neuroinflammatory responses and analgesic effect of minocycline in chronic neuropathic pain. **Brain, behavior, and immunity**, v. 58, p. 107-117, 2016.

LINDENLAUB, Thies; SOMMER, Claudia. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. **Acta neuropathologica**, v. 105, n. 6, p. 593-602, 2003.

LIU, Tao; VAN ROOIJEN, Nico; TRACEY, David J. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 25-32, 2000.

LOESER, John D.; TREEDE, Rolf-Detlef. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology☆. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LUO, Xin et al. Crosstalk between astrocytic CXCL12 and microglial CXCR4 contributes to the development of neuropathic pain. **Molecular pain**, v. 12, p. 1744806916636385, 2016.

MACHELSKA, Halina. Dual peripheral actions of immune cells in neuropathic pain. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 59, n. 1, p. 11-24, 2011.

MALIN, Sacha A. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 33, p. 8588-8599, 2006.

MARTINEZ, Valeria; PICHARD, Xavier; FLETCHER, Dominique. Perioperative pregabalin administration does not prevent chronic postoperative pain: systematic review with a meta-analysis of randomized trials. **Pain**, v. 158, n. 5, p. 775-783, 2017.

MCMAHON, Stephen B.; CAFFERTY, William BJ; MARCHAND, Fabien. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental neurology**, v. 192, n. 2, p. 444-462, 2005.

MEISNER, Joshua K.; SONG, Ji; PRICE, Richard J. Arteriolar and venular remodeling are differentially regulated by bone marrow-derived cell-specific CX3CR1 and CCR2 expression. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e46312, 2012.

MENETSKI, J. et al. Mice overexpressing chemokine ligand 2 (CCL2) in astrocytes display enhanced nociceptive responses. **Neuroscience**, v. 149, n. 3, p. 706-714, 2007.

MIKA, Joanna et al. Importance of glial activation in neuropathic pain. **European journal of pharmacology**, v. 716, n. 1-3, p. 106-119, 2013.

MIKA, Joanna et al. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. **European journal of pharmacology**, v. 623, n. 1-3, p. 65-72, 2009.

MILDNER, Alexander et al. Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 31, p. 11159-11171, 2011.

MOALEM, G.; XU, K.; YU, L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 3, p. 767-777, 2004.

MORIN, Nicole et al. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Journal of neuroimmunology**, v. 184, n. 1, p. 164-171, 2007.

MOULIN, D. E. et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. **Pain Research and Management**, v. 19, n. 6, p. 328-335, 2014.

MUELLER, Marcus et al. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. **The American journal of pathology**, v. 159, n. 6, p. 2187-2197, 2001.

NICODEMUS, Juliet M. et al. Murine model and mechanisms of treatment-induced painful diabetic neuropathy. **Neuroscience**, v. 354, p. 136-145, 2017.

NICOL, Grant D.; LOPSHIRE, John C.; PAFFORD, Carl M. Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 975-982, 1997.

PARILLAUD, Vincent R. et al. Analysis of monocyte infiltration in MPTP mice reveals that microglial CX3CR1 protects against neurotoxic over-induction of monocyte-attracting CCL2 by astrocytes. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 60, 2017.

PENG, Jiyun et al. Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. **Nature communications**, v. 7, p. 12029, 2016.

PERDIGUERO, Elisa Gomez et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 547, 2015.

PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 745-757, 2000.

PRINZ, Marco; PRILLER, Josef. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 300, 2014.

QI, Jia et al. Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6417-6426, 2011.

RAMER, Matt S.; FRENCH, Gavin D.; BISBY, Mark A. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. **Pain**, v. 72, n. 1-2, p. 71-78, 1997.

SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. Can we conquer pain? **Nature neuroscience**, v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SCHULZ, Christian et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. **Science**, v. 336, n. 6077, p. 86-90, 2012.

SERBINA, Natalya V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 421-452, 2008.

SHIELDS, Shannon D.; ECKERT, William A.; BASBAUM, Allan I. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. **The Journal of Pain**, v. 4, n. 8, p. 465-470, 2003.

SOMMER, Claudia; KRESS, Michaela. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience letters**, v. 361, n. 1, p. 184-187, 2004.

SOUZA, Juliana Barcellos de et al. Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. **Pain Research and Management**, v. 2017, 2017.

STANILAND, Amelia A. et al. Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. **Journal of neurochemistry**, v. 114, n. 4, p. 1143-1157, 2010.

STEIN, Christoph; MACHELSKA, Halina. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 4, p. 860-881, 2011.

STROMNES, Ingunn M.; GOVERMAN, Joan M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature protocols**, v. 1, n. 4, p. 1810, 2006.

SWEITZER, S. M. et al. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 β expression that correlates with pain behavior in the rat. **Brain research**, v. 829, n. 1-2, p. 209-221, 1999.

SWIRSKI, Filip K. The spatial and developmental relationships in the macrophage family. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 7, p. 1517-1522, 2011.

TANAKA, Takahiro et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. **Neuroscience research**, v. 48, n. 4, p. 463-469, 2004.

TASHIMA, Ryoichi et al. Bone marrow-derived cells in the population of spinal microglia after peripheral nerve injury. **Scientific reports**, v. 6, p. 23701, 2016.

THAKUR, Krishan K. et al. Therapeutic implications of toll-like receptors in peripheral neuropathic pain. **Pharmacological research**, v. 115, p. 224-232, 2017.

THOMAS, Graham et al. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature Significance. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 35, n. 6, p. 1306-1316, 2015

TON, Bich-Hoai Thi et al. Activation profile of dorsal root ganglia Iba-1 (+) macrophages varies with the type of lesion in rats. **Acta histochemica**, v. 115, n. 8, p. 840-850, 2013.

VEGA-AVELAIRA, David; GÉRANTON, Sandrine M.; FITZGERALD, Maria. Differential regulation of immune responses and macrophage/neuron interactions in the dorsal root ganglion in young and adult rats following nerve injury. **Molecular pain**, v. 5, n. 1, p. 70, 2009.

VERGE, Gail M. et al. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 1150-1160, 2004.

VICUÑA, Lucas et al. The serine protease inhibitor SerpinA3N attenuates neuropathic pain by inhibiting T cell-derived leukocyte elastase. **Nature medicine**, v. 21, n. 5, p. 518, 2015

WALKER, Katharine; PERKINS, Martin; DRAY, Andy. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry international**, v. 26, n. 1, p. 1-16, 1995.

WATKINS, Linda R.; MAIER, Steven F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological reviews**, v. 82, n. 4, p. 981-1011, 2002.

WHITE, Fletcher A.; BHANGOO, Sonia K.; MILLER, Richard J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 834, 2005.

WHITE, Fletcher A. et al. Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 14092-14097, 2005.

WIESELER-FRANK, Julie; MAIER, Steven F.; WATKINS, Linda R. Glial activation and pathological pain. **Neurochemistry international**, v. 45, n. 2, p. 389-395, 2004.

WOOLF, Clifford J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life sciences**, v. 74, n. 21, p. 2605-2610, 2004.

WOOLF, Clifford J.; MANNION, Richard J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **The lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, 1999.

YAMASAKI, Ryo et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem. 20132477, 2014.

YAN, Yun-yi et al. Research progress of mechanisms and drug therapy for neuropathic pain. **Life sciences**, 2017.

YAO, Yao et al. Dynamics of spinal microglia repopulation following an acute depletion. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

YDENS, Elke et al. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 176, 2012.

YUAN, Hong et al. Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. **Brain research**, v. 969, n. 1-2, p. 59-69, 2003.

ZEINALI, Hossein et al. Age-related differences in neuropathic pain behavior and spinal microglial activity after L5 spinal nerve ligation in male rats. **Basic and clinical neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 203, 2016.

ZELENIKA, Marek; SCHÄFERS, Maria; SOMMER, Claudia. Intraneural injection of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 257-263, 2005.

ZHANG, Hongmei et al. Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 7, p. 775-786, 2016.

ZHANG, Ji et al. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 45, p. 12396-12406, 2007.

ZHANG, Ji; KONINCK, Yves. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. **Journal of neurochemistry**, v. 97, n. 3, p. 772-783, 2006

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **The Journal of pathology**, v. 214, n. 2, p. 161-178, 2008.

ZHOU, Li-Jun et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat. **Brain, behavior, and immunity**, v. 25, n. 2, p. 322-334, 2011.

ZHU, Xiang et al. Contribution of chemokine CCL2/CCR2 signaling in the dorsal root ganglion and spinal cord to the maintenance of neuropathic pain in a rat model of lumbar disc herniation. **The Journal of Pain**, v. 15, n. 5, p. 516-526, 2014.

ZHUANG, Zhi-Ye et al. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 5, p. 642-651, 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, Loems; HOFER, Thomas PJ. Toward a refined definition of monocyte subsets. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 23, 2013.

ZIMMERMANN, Manfred. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZUO, Yunxia et al. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain**, v. 105, n. 3, p. 467-479, 2003.

ANEXO

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Papel das células mielóides na gênese da dor neuropática*", registrado com o número **002/2017**, 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, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 20 de fevereiro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 170 camundongos C57BL/6 machos pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 30 camundongos transgênicos machos CCR-2 KO pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 35 camundongos transgênicos machos CX3CR1GFP+/CCR2RFP/+ pesando 20g oriundos do Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 15 camundongos transgênicos machos GFP+ pesando 20g oriundos do Biotério do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 20/02/2017 a 30/03/2018.

We certify that the Protocol n° 002/2017, entitled "*Role of myeloid cells in the genesis of neuropathic pain*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/20/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 170 male C57BL/6 mice weighing 20g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; 30 male CCR-2 KO mice weighing 20g from the Special Mice Breeding Center of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; 35 male CX3CR1GFP+/CCR2RFP/+ mice weighing 20g from the Biotherm of the Department of Clinical Medicine of the Medical School of Ribeirão Preto of the University of São Paulo and 15 male GFP+ mice weighing 20g from the Biotherm of the Immunology Department of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo. This certificate is valid until 03/30/2018.

Ribeirão Preto, 20 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP