

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

ATLANTE SILVA MENDES

**Papel da CCL2/MCP-1 produzida pelos neurônios sensoriais  
periféricos no desenvolvimento da dor neuropática**

RIBEIRÃO PRETO

2023

ATLANTE SILVA MENDES

**Papel da CCL2/MCP-1 produzida pelos neurônios sensoriais  
periféricos no desenvolvimento da dor neuropática**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de Concentração:** Farmacologia

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

RIBEIRÃO PRETO

2023



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autor:** Atlante Silva Mendes

**Título:** Papel da CCL2/MCP-1 produzida pelos neurônios sensoriais periféricos no desenvolvimento da dor neuropática

Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de Concentração:** Farmacologia

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

### BANCA EXAMINADORA

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

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

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

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

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

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

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINAS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Mendes, Atlante Silva

Papel da CCL2/MCP-1 produzida pelos neurônios sensoriais periféricos no desenvolvimento da dor neuropática / Atlante Silva Mendes; Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha. – Ribeirão Preto, 2023.

86 folhas.

Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Área de concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Dor neuropática, 2. Lesão neuronal periférica, 3. CCL2, 4. CCR2, 5. Meninges

*À minha família.  
À de sangue. Às de vida.*

## AGRADECIMENTOS

*À minha família pelo apoio, pelo reconhecimento, pela luta, pelo carinho, pela história de cada um de vocês. Percorremos muitos vales e montanhas ao longo desses 4 anos. A distância como sempre é um dos grandes empecilhos que dificultam a maior frequência dos nossos encontros. Absolutamente TUDO que tenho devo a vocês. Mãe, Pai, Aylla e Aylana e Madrinha obrigado por existirem!*

*À um dos meus melhores amigos, Mouzarllem Barros dos Reis. Como dizem por aí, durou 7 anos, já é amigo pra o resto da vida. Agradeço por você sempre ter me ajudado a construir os alicerces da minha personalidade desde o início. Cara, fazer essa retrospectiva de 4 anos ouvindo mantras traz lembranças de autoconhecimento imprescindíveis que dividi com você, seja na terapia de varanda com café ou nos rituais de ayahuasca. Espero que continue sempre ao meu lado. Eu certamente pretendo estar ao seu.*

*À um grupo de amigos que me estenderam a mão e me salvaram de mim mesmo quando eu estive em um dos meus piores momentos da vida. Gláucia Pereira, Beatriz Adjafre, Elidianne Anibal, Timna Varela, Isadora Paiva,IVALDO Belém e Samara Damasceno. Vocês representam aquela luz no fim do túnel para os desenganados. A vida de cientista nos leva para os mais diferentes cantos do mundo. Apesar disso, sempre serei eternamente grato a vocês.*

*Ao meu amigo Gabriel Victor, particularmente, agradeço pela amizade, pela paciência, pela ajuda, pela dedicação, pelo tempo. Sempre estarei disponível quando precisar de mim.*

*Aos amigos e colegas do CRID, agradeço pela oportunidade de crescimento e aprendizado. Pelas conversas de intervalo de experimento. Pelo compartilhamento das nossas vidas e do nosso tempo. Sempre é de grande valia para mim. Com vocês puder ser feliz mesmo nos momentos de dificuldade, pude aprender a tentar ser organizado (tô quase lá). Agradeço pelo carinho, momentos de confraternização... é com vocês que divido meus dias, logo são vocês que conhecem minhas diferentes*

*facetas. À Juliana, à Marcella, ao Paulo, ao Bruno, ao Eduardo, ao Cícero, à Rafaela Mano, ao Vitor, ao William, à Larissa, à Andressa, ao Isaac, à Kátia, à Diva, ao Alexandre, à Ieda, ao Felipe, ao Giovanni, à Bruna, ao Marcos, à Maria Cláudia, à Carol, ao Fábio. Muito obrigado!*

*Ao meu orientador Prof Thiago Cunha, agradeço imensamente pela oportunidade, pela paciência, pelos ensinamentos profissionais, pelo conhecimento, pelas portas inúmeras que se abriram ao longo da minha jornada como cientista. Pude conhecer laboratórios no exterior e estou encaminhando para uma nova jornada também sob sua tutela em breve. Agradeço antes de tudo, pelo apoio pessoal. Você também foi de extrema importância no meu momento de dificuldade.*

*Agradeço pela contribuição dos diferentes colaboradores, que tornaram possível a execução das mais diferentes etapas do projeto, Beatriz Adjafre, Elidianne Anibal Gabriel Victor, William, Alexandre, Rafaela Mano, Prof. José Carlos, Prof. Fernando Cunha. Também gostaria de agradecer à Secretaria do Programa de Farmacologia por toda a ajuda durante os momentos difíceis, pelo companheirismo e conselhos. Gislaine e Ramon, meu muito obrigado!*

*À toda a grande turma de Ribeirão Preto por tudo que passamos juntos, todos os momentos de confraternização, de tristeza, de alegria.*

*À minha maravilhosa família de Parnaíba que está presente até hoje: Paloma, Jayne, Gláucia, Lucian, Waldenrique, Ana Carolina, Lhuana, Isaac, Isis, Renan. Sempre penso em vocês todos os dias. Nesses 4 anos tive a oportunidade de acompanhar quão grandes vocês se tornaram e tive reencontros maravilhosos com alguns de vocês. O futuro nos aguarda.*

*À minha terapeuta Paula e ao meu psiquiatra Lucas pelo exemplo de profissional que vocês são. Com vocês pude me resgatar do meu profundo e ultrapassar meus limites. Sou muito grato.*

*À Casa de Cura CEU de Miguel pela oportunidade maravilhosa e revolucionária de aprender sobre mim mesmo por meio dos rituais de ayahuasca. Rosana, Fernando,*

*Luara e Renata vocês estão presentes no meu coração para sempre. Eu não consigo mais parar de ouvir mantras hahahahahhh*

*À banca pelo aceite em participar deste momento importante e ajudar na construção da minha formação. Seus ensinamentos serão de grande valia na minha vida pessoal e profissional.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através do processo n° 2018/24063-5,.*

*Ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias pelo financiamento.*

*À todas as outras pessoas não mencionadas que passaram por minha vida, meu muito obrigado. Tenham certeza que todos vocês deixaram seu pedacinho em mim.*

*Um enorme abraço.*

*“Viver é isto:  
Ficar se equilibrando,  
O tempo todo,  
Entre escolhas e consequências.”*

**Jean-Paul Sartre**

*“Tenham seu estilo próprio,  
Pois eu tenho o meu.”*

**Jacques Lacan**

MENDES, A. S. **Papel da CCL2/MCP-1 produzida pelos neurônios sensoriais periféricos no desenvolvimento da dor neuropática.** 2023. 86 f. Tese (Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O desenvolvimento da dor neuropática envolve mudanças nas características dos neurônios que sinalizam a dor, bem como ao longo de todo o neuro-eixo. A sensação de dor persistente e a inflamação são observadas em diferentes condições clínicas que levam ao desenvolvimento da dor neuropática. Neste contexto, quimiocinas e seus receptores são amplamente expressões por células não neuronais e neuronais e possuem um papel na regulação da migração de células imunes. A via de sinalização CCL2/CCR2 contribui para o desenvolvimento da dor neuropática em diversos modelos de indução de dano no sistema nervoso. Apesar disso, existem controvérsias acerca do tipo celular responsável pela produção de CCL2 no microambiente sensorial. Dessa forma, este estudo teve o objetivo de avaliar o papel da CCL2 no desenvolvimento da dor neuropática, com ênfase nos neurônios sensoriais periféricos. Foi realizada a validação do modelo de indução de lesão neuronal SNI por meio da avaliação de genes relacionadas à lesão no GRD e medula espinal, bem como a expressão de CCL2 nesses tecidos após a lesão ao longo do tempo. Validamos a participação da CCL2 na dor neuropática SNI por meio da avaliação comportamental nocifensiva de animais deficientes para a expressão de CCL2 e por meio da reanálise de sequenciamento de células únicas de GRD e meninges de camundongos e ratos saudáveis. Analisamos o papel dos neurônios sensoriais na produção de CCL2 por meio da avaliação comportamental nocifensiva de animais *Nav1.8<sup>CRE</sup>CCL2<sup>fl/fl</sup>*. Avaliamos a expressão de CCL2 em outras células do microambiente somatossensorial, tais como micróglia e macrófagos por meio da reanálise de bancos de dados de sequenciamento de células únicas em modelo de neuropatia SNI e lesão por esmagamento. O papel do receptor CCR2 foi analisado por meio da avaliação comportamental nocifensiva de animais deficientes para a expressão de CCR2. O recrutamento de leucócitos foi avaliado por microscopia confocal das meninges. O estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética (05/2019). Os resultados obtidos demonstraram que o modelo de SNI modula aumenta a expressão de diferentes genes marcadores de lesão neuronal e ativação macrofágica no GRD e de lesão da medula espinal ao longo do tempo. Ademais, o modelo de SNI é capaz de aumentar a expressão de CCL2 no GRD e na medula espinal ao longo do tempo. A deficiência de CCL2 e CCR2 diminuem a resposta mecânica e térmica ao frio, no entanto a depleção condicionada de CCL2 nos neurônios não modifica essas respostas. A análise dos diferentes bancos de dados sugere um enriquecimento da expressão de CCL2 nos macrófagos residentes do GRD, na micróglia e em macrófagos da meninge. Por fim, o modelo de SNI é capaz de levar ao recrutamento de leucócitos CCR2<sup>+</sup> para as meninges. Dessa forma, concluímos que a CCL2 parece estar sendo produzida pelos macrófagos ganglionares e contribui para o infiltrado de células CCR2<sup>+</sup> nas meninges de forma parácrina.

**Palavras-chave:** Dor neuropática, Lesão neuronal periférica, CCL2, CCR2, Meninges



MENDES, A. S. **The role of CCL2/MCP-1 produced by peripheral sensory neurons in neuropathic pain.** 2023. 86 p. Thesis (Pharmacology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2023.

Neuropathic pain involves changes in the characteristics of neurons that signal pain as well as along the entire neuro-axis. Persistent pain sensation and inflammation are shown in different clinical conditions and contribute to development of neuropathic pain. In this context, chemokines and their receptors are widely expressed by non-neuronal and neuronal cells and play a role in regulating immune cell migration. The CCL2/CCR2 pathway contributes to neuropathic pain in several models of nervous system injury. However, there are controversies regarding the cell type responsible for the release of CCL2 in the sensory microenvironment. Thus, this study aimed to evaluate the role of CCL2 in the neuropathic pain, with emphasis on peripheral sensory neurons. Validation of SNI model was performed by evaluating injury-related gene in DRG and spinal cord. CCL2 was evaluated in these tissues after injury over time. We validated the participation of CCL2 in SNI model by evaluating pain behavior in CCL2-deficient mice. CCL2 tissue expression was assessed by reanalysis of single cell sequencing databases of DRG and meninges from healthy mice and rats. We analyzed the role of sensory neurons in the production of CCL2 by conditional CCL2-depleted mice (*Nav1.8<sup>+</sup>CCL2<sup>fl/fl</sup>*). We evaluated CCL2 expression in other cell types, such as microglia and macrophages, by reanalysis of single cell sequencing databases in nerve *crush* and SNI models. The role of CCR2 was analyzed by evaluating pain behavior in CCR2-deficient mice. Leukocyte recruitment from meninges was assessed by confocal microscopy. The study was carried out with the approval of the Ethics Committee (05/2019). The results showed that there is alteration in the expression of different gene markers of neuronal injury and macrophage activation in DRG and spinal cord during SNI over time. Both CCL2 and CCR2 depletion decrease mechanical and thermal response. However, conditional depletion of CCL2 in neurons does not modify these responses. The analysis of different databases suggests an enrichment of CCL2 expression in resident macrophages from DRG, microglia and meningeal macrophages. Finally, It was shown recruitment of CCR2<sup>+</sup> leukocytes to the meninges. Thus, we conclude that CCL2 seems to be produced by ganglionic macrophages and contributes to the infiltration of CCR2<sup>+</sup> cells in the meninges.

**Key-words:** Neuropathic pain, Peripheral neuronal injury, CCL2, CCR2, meninges

## LISTA DE FIGURAS

<b>Esquema 1</b>	Classificação das quimiocinas de acordo com a estrutura.....	<b>23</b>
<b>Esquema 2</b>	Principais quimiocinas e seus receptores mostrados por subtipo de leucócito.....	<b>24</b>
<b>Figura 1</b>	Figura 1: Expressão gênica de marcadores de lesão neuronal e de ativação de macrófagos no GRD ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.....	<b>37</b>
<b>Figura 2</b>	Expressão gênica de marcadores de astrócitos (A-C) e micróglia (D) no na medula espinal ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.....	<b>38</b>
<b>Figura 3</b>	Figura 3: Análise <i>Dotplot</i> por tecidos do sistema somatossensorial em camundongos saudáveis.....	<b>39</b>
<b>Figura 4</b>	Figura 4: Expressão gênica de CCL2 em GRD e medula espinal ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.....	<b>40</b>
<b>Figura 5</b>	Avaliação comportamental nocifensiva em animais selvagens e <i>Ccl2</i> <sup>-/-</sup> de ambos os sexos após modelo de indução de lesão SNI.....	<b>42</b>
<b>Figura 6</b>	Avaliação comportamental nocifensiva em animais controle e CCL2 condicionais machos após modelo de indução de lesão SNI.....	<b>45</b>
<b>Figura 7</b>	Análise t-SNE ( <i>t-Distributed stochastic neighbor embedding</i> ) por condição experimental de GRD murino em modelo de indução de lesão por esmagamento.....	<b>48</b>
<b>Figura 8</b>	Análise densitométrica por condição experimental de GRD murino em modelo de indução de lesão por esmagamento.....	<b>50</b>
<b>Figura 9</b>	Análise t-SNE por condição experimental de GRD murino em modelo de indução de lesão por esmagamento	<b>52</b>

<b>Figura 10</b>	Análise densitométrica UMAP ( <i>Uniform manifold approximation and projection</i> ) do total de células microgliais murinas em modelo de indução de lesão SNI.....	<b>53</b>
<b>Figura 11</b>	Análise UMAP por grupo experimental de células microgliais em modelo de indução de lesão SNI.	<b>54</b>
<b>Figura 12</b>	Avaliação comportamental nocifensiva em animais selvagens e <i>Ccr2<sup>-/-</sup></i> machos após modelo de indução de lesão SNI.....	<b>55</b>
<b>Figura 13</b>	Imagem representativa por confocal da presença de células CD45 em composição de medula espinal com vértebras da região lombar (L3-L5) dos animais submetidos ao modelo de indução de lesão neuropática SNI após 14 dias.....	<b>57</b>
<b>Figura 14</b>	Imagem representativa por confocal da presença de células CX3CR1 <sup>+</sup> e CCR <sup>+</sup> em composição de medula espinal com vértebras da região lombar (L3-L5) dos animais <i>Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>Ccr2<sup>RFP/+</sup></i> submetidos ao modelo de indução de lesão neuropática SNI após 7 dias.....	<b>60</b>
<b>Figura 15</b>	Imagem representativa por confocal da presença de células positivas para CX3CR1, CCR2 e IBA1 em composição de meninge inteira da região lombar (L3-L6) dos animais submetidos ao modelo de indução de lesão neuropática SNI após 7 dias.....	<b>63</b>
<b>Figura 16</b>	Análise <i>Dotplot</i> e t-SNE das meninges em camundongos saudáveis.....	<b>67</b>
<b>Figura 17</b>	Análise densitométrica por tecido das meninges em ratos saudáveis.....	<b>68</b>
<b>Figura 18</b>	Expressão gênica de marcadores de lesão nas meninges ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.....	<b>69</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Quimiocinas, seus receptores e funções.....	<b>20</b>
<b>Tabela 2</b>	Primers.....	<b>32</b>

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	Dor Neuropática.....	16
1.2.	Interações neuroimunes na dor neuropática.....	17
1.3.	Quimiocinas e seus receptores na dor neuropática.....	18
1.4.	CCL2 na dor neuropática.....	24
2	OBJETIVO GERAL.....	27
2.1.	Objetivos específicos.....	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1.	Animais.....	28
3.2.	Modelo de Neuropatia.....	28
3.3.	Ensaio de comportamento nocifensivo.....	29
3.4.	Coleta de amostras.....	30
3.5.	Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR).....	31
3.6.	Microscopia confocal.....	33
3.7.	Imunoensaio miliplex.....	33
3.8.	Re-análises de dados de sequenciamento de célula única...	34
3.9.	Análise estatística.....	35
4.	RESULTADOS.....	36
	<b>A neuropatia causada pelo modelo de indução de lesão SNI</b>	
4.1.	<b> aumenta a expressão gênica de marcadores de ativação neuronal e glial no GRD e medula espinal.....</b>	<b>36</b>
4.2.	<b>CCL2 participa do desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.....</b>	<b>39</b>
4.3.	<b>CCL2 é expressa por diferentes tipos celulares do sistema somatossensorial, mas não em nociceptores.....</b>	<b>44</b>
4.4.	<b>CCR2 participa do desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.....</b>	<b>55</b>
4.5.	<b>Células CCR2<sup>+</sup> são recrutadas para as meninges na dor neuropática.....</b>	<b>56</b>

5.	DISCUSSÃO.....	<b>71</b>
6.	CONCLUSÃO.....	<b>77</b>
7.	REFERÊNCIAS.....	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Dor neuropática

De acordo com a IASP (*International Association for the study of Pain*) (2022), a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a um dano tecidual real ou potencial. O conceito inclui a influência de fatores biológicos, psicológicos, sociais, históricos e éticos para a percepção da dor.

Dentre os diversos tipos de dores crônicas, a neuropatia é uma condição clínica que está relacionada à lesão direta do sistema somatossensorial ou às doenças que afetam esse sistema. Geralmente, esse dano neural leva a respostas de fase aguda e crônica associadas com dor nociceptiva, inflamação e restrição funcional (COLLOCA et al. 2017). A dor neuropática é caracterizada por hiperalgesia (aumento da resposta à estímulos de natureza nociva), alodinia (dor relacionada à estímulos não-nocivos) e alterações proprioceptivas, tais como disestesia e parestesia. Esses tipos de hipersensibilidade são resistentes à maioria dos analgésicos disponíveis e afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes, gerando custos substanciais para a sociedade (CAMPBELL; MEYER, 2006; NICKEL et al., 2012).

Etiologicamente, a dor neuropática pode ser causada por doenças autoimunes, metabólicas e vasculares, infecções virais, trauma, câncer e terapias relacionadas ao câncer, que estão associadas a mecanismos de sensibilização de vias nociceptivas periféricas e centrais. Tais mecanismos contribuem para o desenvolvimento e manutenção da dor crônica e influenciam os componentes cognitivos e emocionais relacionados à dor (KIGUCHI et al., 2017).

O desenvolvimento da dor neuropática envolve mudanças nas características dos neurônios que sinalizam a dor, incluindo os neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal (GRD) e do gânglio trigeminal, bem como neurônios ao longo de todo o neuro-eixo. A neurotransmissão, os receptores e os canais iônicos destes neurônios estão alterados, resultando em hiperexcitabilidade ectópica, que é percebida como sensação espontânea de dor. Além disso, mudanças na transmissão sináptica a nível de coluna dorsal da medula espinal, em neurônios que se projetam para as lâminas I e V e em neurônios da via descendente resultam em sensibilização sináptica central

para os estímulos (LEE, 2016). Uma compreensão mais detalhada dos mecanismos celulares e moleculares que sustentam essas mudanças é essencial para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a reversão da dor neuropática.

Vale salientar que a sensação de dor persistente e a inflamação são observadas em diferentes condições clínicas associadas à dor crônica. A relação entre o início da resposta inflamatória e o desenvolvimento da dor crônica é ainda pouco estabelecida. Esta interação é claramente mediada pela ativação de inúmeros tipos celulares com competência imune, incluindo as células de Schwann, células satélites gliais no interior do GRD, macrófagos que interagem com os nervos periféricos e astrócitos e micróglia nas proximidades das projeções centrais das aferências primárias na coluna dorsal da medula espinal. De fato, a modulação da ativação destes elementos celulares previne ou limita o desenvolvimento da dor crônica (WHITE; JUNG; MILLER, 2007).

## **1.2. Interações neuroimunes na dor neuropática**

Clinicamente, a inflamação é caracterizada por 5 sinais cardinais: rubor, calor, tumor, dor e perda de função. A inflamação aguda é uma resposta protetiva envolvendo células imunes, vasos sanguíneos e mediadores moleculares, os conhecidos mediadores inflamatórios. A função da inflamação é eliminar a causa inicial da lesão celular e iniciar o processo de reparo tecidual (VARELA et al. 2018).

A dor aguda, também conhecida como dor nociceptiva, é um sinal cardinal da inflamação. A maior parte dos mediadores inflamatórios conhecidos contribui para o desenvolvimento de dor através da interação com seus receptores nos neurônios sensoriais primários nociceptivos no sistema nervoso periférico, que inervam a pele, os músculos e os tecidos conectivos (BASBAUM et al. 2009; GOLD & GEBHART, 2010). A resolução da inflamação aguda envolve mediadores especializados de pró-resolução, como resolvinas, protectinas e maresinas, derivados de ácidos graxos insaturados, bem como outros mecanismos pró-resolutivos. Essas moléculas não só apenas regulam a inflamação como inibem a dor inflamatória por meio de ações diretas no nociceptores (XU et al. 2010).

Em contraste à inflamação aguda, a inflamação crônica, como é o caso daquela presente na dor neuropática, é frequentemente prejudicial. Pesquisas no campo da dor tem estabelecido que os eventos de plasticidade neuronal e do sistema imune são



os mecanismos-chave para o desenvolvimento e manutenção da dor crônica (JI; XU; GAO, 2014). Sensibilização periférica em nociceptores é essencial para o desenvolvimento da dor crônica e a transição da dor aguda para a dor crônica (CHABAN, 2010). Sensibilização central, ou seja, respostas aumentadas da circuitaria na medula espinal e no cérebro, regulam a cronificação da dor, levando a propagação da dor para além do local da lesão e influenciando os aspectos emocionais e afetivos da dor (LATREMOLIERE & WOOLF, 2009).

Interações entre inflamação e dor são bidirecionais. Neurônios sensoriais não só respondem a sinais imunes como modulam diretamente a inflamação. Nociceptores expressam receptores citocinas e quimiocinas e também produzem mediadores inflamatórios, como Interleucina 6 (IL6). Estímulos nocivos contribuem para a liberação de neuropeptídeos tais como substância P e CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*), levando ao edema e recrutamento de células (LOWRY; MAKKER; TAYLOR, 2021; SHOUMAN & BENARROCH, 2021).

Inúmeras células não-neuronais contribuem para a sensação dolorosa, tais como células do sistema imune, gliais, epiteliais, mesenquimais, cancerosas e bacterianas. Em resposta a uma lesão, estas células liberam substâncias neuromoduladoras no microambiente dos nociceptores, as quais promovem ou atenuam a dor dependendo das identidades específicas dos mediadores envolvidos (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016).

Nesse contexto, quimiocinas e seus receptores são amplamente expressos por células não-neuronais e neuronais e possuem um papel na regulação da migração de células progenitoras, crescimento axonal e neurotransmissão. Dessa forma, mudanças induzidas por lesão ou doenças na expressão de diversas quimiocinas e seus receptores são importantes para a regulação de diversas respostas neuroinflamatórias (WHITE; JUNG; MILLER, 2007).

### **1.3. Quimiocinas e seus receptores na dor neuropática**

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas secretadas por diferentes tipos celulares, tais como células do sistema imune e células gliais, cuja função principal é controlar o padrão migratório e posicionamento de células imunes. A função das quimiocinas é crítica para todos os movimentos das células imunes, desde a migração necessária para o desenvolvimento e homeostase das células imunes, geração de

respostas imunes celulares e humorais primárias e amnésicas, até o recrutamento patológico de células imunes em doenças (ROSSI & ZLOTNIK, 2000).

Quimiocinas constituem uma ampla família de citocinas, que consiste em aproximadamente 50 ligantes quimiotáticos endógenos em humanos e camundongos (Tabela 1). Quimiocinas são moléculas pequenas (8 a 10kDa). Muitas delas compartilham a presença de resíduos de cisteína, dois dos quais se encontram na região N-terminal da molécula e são utilizados para classificar todas as quimiocinas em quatro grupos: CC, CXC, C e CX3C (Esquema 1). Os resíduos de cisteína são importantes para a tridimensionalidade das moléculas de quimiocinas (HUGHES & NIBBS, 2018).

Receptores para quimiocinas constituem o maior ramo da subfamília de  $\gamma$  de receptores de sete domínios transmembrana semelhantes à rodopsina. Os receptores de quimiocinas são expressos de forma diferente em todos os leucócitos (Esquema 2) e podem ser divididos em dois grupos: receptores de quimiocinas acoplados à proteína G, que sinalizam ativando proteínas do tipo  $G_i$  sensíveis à toxina pertussis (PTX) e receptores de quimiocinas atípicos, que parecem moldar o gradiente de quimiocinas e atenuar a inflamação eliminando-as de maneira independente de proteína G (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014).

A primeira quimiocina implicada na dor foi a CXCL8, também conhecida como Interleucina 8, a qual é secretada por macrófagos ativados e células endoteliais, e sinaliza via receptores CXCR1 e CXCR2. CXCL8 administrada via intradérmica na pata de ratos contribui para a hiperalgesia de maneira dose dependente, um efeito que é bloqueado utilizando-se anticorpos neutralizantes para CXCL8 (CUNHA et al., 1991).

Tabela 1: Quimiocinas, seus receptores e funções.

Quimiocina	Receptor	Função
<b>CXCL1</b>	CXCR2	
<b>CXCL2</b>	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
<b>CXCL3</b>	CXCR2	
<b>CXCL4</b>	CCR1 <sup>1</sup>	Pró-coagulante; Migração de monócitos humanos <sup>1</sup>
<b>CXCL5</b>	CXCR2	
<b>CXCL6</b>	CXCR1, CXCR2	Tráfego de neutrófilos
<b>CXCL7</b>	CXCR2	
<b>CXCL8</b>	CXCR1, CXCR2	
<b>CXCL9</b>	CXCR3	Tráfego de NK, Th1 e CD8 e resposta Th1
<b>CXCL10</b>	CXCR3	
<b>CXCL11</b>	CXCR3	
<b>CXCL12</b>	CXCR4	<i>Homing</i> na medula óssea
<b>CXCL13</b>	CXCR5	Posicionamento de células B e Tfh no LN
<b>CXCL14</b>	CXCR4 <sup>2</sup>	<i>Homing</i> de macrófagos na pele (humanos)
<b>CXCL15</b>	CXCR4 <sup>3</sup>	Migração de neutrófilos <sup>3</sup>
<b>CXCL16</b>	CXCR6	Sobrevida e migração de células NK e ILC
<b>CCL1</b>	CCR8	Tráfego de Th2 e Treg
<b>CCL2</b>	CCR2	Tráfego de monócitos inflamatórios
<b>CCL3</b>	CCR1, CCR5	Migração de células NK e macrófagos;

Quimiocina	Receptor	Função
CCL4	CCR5	Migração de células
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	NK e macrófagos;
CCL6	?	Migração de células NK e DCs <sup>4</sup>
CCL7	CCR2, CCR3	Mobilização de monócitos
CCL8	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 (humanos), CCR8 (camundongo),	Resposta Th2; <i>Homing</i> na pele (camundongos)
CCL9/10	CCR1 <sup>5</sup>	Função de osteoclastos <sup>5</sup>
CCL11	CCR3	Migração de eosinófilos e basófilos
CCL12	CCR2	Tráfego de monócitos inflamatórios
CCL13	CCR2, CCR3, CCR5	Resposta Th2
CCL14	CCR1	<i>Homing</i> de macrófagos na medula óssea <sup>6</sup>
CCL15	CCR1, CCR3	Migração de monócitos e células T <sup>7</sup>
CCL16	CCR1, CCR2, CCR5	Função de hepatócitos humanos <sup>8</sup>
CCL17	CCR4	Resposta Th2; Migração de células Th2, Treg e <i>homing</i> na pele e no pulmão
CCL18	CCR8	Resposta Th2; marcador AAM; <i>Homing</i> na pele
CCL19	CCR7	<i>Homing</i> de células T e DC no LN

Quimiocina	Receptor	Função
<b>CCL20</b>	CCR6	Resposta Th17; <i>Homing</i> de células B e DC em GALT
<b>CCL21</b>	CCR6, CCR7	<i>Homing</i> de células T e DC no LN
<b>CCL22</b>	CCR4	Resposta Th2; migração de Th2 e Treg
<b>CCL23</b>	CCR1 <sup>9</sup>	Migração de monócitos e células T em repouso <sup>10</sup>
<b>CCL24</b>	CCR3	Migração de basófilos e eosinófilos
<b>CCL25</b>	CCR9	<i>Homing</i> de células T para o intestino; migração de timócitos
<b>CCL26</b>	CCR3, CX3CR1	Migração de eosinófilos e basófilos
<b>CCL27</b>	CCR10	<i>Homing</i> de células T na pele
<b>CCL28</b>	CCR3, CCR10	<i>Homing</i> de células T e plasmócitos IgA nas mucosas
<b>XCL1</b>	XCR1	Apresentação cruzada para DCs CD8 <sup>+</sup>
<b>XCL2</b>	XCR1	
<b>CX3CL1</b>	CX3CR1	Migração de células T, monócitos e NK.

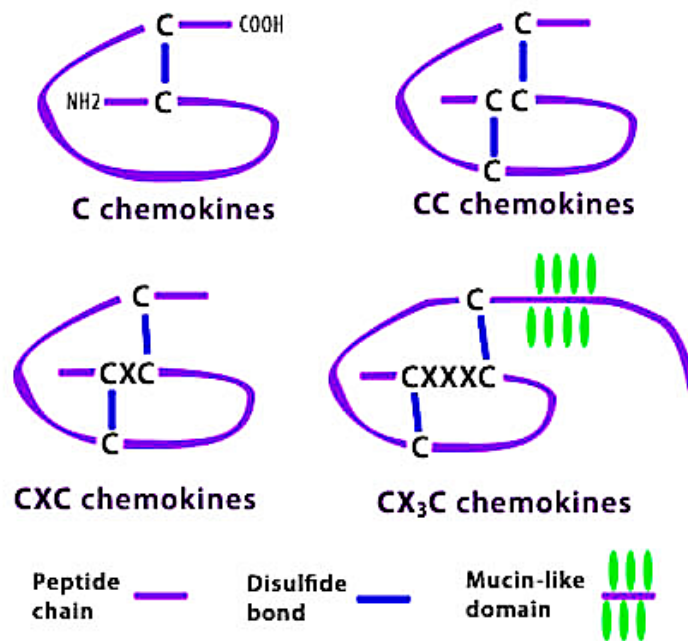
Fonte: modificado de GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014.

Legendas: AAM: *Alternatively activated macrophages*; DC: *Dendritic cells*; GALT: *Gut-associated lymphoid tissue*; IgA: *Immunoglobulin A*; ILC: *Innate*

*lymphod cells*; LN: *Lymph nodes*; NK: *Natural killer cells*; Tfh: *T follicular helper*; Th1: *T helper 1*; Th2: *T helper 2*; Treg: *Regulatory T cells*.

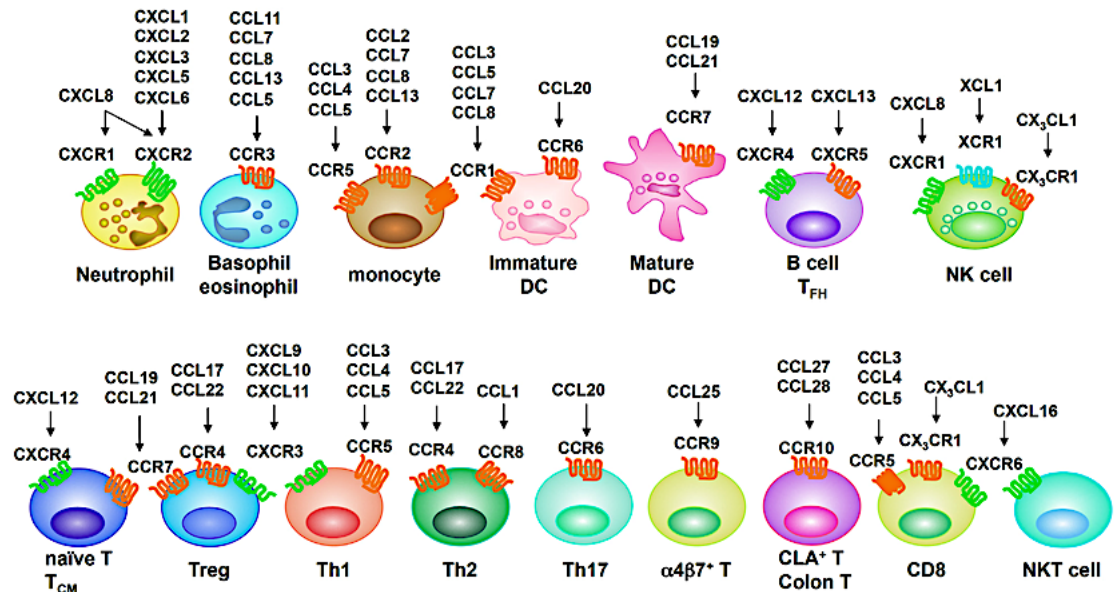
Outras fontes: <sup>1</sup>FOX et al., 2018; <sup>2</sup>TANEGASHIMA et al., 2013; <sup>3</sup>BROXMEYER; COOPER; ROPA, 2021; <sup>4</sup>COELHO et al., 2007; <sup>5</sup>LEAN et al., 2002; <sup>6</sup>LI et al., 2015; <sup>7</sup>LI; WU; ZHANG, 2016; <sup>8</sup>WEIERGRABER et al., 2022; <sup>9</sup>MENG et al., 2021; <sup>10</sup>SIMATS et al., 2018.

### Esquema 1: Classificação das quimiocinas de acordo com a estrutura



Fonte: modificado de Internet.

## Esquema 2: Principais quimiocinas e seus receptores mostrados por subtipo de leucócito



Fonte: modificado de Internet.

O envolvimento de outras quimiocinas, tais como a CX3CL1 também foi implicado na sinalização entre neurônios e micróglia, como um ativador microglial. No sistema nervoso central, CX3CL1 é altamente expressa em neurônios e age através do seu receptor CX3CR1 modulando a resposta dolorosa em modelos de neuropatia. A administração de anticorpo neutralizante para CX3CL1 reduz a resposta nociceptiva após lesão neuronal periférica, sugerindo que a liberação prolongada de CX3CR1 contribui para a manutenção da dor neuropática (MILLIGAN et al, 2004; ABBADIE, 2005).

Por fim, outra quimiocina bastante envolvida na dor neuropática é a CCL2, também conhecida como MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*). A via de sinalização CCL2/CCR2 é o foco deste trabalho e vai ser discutida com mais detalhes na próxima seção.

### 1.4. CCL2 na dor neuropática

A via de sinalização CCL2/CCR2 contribui para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática em diversos modelos de indução de dano no sistema nervoso. Zhu e colaboradores (2014) demonstraram que o aumento temporal da

expressão de CCL2/CCR2 no GRD e na medula espinal contribui para a hipersensibilidade dolorosa em modelo de dor neuropática induzida por hérnia de disco lombar. A sinalização desta via está envolvida no aumento do infiltrado inflamatório de macrófagos, na hiperexcitabilidade neuronal no GRD e na interação neuronal-astroglial na medula espinal. A utilização de antagonista para CCR-2 foi capaz de atenuar a hipersensibilidade a dor nesse contexto.

Achados semelhantes foram observados em modelo de dano neuronal crônico por constrição (THACKER et al., 2009; VAN STEENWINCKEL et al., 2011), em modelo de dor orofacial por dano trigeminal (ZHANG et al., 2012) e na hiperalgesia gástrica induzida por diabetes (AYE-MON et al., 2018), reforçando o envolvimento dessa via em diferentes contextos patológicos. Estudos com camundongos deficientes para CCR2 demonstraram que esses animais não desenvolvem alodinia mecânica em modelo de lesão periférica de nervos ou inflamação crônica induzida por adjuvante completo de Freund, sugerindo um envolvimento deste receptor nas respostas associadas ao desenvolvimento da dor neuropática (ABBADIE et al., 2003).

Ademais, Zhang e colaboradores demonstraram que existe uma sinalização mediada por CCL2/CCR2 entre neurônios mielinizados e não-mielinizados no GRD induzida pelo quimioterápico paclitaxel em ratos, e que o bloqueio dessa sinalização impede o desenvolvimento de fenótipos relacionados à dor neuropática, como hipersensibilidade (ZHANG et al., 2012). No entanto, a via sensorial e os mecanismos envolvidos na síntese e na atuação de CCL2 ainda são pouco compreendidos em modelos de dor neuropática.

Alguns trabalhos relacionam o desenvolvimento da dor neuropática e a expressão de CCL2 nos neurônios sensoriais com a ativação direta da micróglia via CCR2. A literatura apresenta evidências discordantes a respeito da expressão microglial de CCR2 em modelos de transplante de medula óssea e em camundongos parabióticos, nos quais se demonstrou que a expressão deste receptor está restrita aos monócitos/macrófagos periféricos que infiltram os tecidos nervosos durante estados patológicos. No entanto, apesar dos dados conflitantes a respeito da presença/ausência do receptor CCR2 na micróglia, a interferência com a sinalização de CCL2 pode inibir o desenvolvimento das reações microgliais relacionadas à dor (BIBER; BODDEKE, 2014). Estes achados sugerem que novas pesquisas são necessárias para o esclarecimento acerca dos mecanismos que iniciam a resposta microglial após a indução de dano neuronal periférico.



Corroborando os dados acima, Shechter e colaboradores (2013) demonstraram que o recrutamento de monócitos-macrófagos pró-inflamatórios M1 é coordenado através das leptomeninges adjacentes ao sítio da lesão e que o bloqueio de CCL2 com anticorpos diminui o recrutamento dos monócitos  $Ly6c^{High}Ccr2^{+}$  e a presença de monócitos-macrófagos  $Ly6c^{High}Cx3cr1^{low}$  em modelo de lesão mecânica da medula espinal. Esses monócitos-macrófagos liberam um grande número de fatores pró-inflamatórios e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5), levando a sensibilização periférica e hipersensibilidade.

O acúmulo de macrófagos no GRD também foi demonstrado em outros modelos experimentais de dor neuropática, incluindo aqueles que resultam em dano físico de nervos, diabetes e dano mediado por quimioterápicos (paclitaxel e vincristina). Dessa forma, a inibição-alvo ou depleção de macrófagos previne a neuroinflamação e a hipersensibilidade dolorosa nesses modelos (CONTI et al., 2002; GÓMEZ-NICOLA et al., 2008; KIGUCHI et al., 2008; MAEDA et al., 2009).

Apesar do crescente número de trabalhos envolvendo a participação da CCL2 na dor neuropática em diferentes modelos experimentais, ainda existem questões neuroimunobiológicas que precisam ser entendidas envolvendo a sinalização *upstream/downstream* da via CCL2/CCR2. A elucidação dessas questões pode contribuir com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com benefício mais eficaz para o tratamento da dor crônica.

Nesse sentido, *a hipótese formulada para este projeto é de que a quimiocina CCL2 produzida pelos neurônios sensitivos periféricos contribui para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática por influenciar o trânsito de monócitos/macrófagos para o local da lesão neuronal.*

## 2. OBJETIVO GERAL

Verificar se a CCL2 produzida pelos neurônios sensoriais periféricos pode contribuir para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.

### 2.1. Objetivos específicos

- Verificar se a lesão neuronal periférica SNI está relacionada com o aumento da expressão de CCL2 no GRD;
- Verificar se os neurônios sensoriais modulam a resposta comportamental por meio do aumento da expressão de CCL2;
- Verificar se os neurônios sensoriais recrutam células CCR2<sup>+</sup> diante do aumento da expressão de CCL2.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Todo os camundongos foram mantidos em um background C57BL/6J e camundongos de ambos os sexos foram utilizados. Os camundongos foram alojados em condições de temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas padrões, em caixas padronizadas com forragem, água e ração *ad libitum*. A circulação de ar no biotério foi filtrada e a temperatura monitorada a 20°C constantemente. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas de ética estabelecidas pela IASP (do inglês *International Association for the Study of Pain*) com a finalidade de minimizar o sofrimento animal durante todo o curso do procedimento experimental. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (05/2019).

As seguintes linhagens animais foram utilizadas: *Ccl2*<sup>-/-</sup> (B6.129S4-*Ccl2*<sup>tm1Ro/J</sup>), *Ccl2*<sup>fl/fl</sup> (B6.Cg-*Ccl2*<sup>tm1.1Pame/J</sup>), *Ccr2*<sup>-/-</sup> (B6.129S4-*Ccr2*<sup>tm1fc/J</sup>), *Ccr2*<sup>RFP/RFP</sup>, *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup>, *Nav1.8*<sup>Cre/Cre</sup> (STIRLING et al., 2005) As seguintes genotipagens por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas: para o alelo flanqueado de *Ccl2*, utilizando os primers forward 5'-AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA-3', reverse selvagem 5'-CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC-3' e reverse mutante 5'-GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC-3'; e para *Nav1.8*<sup>Cre</sup>, utilizando os primers forward 5'-CAG TGG TCA GGC TGT CAC CA-3', reverse selvagem 5'-ACA GGC CTT CAA GTC CAA CTG-3' e reverse *knock in* 5'-AAA TGT TGC TGG ATA GTT TTT ACT GCC-3'.

#### 3.2. Modelo de Neuropatia

Os animais foram previamente anestesiados com isoflurano 1,5% por via inalatória e foi induzido o modelo de lesão neuronal SNI (do inglês *Spared nerve injury*), seguindo as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP. O modelo SNI consiste na ligadura por fio de sutura não-absorvível 4mm seguida da transecção de dois ramos do nervo isquiático (peroneal e tibial), com

preservação do terceiro ramo (sural), dos camundongos, conforme descrito anteriormente. (DECOSTERD; WOOLF, 2000).

### **3.3. Ensaios de comportamento nocifensivo**

A avaliação do limiar de hipersensibilidade mecânica foi realizada utilizando-se o método manual de von Frey. Os animais foram aclimatados individualmente em caixas de acrílico durante 1 hora, cujo assoalho é constituído por uma tela de arame não maleável. Os monofilamentos de von Frey foram aplicados perpendicularmente à superfície plantar da pata traseira direita até que este se curve, levando ao desenvolvimento de uma força constante pré-determinada, por 2 a 5 segundos. A resposta foi considerada positiva, quando o animal exibiu algum comportamento nociceptivo, incluindo a retirada rápida da pata, lambidas ou sacudidas com a pata, durante a aplicação do estímulo ou imediatamente após o filamento ter sido removido. A avaliação foi realizada por meio de duas metodologias: o método de estímulo ascendente – baseado na aplicação dos monofilamentos com força crescente até que uma resposta de retirada seja observada, sendo esta força considerada como limiar de retirada mecânica – e o método de resposta percentual – baseado na repetição dos filamentos de forças variadas em número igual de vezes (10 repetições), sendo considerado o número de respostas positivas de cada filamento como um valor percentual (SORKIN; YAKSH, 2009; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

O teste de evaporação de acetona é uma técnica utilizada para mensurar comportamentos aversivos desenvolvidos por resfriamento por evaporação e é geralmente considerado como uma medida de alodinia ao frio. Os animais foram aclimatados individualmente em caixas de acrílico durante 1 hora, cujo assoalho é constituído por uma tela de arame não maleável. A acetona foi aplicada ou borrifada sobre a superfície plantar da pata traseira, provocando o resfriamento da pele a temperaturas inócuas de 15 a 21°C. A sensibilidade ao frio foi registrada pela quantificação da duração desta resposta (durante 60 segundos). (SORKIN; YAKSH, 2009; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

O teste de placa quente (EDDY; LEIMBACH, 1953) consiste em dispor o animal sobre uma placa metálica aquecida a uma temperatura constante, em um espaço delimitado por um cilindro de acrílico com altura suficiente para que o animal não consiga escapar durante o experimento. Os animais foram submetidos ao teste final

após dois treinamentos em dias prévios ao ensaio. Tanto os treinamentos quanto o teste final consistiram em colocar o animal sobre a superfície aquecida a 48°C, 52°C e 56°C e cronometrar o tempo até que ele exibisse as respostas de lambida ou pulo, com um *cut off* de 60 segundos.

O teste de performance Rotarod é um teste de desempenho baseado em uma haste rotativa com atividade motora sendo aplicada pelo camundongo. O animal foi colocado em um cilindro giratório horizontalmente orientado (haste) suspenso, que é baixo o suficiente para não ferir o animal, mas alto o suficiente para induzir aversão à queda. O período de tempo que um dado animal fica nessa haste giratória é uma medida de equilíbrio, coordenação motora, condição física e planejamento motor. Os animais foram submetidos a dois treinamentos nos dias anteriores ao teste, para fins de aclimatação ao aparelho, reduzindo a possibilidade de queda inespecífica no dia do teste final. Tanto o treinamento como o teste final consistiram em submeter os animais à caminhada no rotarod a uma velocidade de 22 rpm por 120 segundos (DUNHAM; MIYA, 1957).

### **3.4. Coleta de amostras**

Os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.). Para a realização dos experimentos de biologia molecular, os animais foram perfundidos com PBS (*phosphate-buffered saline*, pH 7,2- 7,4), em temperatura ambiente, por 2 minutos (5 mL/min). Para a realização dos experimentos de microscopia confocal, os animais foram perfundidos adicionalmente com paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,0) a 4°C por 5 minutos (5 mL/min). Em seguida, foi feita uma incisão craniocaudal no dorso do animal, seguida de abertura por planos, até a exposição das lâminas ósseas da coluna vertebral. Após laminectomia, a medula espinal lombar (L3-L6) foi exposta para coleta juntamente com os GRD ipsilaterais correspondentes. Para as preparações de meninge, foram realizados dois procedimentos: no primeiro, removemos toda a região lombar da coluna vertebral com osso, desde a vértebra L3 até a vértebra L6; no segundo, removemos as vértebras e coletamos apenas a meninge (*whole mounted*) com os GRDs correspondentes de ambos os lados, contra- e ipsilaterais, à lesão.

### 3.5. Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR)

As amostras coletadas foram acondicionadas em 500µL reagente de Trizol (Sigma) e armazenadas em freezer a -80°C. A extração do RNA total foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante do kit de extração. 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 contendo o RNA, foi transferida para outro tubo contendo 00 µL de isopropanol (Merck) gelado. Em seguida as amostras foram agitadas no vórtex e incubadas *overnight* a -20°C. No dia seguinte, 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 óptica no comprimento de onda de 260 nm, utilizando o aparelho nanoVue plus GE®.

A transcrição de RNAm para DNAc, foi feita por meio da atividade da enzima transcriptase reversa MultiScribe®, utilizando-se RNAm total (2000ng para medula espinal, 500ng para GRD e 570ng para meninges), 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-RT foi feita no aparelho stepOne Plus Real-Time PCR System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). O PCR-RT 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 antisense + 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 ampliações 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) ( $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ ) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). 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 2: Primers**

<b>Genes</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
<i>Gapdh</i>	Fwd: AGGAGCGAGACCCCACTAAC
	Rev: GTGGTTCACACCCATCACAA
<i>Aif1</i>	Fwd: TGAGGAGCCATGAGCCAAAG
	Rev: GCTTCAAGTTTGGACGGCAG
<i>Cx3cr1</i>	Fwd: GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG
	Rev: CGCCCAAATAACAGGCCTCAGCA
<i>Jak2</i>	Fwd: TAGTGGCAGCAGCAGAACCTA
	Rev: ATCCATCCGTGAACAAAATCAT
<i>Prdm12</i>	Fwd: CTTCTCCAAGACGTGGATCAAG
	Rev: AGGTTCTGCTCCTGCTCATTC
<i>Adam8</i>	Fwd: ATCAGTGTGGTTGTGGTCTTGGT
	Rev: GAATAGGGGGTTGGAGAGCC
<i>Anxa1</i>	Fwd: GTATCCTCGGATGTTGCTGC
	Rev: GCCTGTAAGGGCTTTTCTCA
<i>Icam1</i>	Fwd: AGGGCTGGCATTGTTCTCTA
	Rev: CTTTGGGATGGTAGCTGGAA
<i>Ccl2</i>	Fwd: AGCACAGATGTGGTGGGTTT
	Rev: TGCAGCAGTCAACACAAATTG
<i>Ccr2</i>	Fwd: GGCATTGGATTCACCACAT
	Rev: CAAGGCTCACCATCATCGTA
<i>Cxcl1</i>	Fwd: ACCCGCTCGCTTCTCTGT
	Rev: AAGGGAGCTTCAGGGTCAAG
<i>Ald1h1</i>	Fwd: GCAGGTA CT TCTGGGTTGCT

	Rev: GGAAGGCACCCAAGGTCAAA
<i>Il6</i>	Fwd: TTCCTACCCAATTTCCAAT
	Rev: CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC
<i>Gfap</i>	Fwd: TGTGGATTTGGAGAGAAAGGT
	Rev: CCGATACCACTCCTCTGTCTCT

Fonte: criado pelo autor.

### 3.6. Microscopia confocal

Os tecidos coletados foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado, pH 7,0, por 4 horas, a 4°C. As amostras fixadas foram desidratadas em gradiente de sacarose 10%, 20% e 30% a 4°C, com exceção do processamento das meninges *whole mounted*, que seguiram direto para marcação, após a coleta e fixação. Em seguida, as amostras foram criopreservadas em meio preservante *Tissue- Tek® O.C.T.* e crio-seccionadas (20 µm). Crio-seções foram deixadas 20 minutos em temperatura ambiente para secagem seguida de duas lavagens com 0,3% Triton-X 100 em tampão fosfato + salina esterilizado (PBS, pH 7.2-7.4) e uma lavagem com PBS apenas. Para reduzir as ligações a proteínas inespecíficas, as crio-seções foram incubadas com soro de burro 10% por 1 hora. O anticorpo primário anti-IBA1 (1:400, Wako, 016-20001) ou anti-CD45 conjugado (1:200, Invitrogen, 12-0454-83) foram aplicados sobre as crio-seções e incubados a 4°C por 18 horas em câmara escura úmida. No dia seguinte, as crio-seções foram submetidas a novo processo de lavagem. Os anticorpos secundários conjugados com fluorocromo foram implementados sobre os cortes, que foram incubados em temperatura ambiente por 1 hora em câmara escura úmida. Ao final, as lâminas foram montadas utilizando-se VectaShield® com DAPI para marcação dos núcleos celulares. As imagens foram adquiridas utilizando-se o microscópio confocal (AxioObserver LSM780).

### 3.7. Imunoensaio Miliplex

Líquido cefalorraquidiano foi coletado por punção na cisterna magna utilizando-se um método previamente descrito. Os camundongos foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), administrado intraperitonealmente. A pele



do pescoço foi depilada e o camundongo foi disposto sobre o equipamento de estereotaxia e a cabeça foi fixada com adaptadores auriculares de cabeça. A área cirúrgica foi esterilizada com álcool 70% e foi realizada uma incisão sagital na pele inferior ao occipício. O camundongo foi disposto de forma que a cabeça estivesse em um ângulo próximo de 135° com o corpo. A cisterna magna foi penetrada através da dura-máter com um capilar de vidro, lateral a artéria dorsal espinal. O líquido cefalorraquidiano foi coletado em *ependorfs* 0,5ml e congelados imediatamente (LIU, L; DUFF, K., 2008). As amostras foram analisadas por um painel de *beads* magnéticas para 32 citocinas e quimiocinas por Milliplex (MCYTMAG-70K-PX32 Millipore), como descrito pelo fabricante e foi usado o leitor Luminex 200 e os softwares Luminex Xponent e Milliplex Analyst para análise.

### **3.8. Re-análises de dados de sequenciamento de célula única**

Os seguintes bancos de dados públicos foram utilizados: GSE129609 (WHEELER et al. 2020), GSE139103 (AVRAHAM et al., 2020), GSE165153 (SCHAFFLICK et al., 2021), GSE162807 (TANSLEY et al., 2022) e GSE182098 (YIM et al., 2022).

Bancos de dados públicos foram analisados usando o pacote Seurat v4.0.1 (Stuart et al., 2019). Esses dados foram filtrados, log normalizados, integrados e dimensionados antes da redução de dimensionalidade e identificação de agrupamentos. Para cada conjunto de dados, filtramos genes que foram expressos em menos de 3 células e removemos células de baixa qualidade que têm mais de 5-20% de conteúdo de gene mitocondrial e contêm menos de 200 features. Os bancos de dados que foram integrados foram utilizados um conjunto de dados usando o fluxo de trabalho de integração e localização de âncora baseado em referência da Seurat, que é recomendado pela Seurat para integrar um grande número de conjuntos de dados. Para a integração de âncoras usamos 1000-3000 âncoras e os primeiros 15-30 componentes principais (PCs) para as etapas de integração. A análise de componentes principais foi utilizada definida pelos autores dos bancos de dados. Com base nessas determinações, escolhemos os primeiros 15-30 PCs para identificação do vizinho mais próximo e uma resolução de agrupamento de 0.3-1,0 para localização de agrupamento. Finalmente, escolhemos o UMAP e tSNE como uma abordagem de redução de dimensionalidade não-linear para visualizar

agrupamentos. Os agrupamentos foram definidos a partir de genes específicos utilizados pelos próprios autores principais que disponibilizaram os bancos de dados. Toda a análise scRNA-seq foi feita usando R versão 4.0.2 (R Core Team, 2020). Todos os gráficos scRNA-seq foram feitos usando ggplot2 v3.3.2 (Wickham, 2016) e o scCustomize (Marsh, 2022).

### **3.9. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Comparações foram feitas utilizando análise de variância de uma via com múltiplas comparações seguida de teste de Dunnett para análises de RT-PCR ou Teste t de Student com múltiplas comparações seguida de teste de Holm-Sídák para as análises comportamentais, em software Graphpad Prism versão 9.4.1. Valores de probabilidade de 5% foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

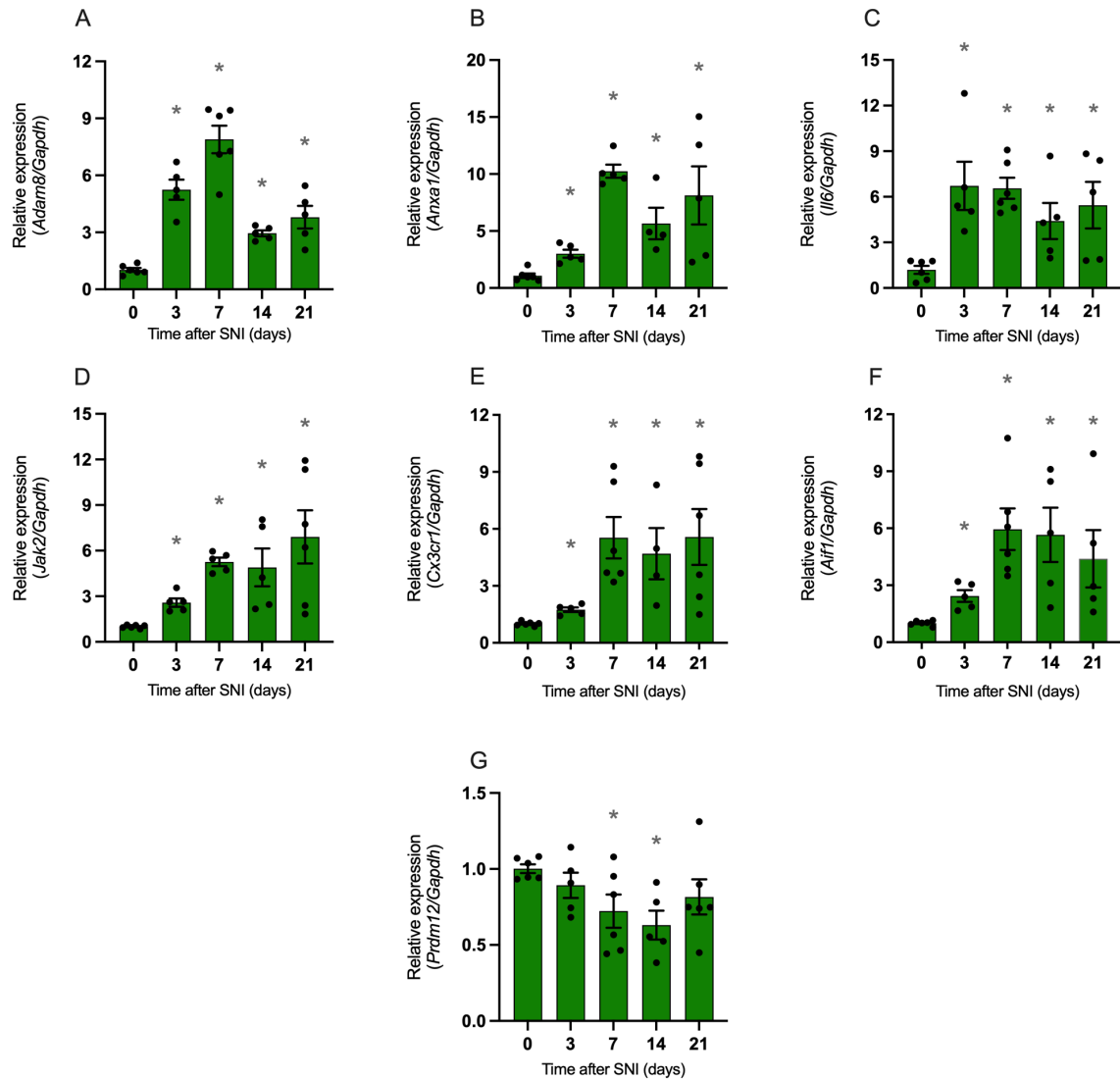
### 4.1. A neuropatia causada pelo modelo de indução de lesão SNI aumenta a expressão gênica de marcadores de ativação neuronal e glial no GRD e medula espinal

Inicialmente, nos perguntamos se a indução de neuropatia aumentaria a atividade neuronal e de células da glia no GRD e na medula espinal. Para isso, induzimos modelo de lesão periférica SNI em animais C57B6/L e coletamos os tecidos de interesse em diferentes dias após a indução do modelo SNI para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

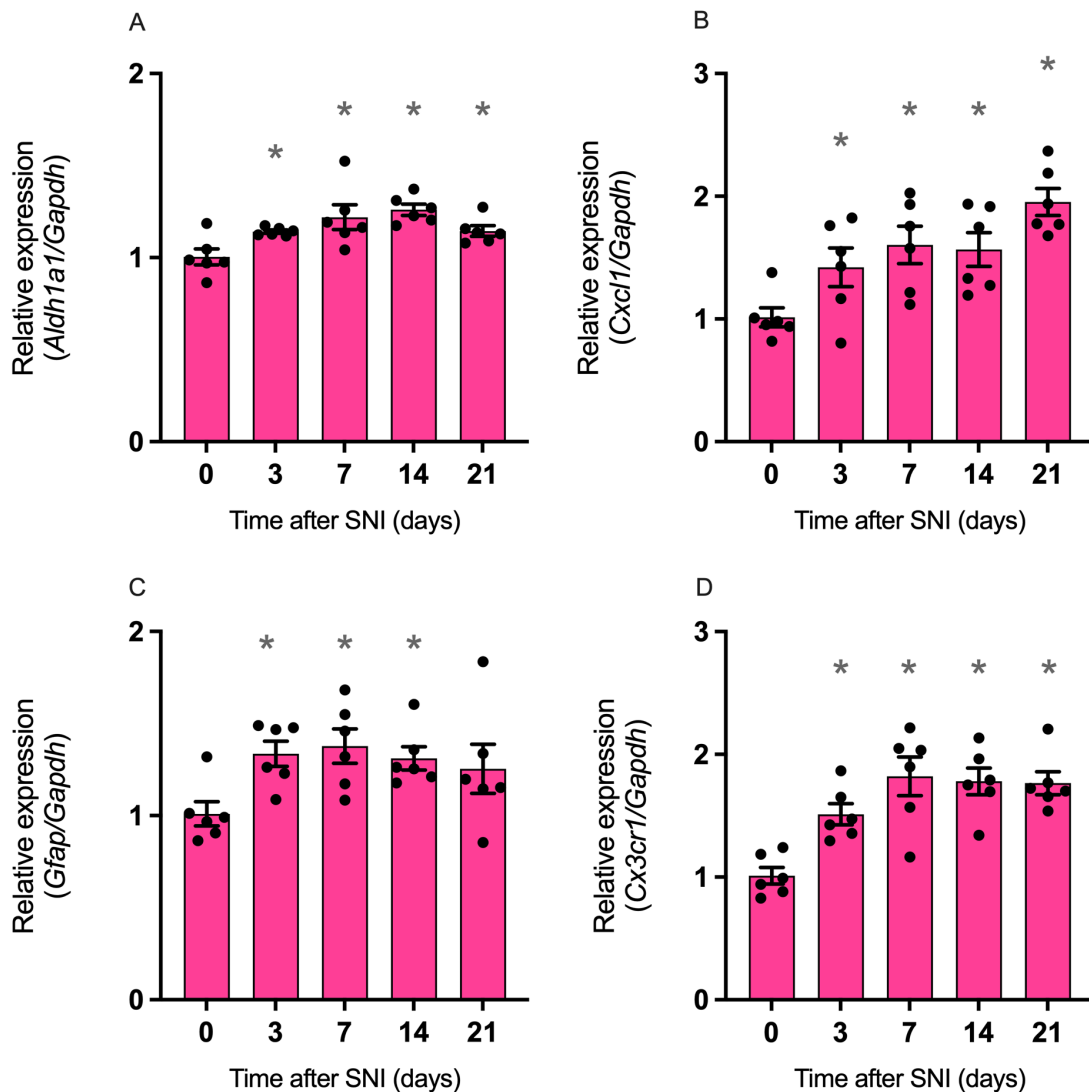
No GRD foi observado aumento significativo na expressão gênica de *Adam8* (*A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8*) (Figura 1A), *Anxa1* (*Annexin A1*) (Figura 1B), *Il6* (*Interleukin 6*) (Figura 1C) e *Jak2* (*Janus kinase 2*) (Figura 1D) ao longo do decurso temporal (KOLLER et al, 2009; PEI et al, 2011, ZHOU et al, 2016; SIMON et al., 2021; XU et al, 2021). Marcadores associados aos macrófagos também foram avaliados e observou-se aumento significativo da expressão gênica de *Cx3cr1* (*C-X3-C motif chemokine receptor 1*) (Figura 1E) e de *Aif1* (*Allograft inflammatory fator 1*) (Figura 1F). Ademais, a expressão gênica de *Prdm12* (*PR domain zinc finger protein 12*) (Figura 1G), um regulador transcricional epigenético de nociceptores, apresentou-se diminuída ao longo do decurso temporal (LANDY et al, 2021; LATRAGNA et al, 2022). Esses dados sugerem que o modelo de indução de lesão SNI foi capaz de levar ao aumento da ativação neuronal e de macrófagos no GRD.

Na medula espinal foi observado aumento significativo na expressão gênica de marcadores relacionados ao astrócito tais como *Aldh1a1* (*Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1*) (Figura 2A), *Cxcl1* (*C-X-C motif chemokine ligand 1*) (Figura 2B) e *Gfap* (*Glial fibrillary acidic protein*) (Figura 2C) a partir do terceiro dia após a indução da lesão neuronal SNI, que se manteve sustentado ao longo do decurso temporal (ALBAYAR et al, 2019). Além disso, observou-se aumento significativo na expressão gênica de *Cx3cr1* (Figura 2D) ao longo do decurso temporal, que na medula é utilizado como marcador de micróglia. Esses dados sugerem que o modelo de indução de lesão

SNI foi capaz de levar ao aumento da ativação glial na medula espinal, respectivamente astrogliose e microgliose.



**Figura 1: Expressão gênica de marcadores de lesão neuronal e de ativação de macrófagos no GRD ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.** (A) Quantificação relativa de *Adam8* ao longo de 21 dias. (B) Quantificação relativa de *Anxa1* ao longo de 21 dias. (C) Quantificação relativa de *Il6* ao longo de 21 dias (D) Quantificação relativa de *Jak2* ao longo de 21 dias. (E) Quantificação relativa de *Cx3cr1* ao longo de 21 dias. (F) Quantificação relativa de *Aif1* ao longo de 21 dias. (G) Quantificação relativa de *Prdm12* ao longo de 21 dias. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 4-6 por grupo, \*p<0,05 versus tempo 0, One-way ANOVA múltiplas comparações, post-hoc Dunnett). Legenda: SNI: *Spared Nerve Injury*; *Gapdh*: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

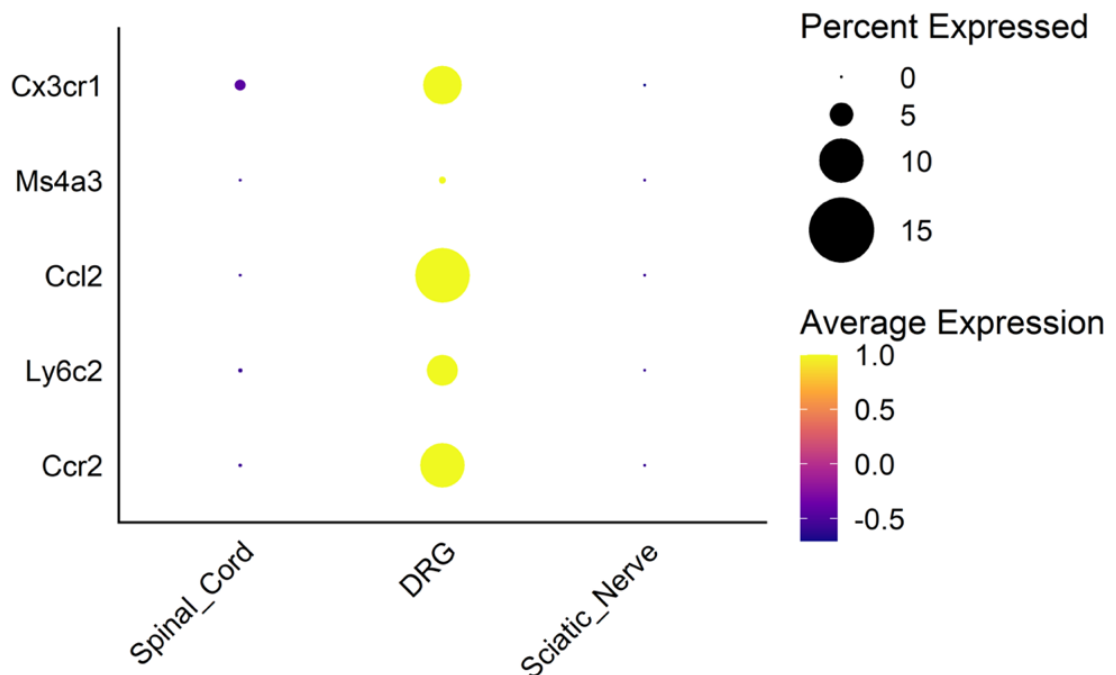


**Figura 2: Expressão gênica de marcadores de astrócitos (A-C) e micróglia (D) no na medula espinal ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.** (A) Quantificação relativa de *Aldh1a1* ao longo de 21 dias. (B) Quantificação relativa de *Cxcl1* ao longo de 21 dias. (C) Quantificação relativa de *Gfap* ao longo de 21 dias. (D) Quantificação relativa de *Cx3cr1* ao longo de 21 dias. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 5-6 por grupo, \*p<0,05 versus tempo 0, One-way ANOVA múltiplas comparações, post-hoc Dunnett). Legenda: SNI: *Spared Nerve Injury*; *Gapdh*: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

## 4.2. CCL2 participa do desenvolvimento e manutenção da dor neuropática

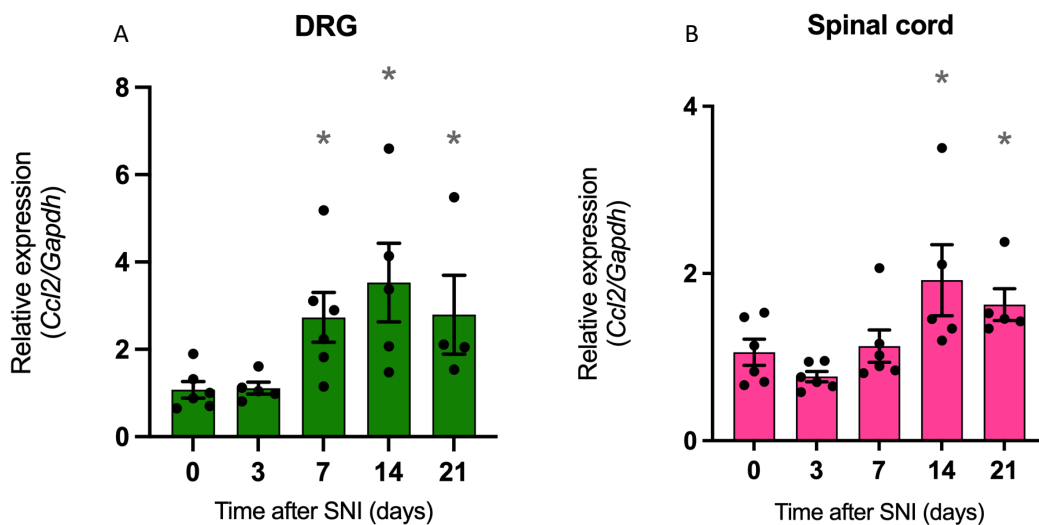
Afim de verificar se a CCL2 pode ser um dos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento/manutenção da dor neuropática, foram realizadas análises em bancos de dados públicos (GSE129609, GSE139103, GSE182098) contendo sequenciamento de células únicas de diferentes tecidos de interesse (AVRAHAM et al., 2020; WHEELER et al., 2020; YIM et al., 2022). Análises de expressão gênica para *Ccl2* no GRD e na medula espinal por RT-qPCR e avaliações comportamentais nocifensivas em animais selvagens e *Ccl2*<sup>-/-</sup> após indução do modelo de neuropatia SNI também foram realizadas com essa finalidade.

Nos dados reanalisados de diferentes tecidos do sistema nervoso somatossensorial de camundongos em uma condição saudável, foi observado que o GRD é, dentre os demais, o tecido enriquecido para a expressão de *Ccl2*, *Ccr2* e outros marcadores relacionados a macrófagos residentes como *Cx3cr1* e macrófagos provenientes da circulação sanguínea como *Ly6c2* (*Lymphocyte antigen 6 complex, locus C2*) e *Ms4a3* (*Membrane spanning 4-domains A3*), um marcador específicos de progenitores GMP (*Granulocyte-monocyte progenitors*), que darão origem a monócitos e neutrófilos na medula óssea (LIU et al. 2019).



**Figura 3: Análise Dotplot por tecidos do sistema somatossensorial em camundongos saudáveis.** Os gráficos dotplot exibem a distribuição destacada de CCL2, CCR2, CX3CR1, LY6C2 e MS4A3 para cada população de célula indicada. Legenda: *Ccl2*: C-C motif chemokine ligand 2; *Ccr2*: C-C chemokine receptor type 2; *Cx3cr1*: C-X3-C motif chemokine receptor 1; *Ly6c2*: Lymphocyte antigen 6 complex, locus C2; *Ms4a3*: Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3.

A expressão gênica de CCL2 está aumentada em ambos GRD e medula espinal ao longo do decurso temporal após indução do modelo de lesão neuronal SNI. Aumentos significativos foram observados a partir do sétimo dia após o modelo em ambos os tecidos, sugerindo que a CCL2 pode ter um papel importante na manutenção da dor neuropática. Para testar essa hipótese, realizamos avaliações comportamentais nocifensivas utilizando animais depletados para essa quimiocina.



**Figura 4: Expressão gênica de CCL2 em GRD e medula espinal ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.** (A) Quantificação relativa de *Ccl2* no GRD ao longo de 21 dias. (B) Quantificação relativa de *Ccr2* na medula espinal ao longo de 21 dias. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM ( $n = 4-6$  por grupo,  $*p < 0,05$  versus tempo 0, One-way ANOVA múltiplas comparações, post-hoc Dunnett). Legenda: DRG: *Dorsal root ganglia*; SNI: *Spared Nerve Injury*; *Gapdh*: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

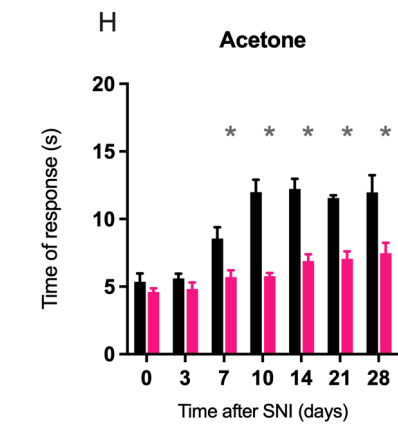
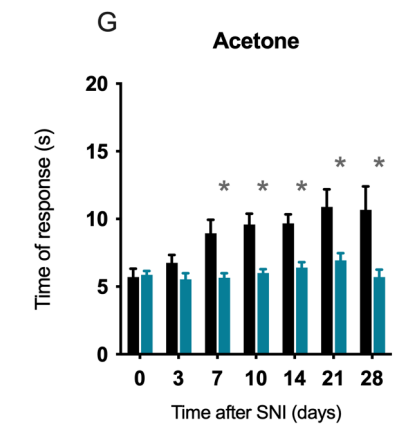
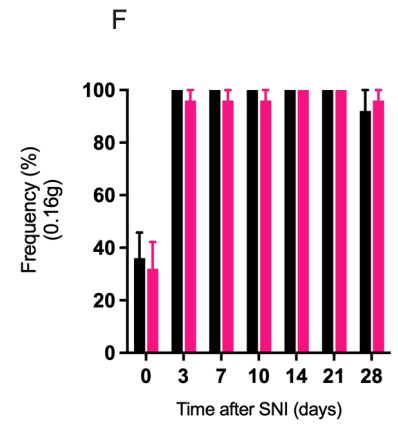
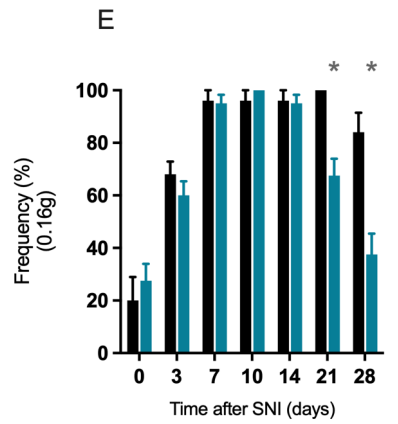
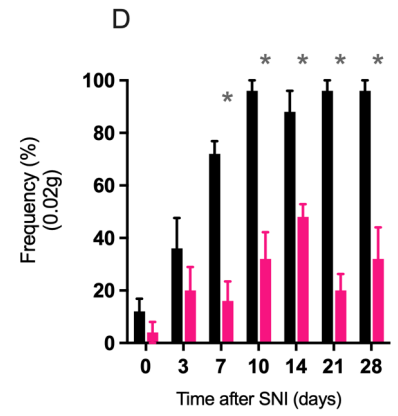
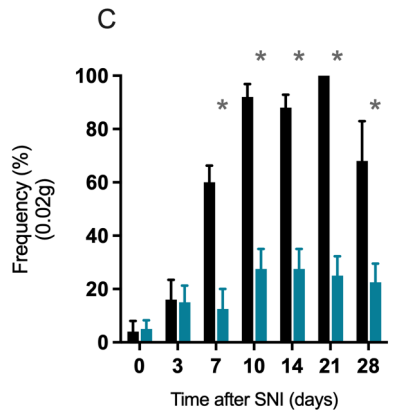
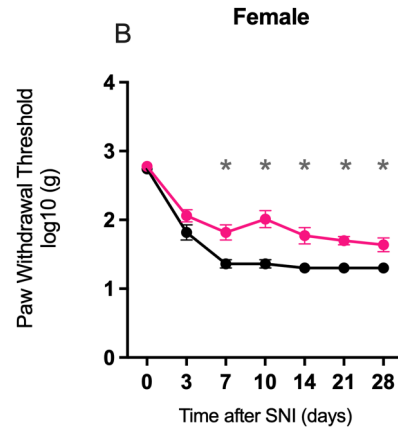
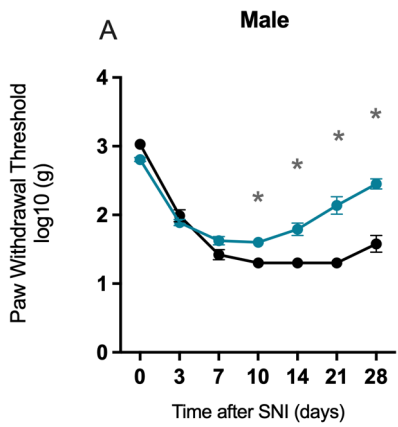
Em relação às análises comportamentais nocifensivas, como podemos observar na Figura 5, a depleção de CCL2 parece contribuir para a reversão do limiar de retirada de pata tanto em machos (Figura 5A) partir do sétimo dia após a indução do modelo de neuropatia SNI. Nas fêmeas, a depleção de CCL2 reverteu parcialmente o fenótipo doloroso como pode ser visto na Figuras 5B.

Além disso, a CCL2 parece participar do desenvolvimento da alodinia em ambos os sexos como pode ser observado nas Figuras 5C e 5D que mostram a frequência de retirada de pata para o filamento 0,02g. Quando analisamos a hiperalgesia por meio da frequência de retirada de pata para o filamento 0,16g como demonstram as Figuras 5E e 5F, a CCL2 parece não ter contribuição para a diminuição do fenótipo nas fêmeas e em tempos iniciais nos machos, durante o estabelecimento do fenótipo doloroso.

Em adição a isso, a CCL2 parece contribuir com o desenvolvimento de alodinia ao frio, uma vez que a ausência dessa proteína torna os animais pouco responsivos à acetona, como pode ser visto nas Figuras 5G e 5H em ambos os sexos.

Como conclusão parcial, temos que a depleção de CCL2 parece ter um papel fundamental na manutenção da neuropatia, como previsto, confirmando os achados presentes na literatura (THACKER et al., 2009; VAN STEENWINCKEL et al., 2015; WU; ZHU; GAO, 2021).





**Figura 5: Avaliação comportamental nocifensiva em animais selvagens e *Ccl2*<sup>-/-</sup> de ambos os sexos após modelo de indução de lesão SNI.** (A) Limiar mecânico de retirada de pata por *von Frey* filamentos em machos. (B) Limiar mecânico de retirada de pata por *von Frey* filamentos em fêmeas. (C) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,02g em machos. (D) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,02g em fêmeas. (E) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,16g em machos. (F) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,16g em fêmeas. (G) Tempo de resposta ao frio em segundos após instilação de acetona em machos. (H) Tempo de resposta ao frio em segundos após instilação de acetona em fêmeas. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 5-8 por grupo de machos; n = 5 por grupo de fêmeas, \*p<0,05 versus grupo selvagem, Teste t de Student múltiplas comparações, post-hoc Holm-Sídák).

### **4.3. CCL2 é expressa por diferentes tipos celulares do sistema somatossensorial, mas não em nociceptores.**

A literatura apresenta dados controversos acerca da fonte celular de CCL2 e o envolvimento de neurônios sensoriais na produção desse quimiocina (BIBER & BODDEKE, 2014). Diante disso, buscamos avaliar que tipo celular presente no microambiente somatossensorial seria responsável, após a existência de uma lesão neuronal, pela produção e secreção de CCL2.

Com base nisso, nosso primeiro foco foi avaliar se a depleção de CCL2 em neurônios sensoriais levaria a uma modulação da resposta comportamental nos animais machos submetidos ao modelo SNI. Para isso, realizamos uma deleção específica do gene *Ccl2* em fibras nociceptivas que expressam o canal de sódio Nav1.8 (*Nav1.8<sup>Cre</sup>CCL2<sup>fl/fl</sup>*) (STIRLING et al. 2005).

Estes animais foram desenvolvidos a partir do cruzamento entre animais que expressam a enzima Cre recombinase sob o promotor do gene *Scn10a* (*Sodium voltage-gated channel alpha subunit 10*), que codifica a proteína Nav1.8 e camundongos que possuem os alelos para o gene da CCL2 flanqueados por sequências de clivagem específicas (*flox*).

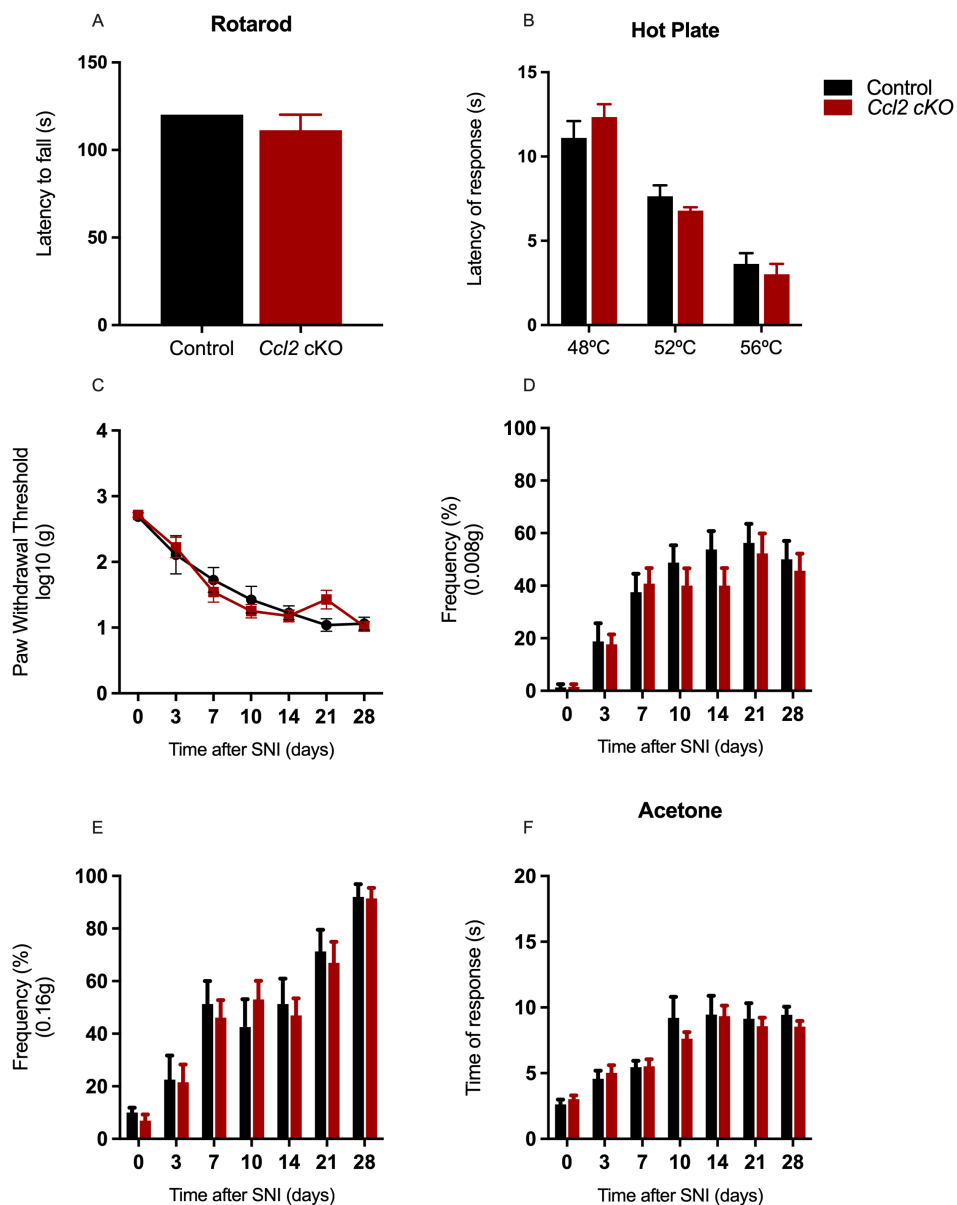
Para garantir que essa deleção específica não alterou os comportamentos fisiológicos basais dos animais, avaliamos a resposta locomotora do animal naive por meio do teste de performance Rotarod. Como podemos observar na Figura 6A, não foi identificado nenhum prejuízo motor nos animais condicionais em comparação aos animais controle, sugerindo que a depleção condicional de CCL2 não afetou a resposta fisiológica dos animais relacionadas ao desenvolvimento locomotor.

Ademais, o limiar de nocicepção térmico dos animais foi avaliado por meio do teste de placa quente. Como podemos observar na Figura 6B, não foi possível observar diferença nos limiares térmicos entre os animais condicionais e os animais controle, sugerindo que a depleção condicional de CCL2 não afetou o reconhecimento de estímulos térmicos ao calor não-nocivos e nocivos.

Em seguida, a resposta comportamental nocifensiva frente a um estímulo após a indução do modelo de neuropatia SNI foi analisada por meio dos testes de *von Frey* filamentos e de evaporação de acetona. Como podemos observar na Figura 6C, a deleção condicional de CCL2 não alterou o desenvolvimento da resposta de retirada mecânica de pata após indução do modelo de SNI ao longo do tempo quando

comparada com o grupo controle. O mesmo pode ser observado nas Figuras 6D e 6E as respostas de frequência de retirada mecânica de pata frente ao estímulo com os filamentos de 0,008g (para avaliar alodinia) e 0,16g (para avaliar hiperalgesia) também não foram alteradas significativamente ao longo do tempo quando comparadas aos respectivos controles.

A avaliação da resposta nocifensiva ao frio induzida por instilação de acetona demonstrou que os animais condicionais não apresentam alteração no desenvolvimento da resposta quando comparados aos animais controles como pode ser observado na Figura 6F.



**Figura 6: Avaliação comportamental nocifensiva em animais controle e CCL2 condicionais machos após modelo de indução de lesão SNI.** (A) Resposta locomotora medida pela latência à queda por Rotarod. (B) Latência de resposta medida pela latência até o *licking* das patas traseiras. (C) Limiar mecânico de retirada de pata por *von Frey* filamentos. (D) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,02g. (E) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,16g. (F) Tempo de resposta ao frio em segundos após instilação de acetona. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 3-8 por grupo). Legenda: cKO: *Knockout* condicional; *Licking*: comportamento de lambida.

Diante dos dados comportamentais apresentados e na tentativa de obter mais informações sobre a dinâmica da CCL2 na fisiopatologia da dor neuropática, buscamos identificar o possível subtipo celular não-neuronal que expressa essa quimiocina e seu receptor CCR2 em diferentes condições em murinos. Para esse fim, utilizamos bancos de dados públicos (GSE139103 e GSE162807) em condições de neuropatia.

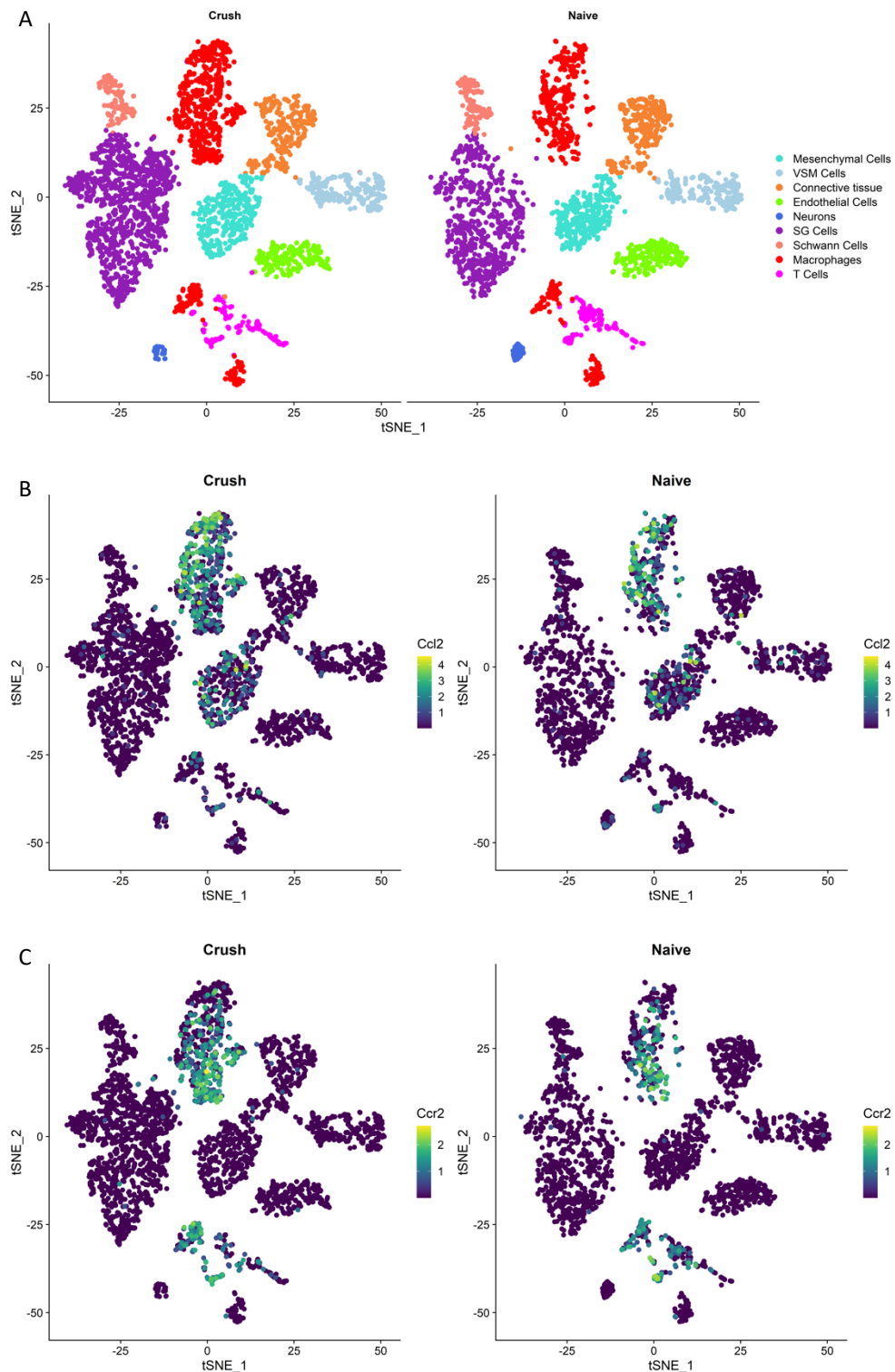
Com relação a análise de GRD murino em modelo de neuropatia induzida por esmagamento do nervo ciático, (AVRAHAM et al., 2022) foram identificados 9 tipos de agrupamentos celulares em duas condições experimentais [Naive e Lesão por Esmagamento (*Crush*): células mesenquimais, células do músculo liso vascular, células do tecido conectivo, células endoteliais, neurônios, células de Schwann, macrófagos e células T. Os genes marcadores *Cd68* (*Cluster of differentiation 68*), *Csfr1* (*Colony stimulating factor 1 receptor*), *Cx3cr1* e *Ly6c2* (*Lymphocyte antigen 6 complex, locus C2*) foram utilizados como controle positivo das populações de macrófagos.

Dentre as diferentes populações de células (Figura 7A), a expressão de *Ccl2* está enriquecida nas populações de macrófagos e células mesenquimais em ambas as condições experimentais (Figura 7B). A expressão de *Ccr2*, por sua vez, encontra-se enriquecida nas populações de macrófagos e de células T presentes nesse tecido em ambas as condições experimentais (Figura 7C).

A análise por densitometria dessas populações (Figura 8) demonstrou que a CCL2 (Figura 8A e 8E) está presente na população de macrófagos *Cx3cr1<sup>High</sup>* (Figura 8C e 8G) presente no GRD, mas não na população *Ly6c2<sup>+</sup>* (Figura 8D e 8H) em ambas as condições experimentais. Ademais, a análise nos mostrou um enriquecimento da

expressão de *Ccr2* (Figura 8B e 8F) nas células *Ly6c2<sup>+</sup>* (Figura 8D e 8H) e em uma subpopulação de macrófagos *Cx3cr1<sup>High</sup>* (Figura 8C e 8G) no GRD.

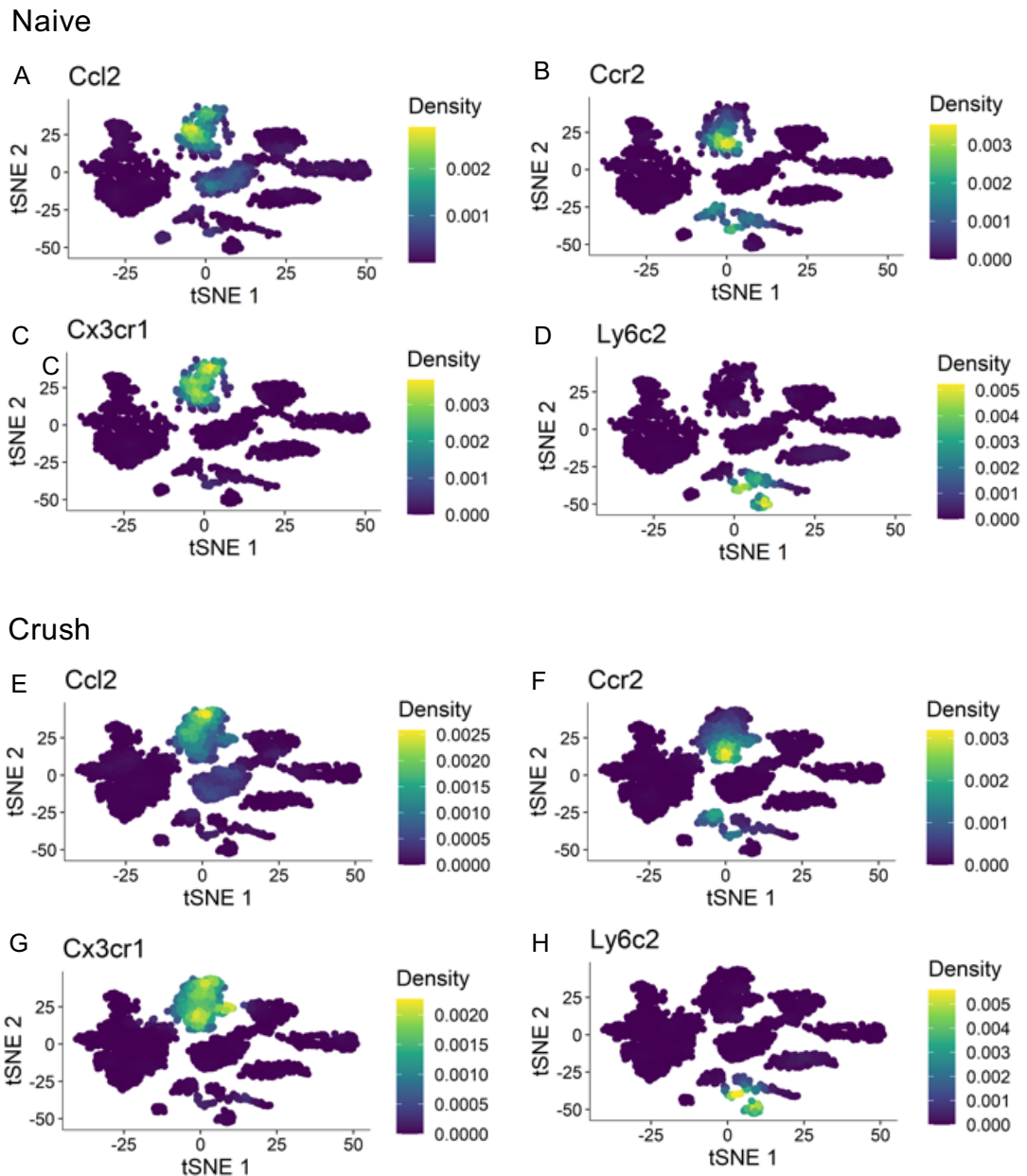
Em relação aos marcadores utilizados para caracterizar as populações de macrófagos, podemos observar que a população de macrófagos *Cxc3r1<sup>+</sup>* (Figura 8) está enriquecida com a expressão de CD68 (Figura 9A) e *Csfr1* (Figura 9B), enquanto as populações *Ly6c2<sup>+</sup>* (Figura 9C), apenas com a expressão de *Cd68*, em ambas as condições experimentais.



**Figura 7: Análise t-SNE (*t-Distributed stochastic neighbor embedding*) por condição experimental de GRD murino em modelo de indução de lesão por esmagamento. (A) Análise t-SNE de células do GRD por condição experimental. (B) *Dotplot* da expressão de *Ccl2* no GRD por condição experimental. (C) *Dotplot* da expressão de *Ccr2* no GRD por condição experimental. Legenda: *Ccl2*: C-C motif**

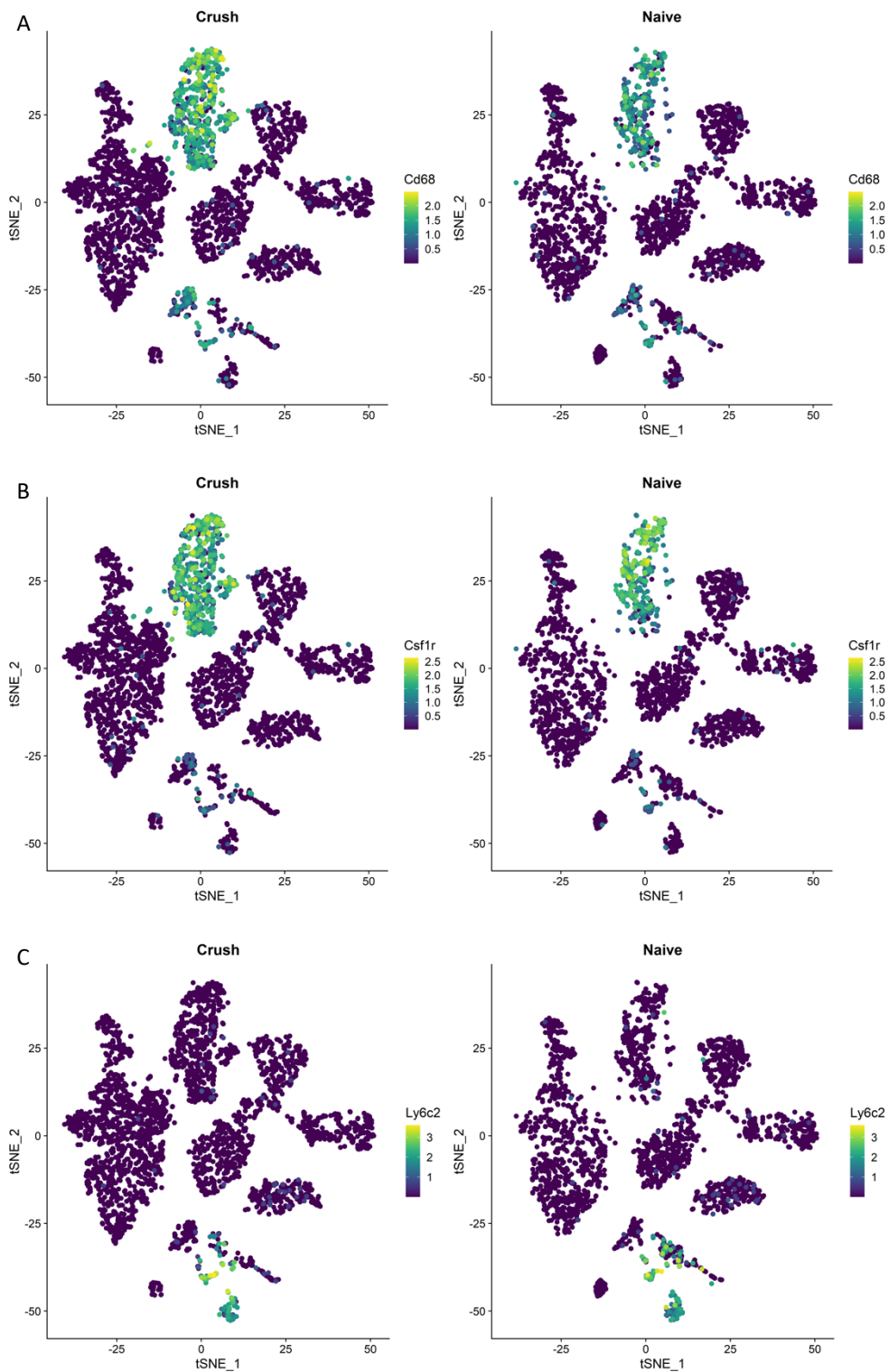
*chemokine ligand 2; Ccr2: C-C chemokine receptor type 2; Crush: Esmagamento; VSM: Vascular smooth muscle; SG: Satellite Glial.*





**Figura 8: Análise densitométrica por condição experimental de GRD murino em modelo de indução de lesão por esmagamento.** (A) Densitometria da expressão de *Ccl2* nas células de GRD em animais naive. (B) Densitometria da expressão de *Ccr2* nas células de GRD em animais naive. (C) Densitometria da expressão de *Cx3cr1* nas células de GRD em animais naive. (D) Densitometria da expressão de *Ly6c2* nas células de GRD em animais naive. (E) Densitometria da expressão de *Ccl2* nas células de GRD em animais submetidos ao modelo de *crush*. (F) Densitometria da expressão de *Ccr2* nas células de GRD em animais submetidos ao modelo de *crush*. (G) Densitometria da expressão de *Cx3cr1* nas células de GRD em animais submetidos ao modelo de *crush*. (H) Densitometria da expressão de *Ly6c2* nas células

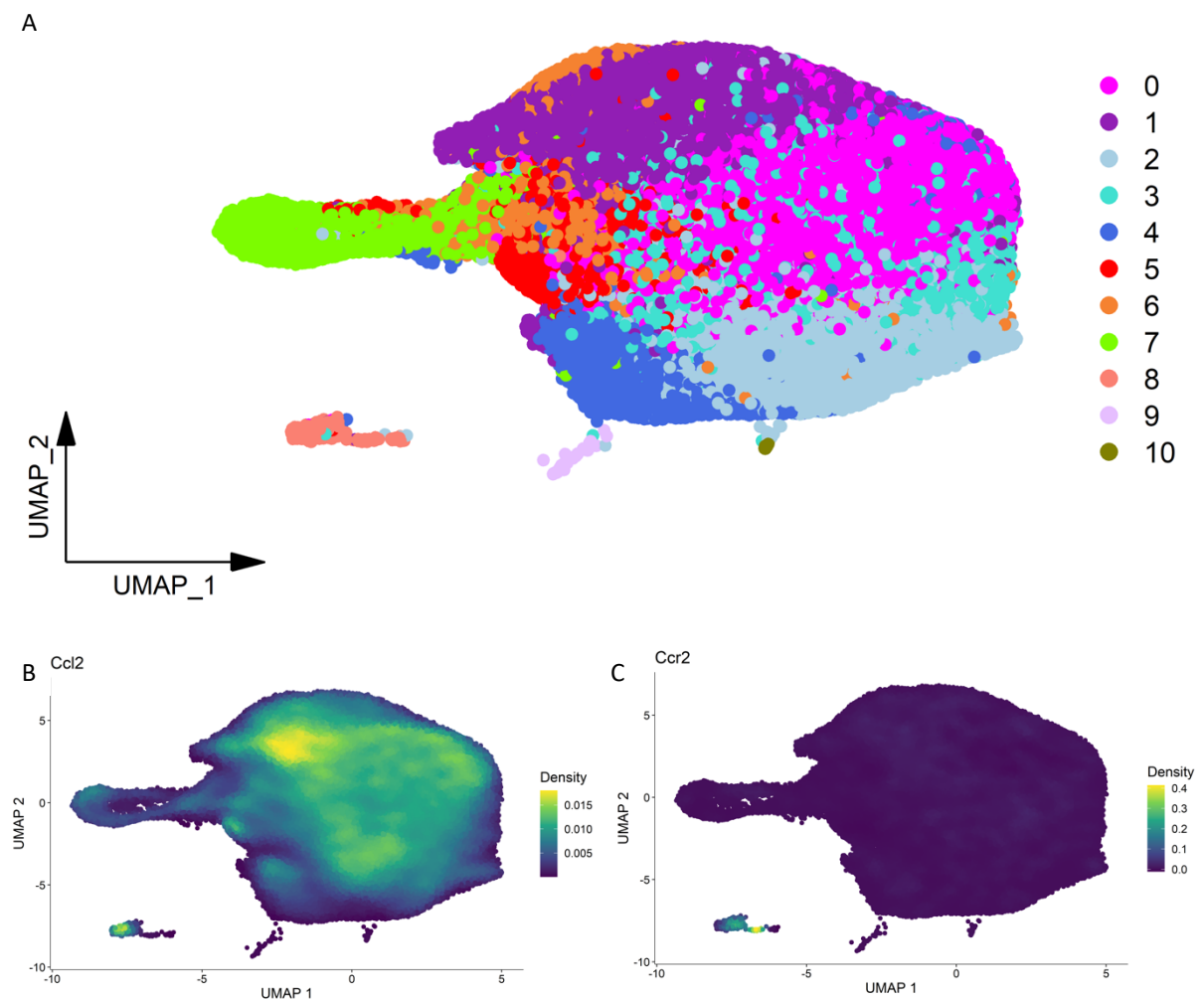
de GRD em animais submetidos ao modelo de *crush*. Legenda: *Ccl2*: C-C motif chemokine ligand 2; *Ccr2*: C-C chemokine receptor type 2; *Crush*: Esmagamento; *Cx3cr1*: C-X3-C motif chemokine receptor 1; *Ly6c2*: Lymphocyte antigen 6 complex, locus C2.



**Figura 9: Análise t-SNE por condição experimental de GRD murino em modelo de indução de lesão por esmagamento. (A) Dotplot da expressão de *Cd68* no GRD por condição experimental. (B) Dotplot da expressão de *Csfr1* no GRD por condição experimental. (C) Dotplot da expressão de *Ly6c2* no GRD por condição experimental. Legenda: *Crush*: Esmagamento; *Cd68*: *Cluster of differentiation 68*; *Csfr1*: *Colony stimulating fator 1 receptor*; *Ly6c2*: *Lymphocyte antigen 6 complex, locus C2*.**

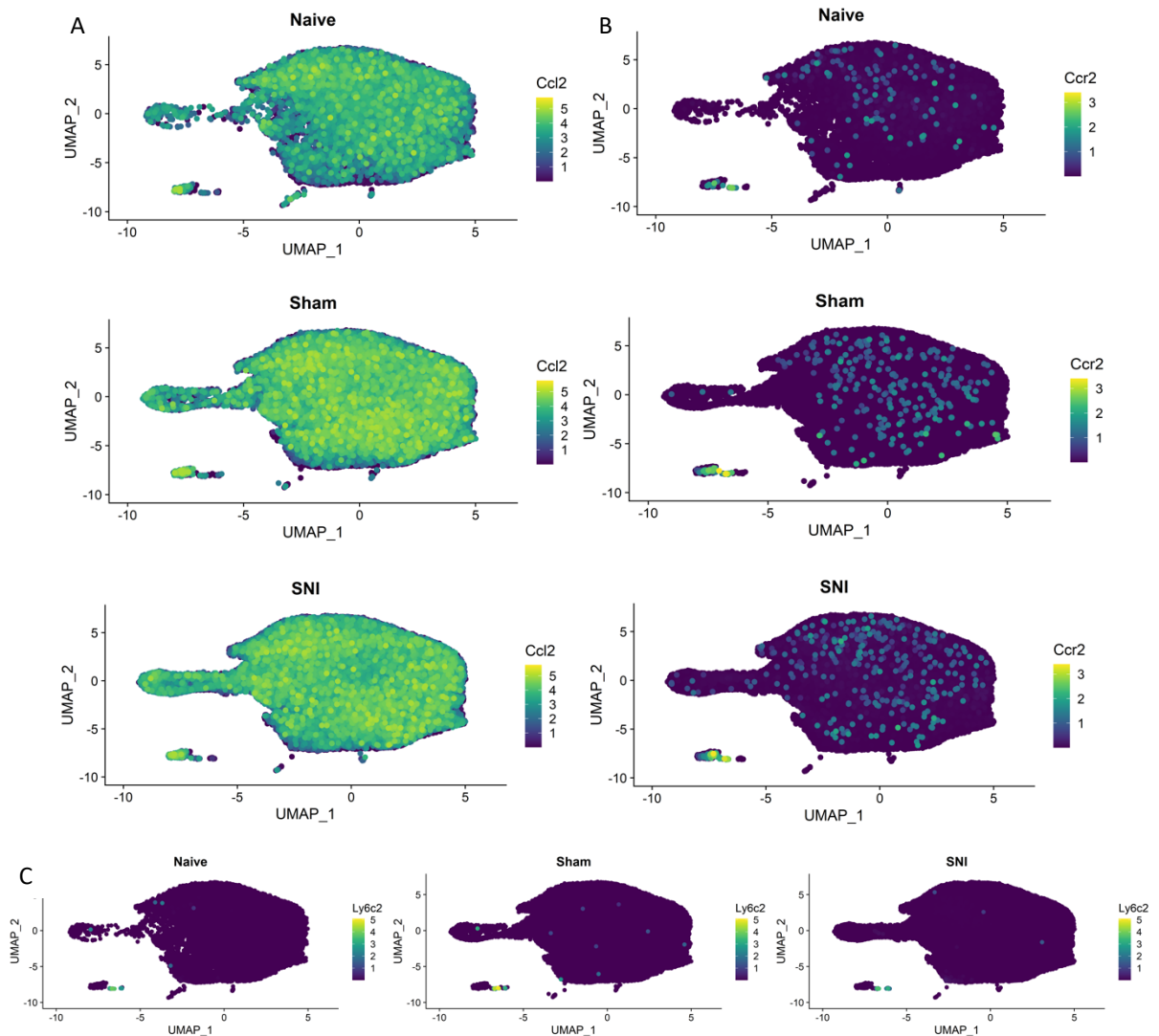
O outro banco de dados é referente ao sequenciamento de micróglia durante o modelo de SNI e foram identificados 11 agrupamentos celulares de micróglia em diferentes condições experimentais (naive, sham e SNI) (TANSLEY et al., 2022).

A expressão de *Ccl2* por densitometria está enriquecida em todos os agrupamentos celulares encontrados. No entanto, a expressão de *Ccr2* está enriquecida somente no agrupamento oito em ambas as condições experimentais, cujo marcador enriquecido correspondente é o *Ly6c2*, sugerindo que essa população de células sejam monócitos que vieram da circulação sanguínea (Figura 10).



**Figura 10: Análise densitométrica UMAP (*Uniform manifold approximation and projection*) do total de células microgliais murinas em modelo de indução de lesão SNI. (A) Análise UMAP das populações de células microgliais. (B) Densitometria da expressão de *Ccl2* nas populações microgliais. (C) Densitometria da expressão de *Ccr2* nas populações microgliais. Legenda: *Ccl2*: *C-C motif chemokine ligand 2*; *Ccr2*: *C-C chemokine receptor type 2*.**

A avaliação da expressão *Ccl2/Ccr2* por grupo experimental demonstrou que a *Ccl2* está presente em todos os agrupamentos celulares diferenciais obtidos, confirmando os dados da literatura. A expressão de *Ccr2* está enriquecida no agrupamento celular 8 como confirmado pela densitometria, em todos os grupos experimentais.



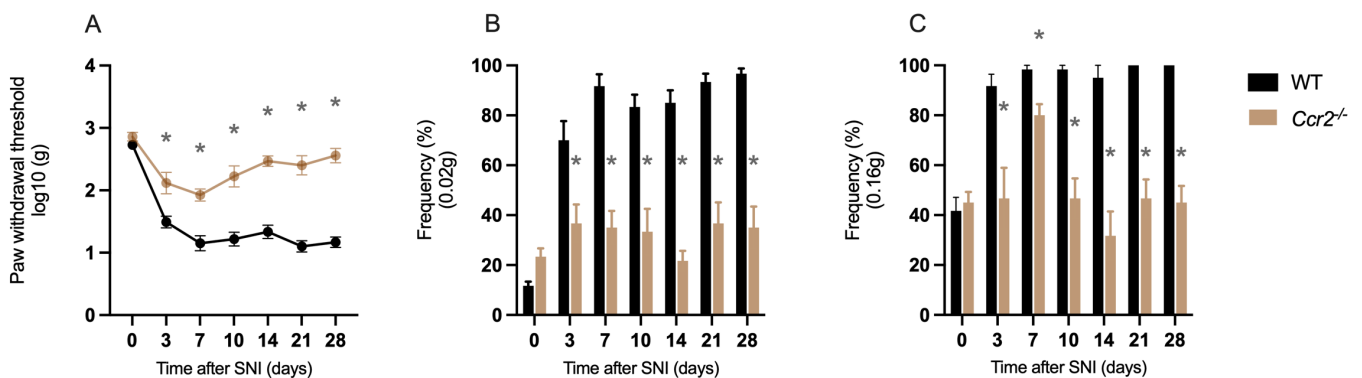
**Figura 11: Análise UMAP por grupo experimental de células microgliais em modelo de indução de lesão SNI. (A) Dotplot da expressão de *Ccl2* nas células microgliais por condição experimental. (B) Dotplot da expressão de *Ccr2* nas células microgliais por condição experimental (C) Dotplot da expressão de *Ly6c2* nas células microgliais por condição experimental. Legenda: *Ccl2*: C-C motif chemokine ligand 2; *Ccr2*: C-C chemokine receptor type 2; *Ly6c2*: Lymphocyte antigen 6 complex, locus C2.**

#### 4.4. CCR2 participa do desenvolvimento e manutenção da dor neuropática

Diante dos dados anteriores relativos à CCL2 e ao seu receptor CCR2 e sabendo que a CCL2 tem como principal função a regulação de mecanismos celulares, promovendo o recrutamento de monócitos, células T de memória e células dendríticas para os sítios de inflamação na presença de lesão tecidual (CARR et al, 1994; XU et al, 1996; EVERS et al, 2022), foi avaliado se a depleção total do gene *Ccr2* em camundongos modificaria a resposta comportamental nocifensiva.

Em relação às análises comportamentais, como podemos observar na Figura 12, a depleção de CCR2 parece contribuir para a diminuição do limiar de retirada de pata em machos (Figura 12A) a partir do terceiro dia após a indução do modelo de neuropatia SNI, com reversão a valores próximos aos do basal a partir do décimo quarto dia. Além disso, a deleção do gene para CCR2 parece dificultar o desenvolvimento da alodinia (Figura 12B) e a sensibilidade ao filamento de 0,16g é similar ao animal controle respectivo ao longo do tempo, com exceção do sétimo dia (Figura 12C).

Como conclusão deste experimento temos que o receptor CCR2 parece ter um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da neuropatia induzida pelo modelo SNI



**Figura 12: Avaliação comportamental nocifensiva em animais selvagens e *CCR2*<sup>-/-</sup> machos após modelo de indução de lesão SNI.** (A) Limiar mecânico de retirada de pata por *von Frey* filamentos. (B) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,02g. (C) Frequência de resposta mecânica ao filamento de 0,16g. (Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM (n = 6 por grupo, \*p<0,05 versus grupo selvagem, Teste t múltiplas comparações, post-hoc Holm-Sídák).

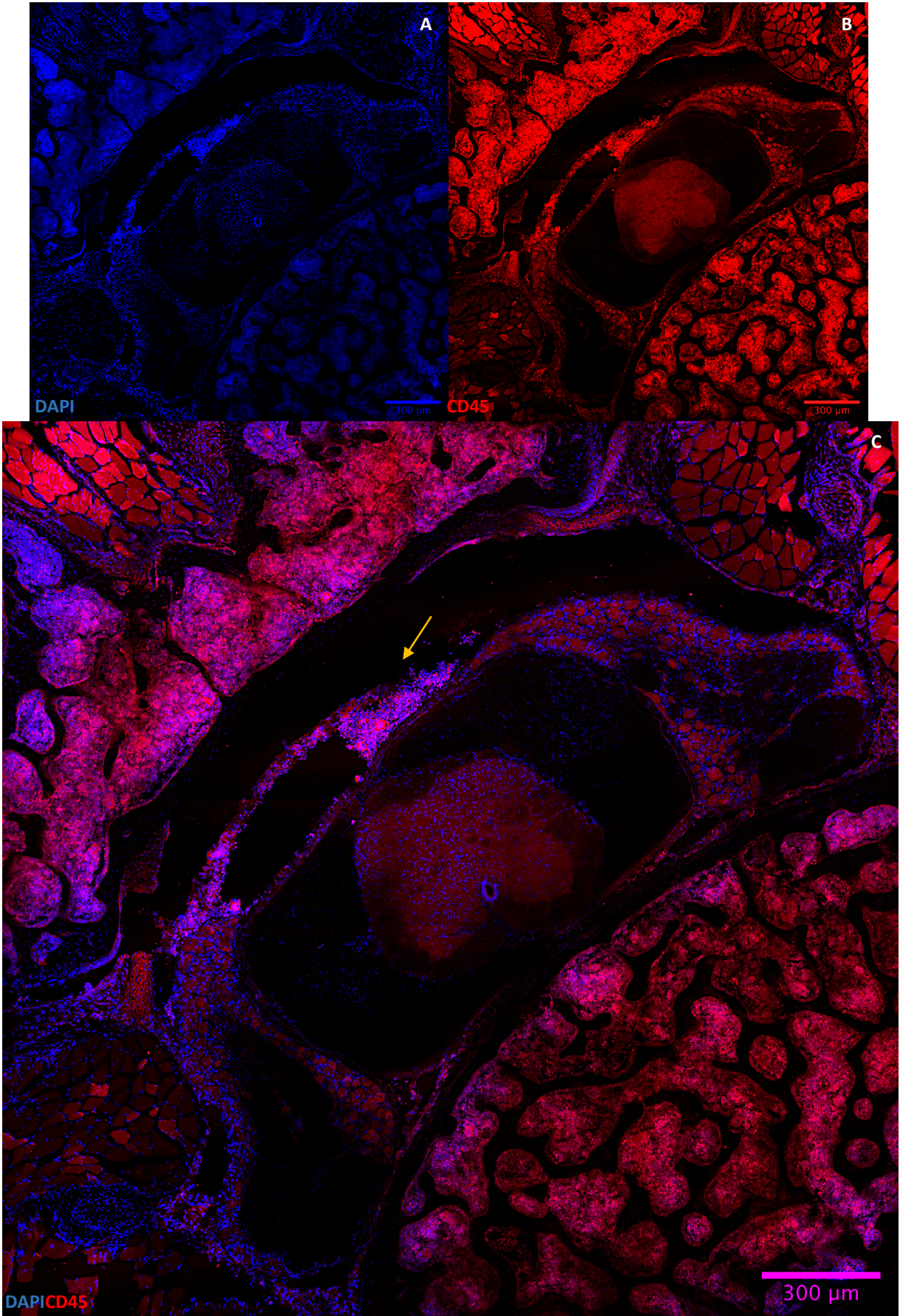
#### 4.5. Células CCR2<sup>+</sup> são recrutadas para as meninges na dor neuropática

Dados prévios da literatura demonstraram que os leucócitos da circulação sanguínea falham em infiltrar o parênquima da medula espinal (GUIMARÃES et al., 2019) e do GRD (GUIMARÃES & SILVA, et al, 2022 *under review*) após indução do modelo de neuropatia SNI. Esses dados nos questionaram acerca do papel da sinalização CCL2/CCR2 nesse contexto: Afinal, para onde as células imunes CCR2<sup>+</sup> estão sendo recrutadas após a lesão neuropática?

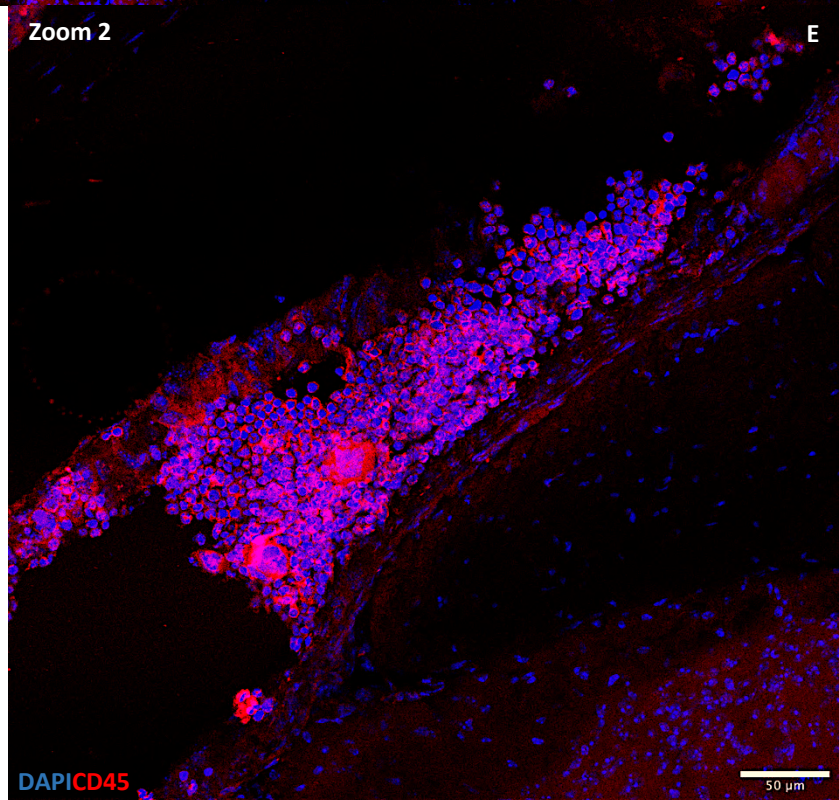
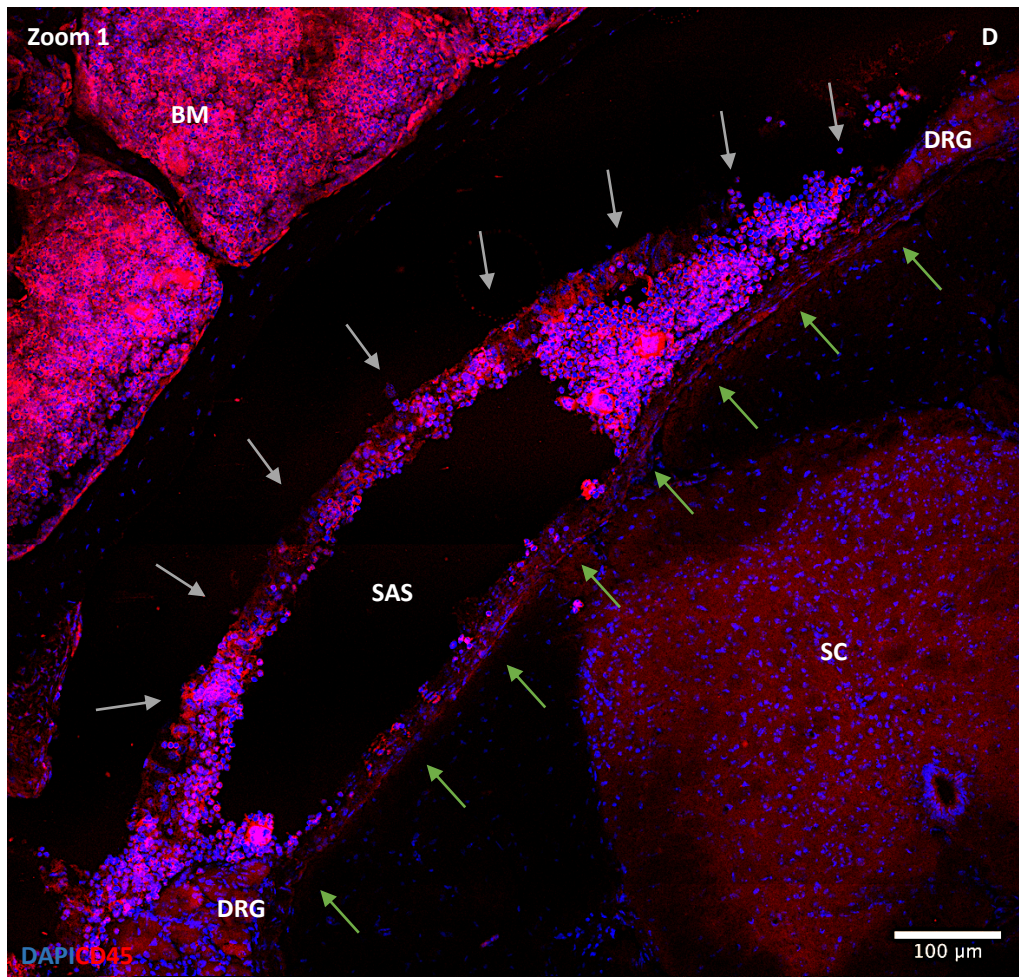
Atualmente, diversos trabalhos tem mostrado um papel fundamental das meninges (KIERDORF; MASUDA; JORDÃO; PRINZ, 2019; DE VLAMINCK et al., 2022; MAGANIN et al., 2022) No entanto, muitos desses trabalhos têm estudado as dinâmicas de recrutamento de células imunes apenas para as meninges cerebrais em doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas. Assim, nós buscamos avaliar se células leucocitárias eram capazes de infiltrar as meninges que envolvem a medula espinal e os GRD lombares após a indução de neuropatia SNI por microscopia confocal por meio de diferentes preparações teciduais.

Por meio da avaliação do infiltrado inflamatório utilizando-se de um protocolo de composição de medula espinal com vértebras lombares, com a finalidade de preservar a integridade das meninges, foi observada a presença de um grande número de células hematopoiéticas (CD45<sup>+</sup>) na porção dorsal das meninges ipsilateral a lesão neuronal SNI após 14 dias (Figuras 13A, 13B e 13C). Estas células encontram-se dispostas no interior do espaço subaracnóide (Figuras 13D e 13E). Corroborando os dados apresentados na literatura e do nosso grupo, não observamos infiltrado de células CD45<sup>+</sup> no parênquima da medula espinal ou nos GRDs.





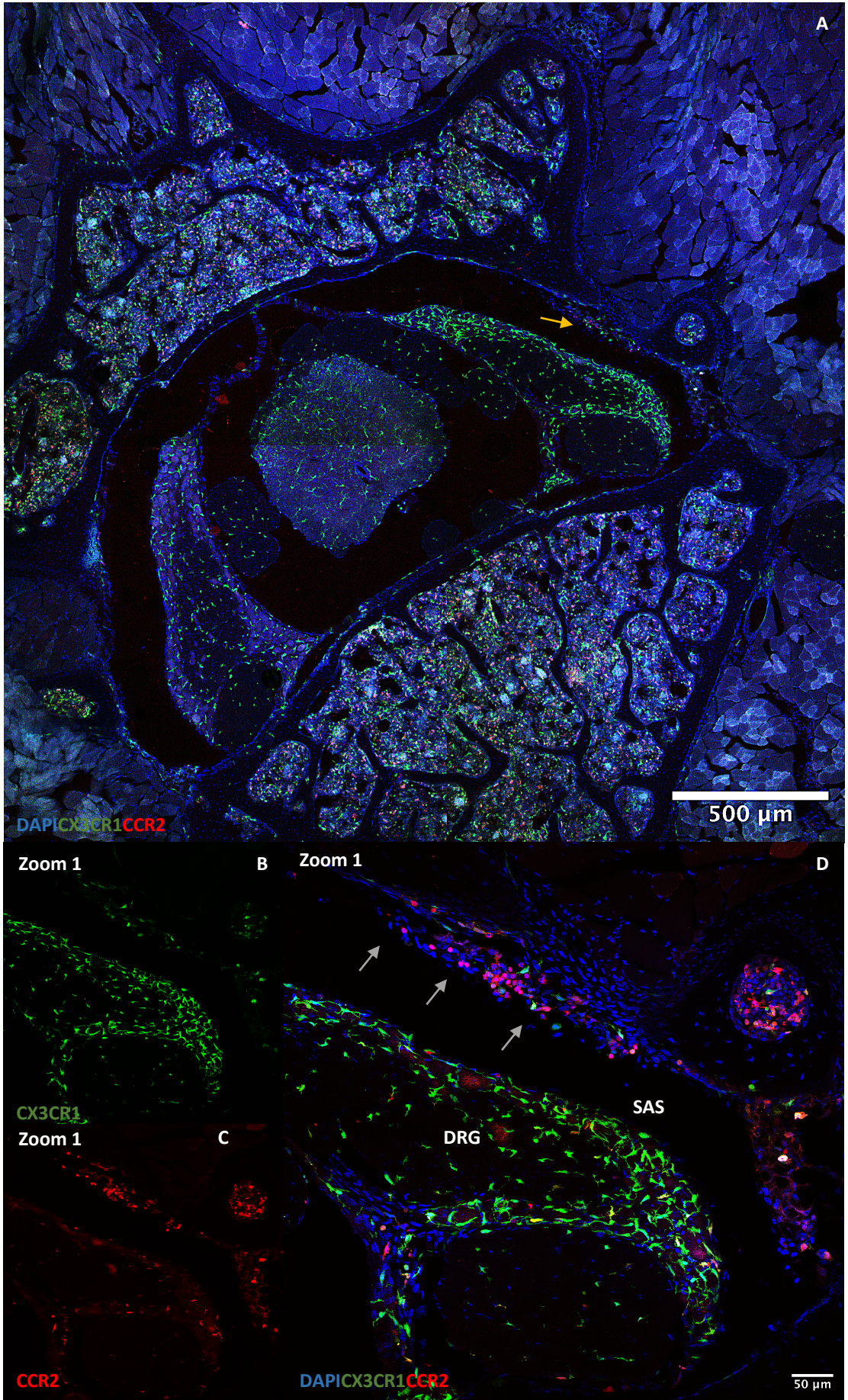




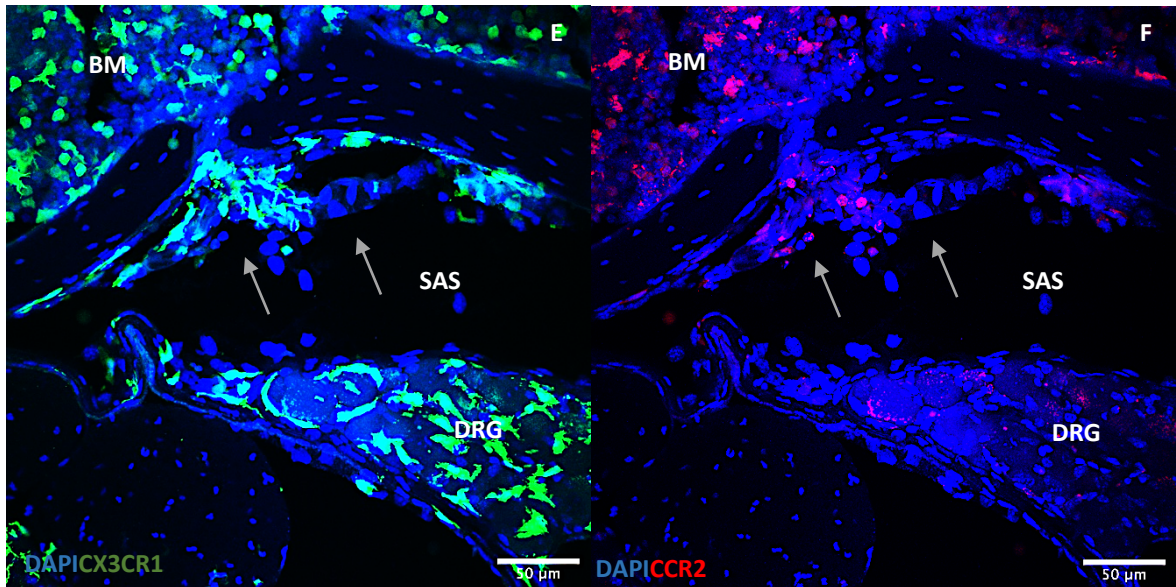
**Figura 13: Imagem representativa por confocal da presença de células CD45 em composição de medula espinal com vértebras da região lombar (L3-L5) dos animais submetidos ao modelo de indução de lesão neuropática SNI após 14 dias.** (A) Representação da composição de medula espinal com osso marcada com DAPI. (A) Representação da composição de medula espinal com osso marcada com CD45. (C) Representação sobreposta da composição de medula espinal com osso marcada com DAPI e CD45. (D) Focalização sobreposta das meninges marcada com DAPI e CD45. (E) Focalização sobreposta das células hematopoiéticas marcadas com DAPI e CD45. A seta amarela indica a respectiva focalização em D. Notar o grande infiltrado de células CD45 no espaço subaracnóide em D. O corte de tecido foi corado com marcadores para núcleo (DAPI, azul) e células hematopoiéticas (CD45, vermelho). Escalas indicam 300µm para composição inteira, 100µm para focalização nas meninges e 50µm para focalização no infiltrado de células. Legenda: setas cinzas: dura-máter; setas verdes: pia-máter; BM: *Bone marrow*; DRG: *Dorsal root ganglia*; SAS: *Subarachnoide space*; SC: *Spinal cord*.

Diante desses achados, nos perguntamos se células CCR2<sup>+</sup> poderiam estar presentes nesse infiltrado e se o recrutamento de células para as meninges se iniciava em etapas iniciais do desenvolvimento da dor neuropática. Para isso, foram desenvolvidos animais duplo repórter que apresentam a expressão da proteína fluorescente GFP (*Green fluorescent protein*) sob o promotor do gene *Cx3cr1*, a fim de identificarmos a população de macrófagos residentes da meninge, e a expressão da proteína RFP (*Red fluorescent protein*) sob o promotor do gene *Ccr2*, a fim de identificarmos a população de células recrutadas. Estes animais foram desenvolvidos a partir do cruzamento entre animais *Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup>* e *Ccr2<sup>RFP/RFP</sup>* (*Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>Ccr2<sup>RFP/+</sup>*), uma vez que os animais parentais possuem os dois alelos para os respectivos genes depletados e isso prejudicaria a avaliação das populações de interesse. Os animais foram avaliados no sétimo dia após a indução do modelo SNI.









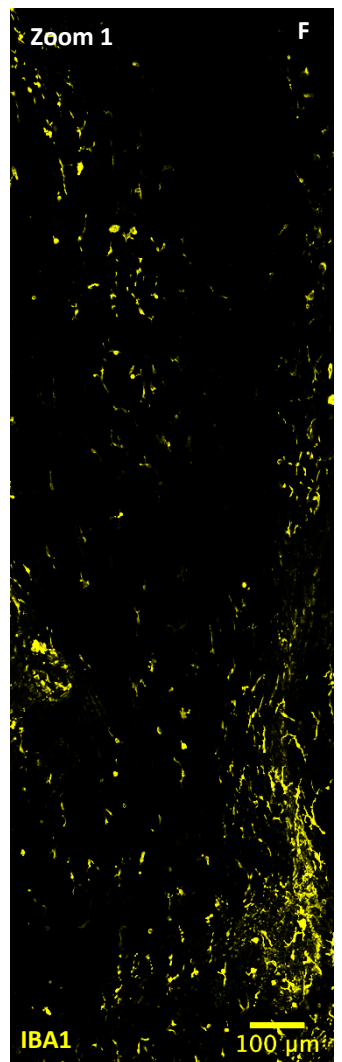
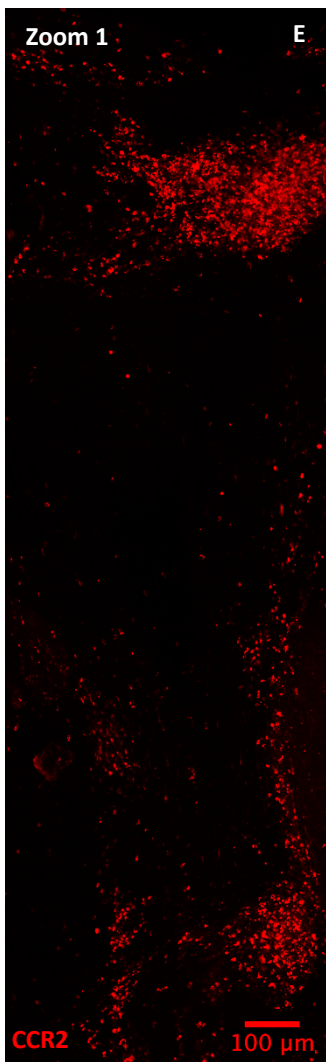
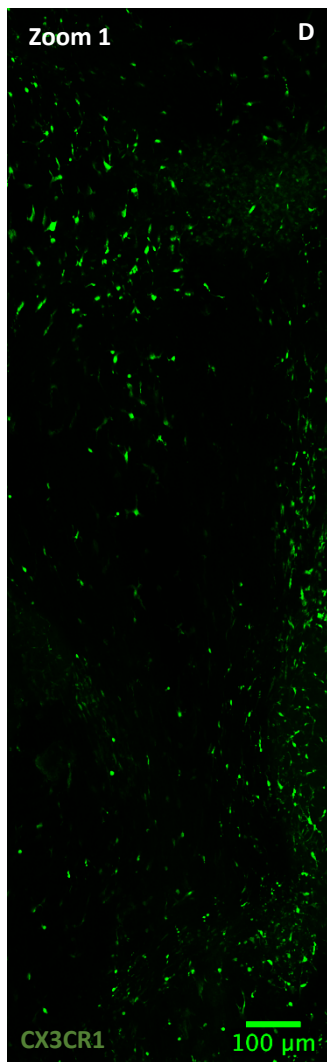
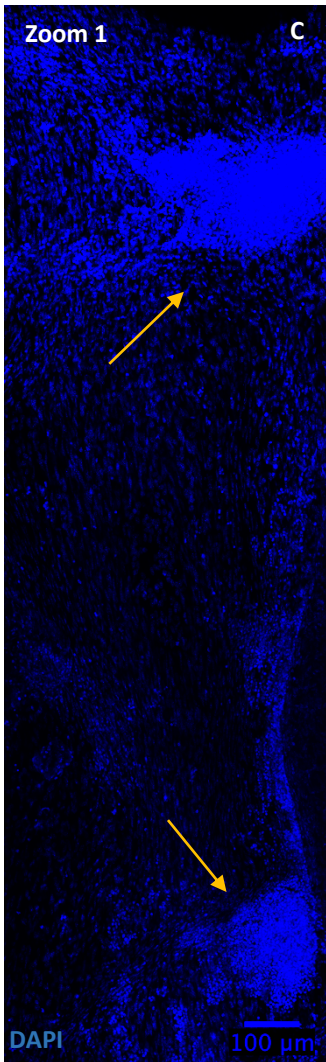
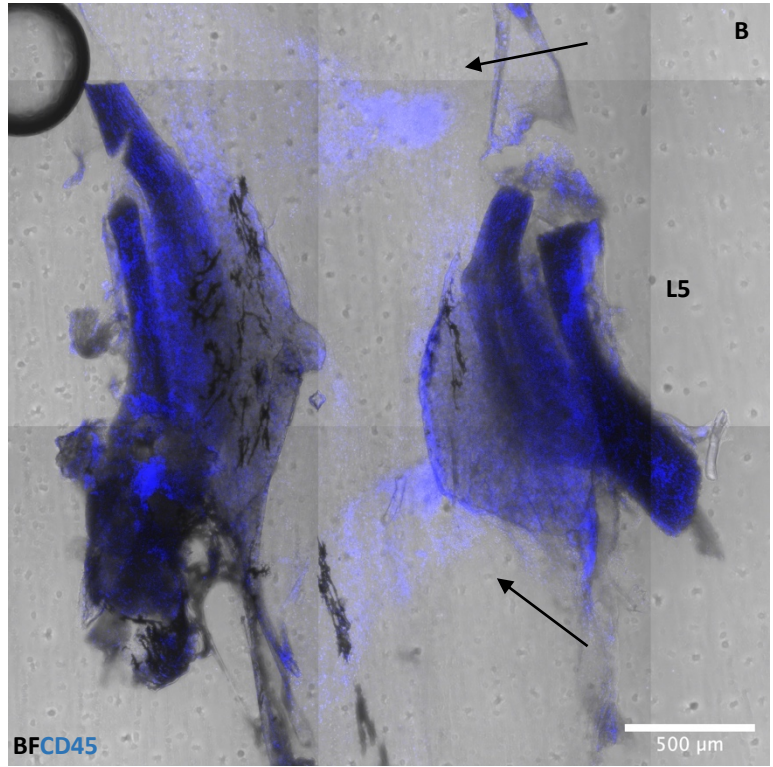
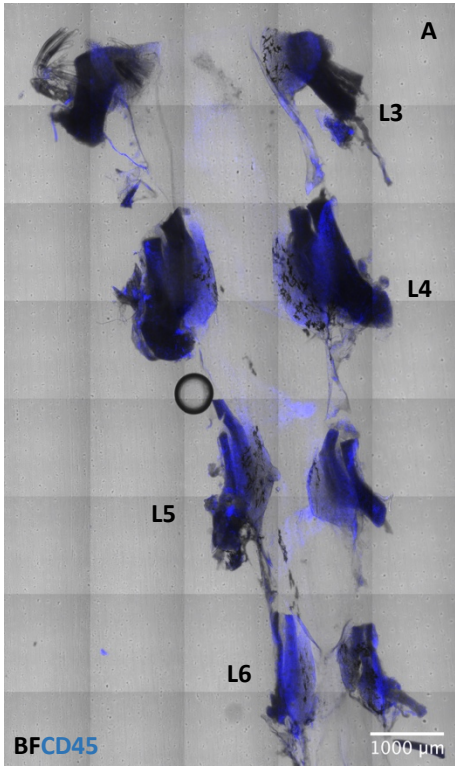
**Figura 14: Imagem representativa por confocal da presença de células CX3CR1<sup>+</sup> e CCR2<sup>+</sup> em composição de medula espinal com vértebras da região lombar (L3-L5) dos animais *Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>Ccr2<sup>RFP/+</sup>* submetidos ao modelo de indução de lesão neuropática SNI após 7 dias. (A) Representação sobreposta da composição de medula espinal com osso marcada com DAPI, CX3CR1 e CCR2. (B) Focalização do infiltrado inflamatório marcado com CX3CR1. (C) Focalização do infiltrado inflamatório marcado com CCR2. (D) Focalização sobreposta do infiltrado inflamatório marcado com DAPI, CX3CR1 e CCR2. (E) Representação do infiltrado inflamatório no espaço subaracnóideo marcado com DAPI e CX3CR1. (F) Representação do infiltrado inflamatório no espaço subaracnóideo marcado com DAPI e CCR2. A seta amarela indica a respectiva focalização em D. Notar o infiltrado de células CCR2<sup>+</sup> no espaço subaracnóide em contato com a dura-máter em D e F. O corte de tecido foi corado com marcadores para núcleo (DAPI, azul), macrófagos residentes (CX3CR1, verde) e células infiltrantes (CCR2, vermelho). Escalas indicam 500μm para composição inteira e 50μm para focalização no infiltrado de células. Legenda: setas cinzas: infiltrado de células CCR2<sup>+</sup>; DRG: *Dorsal root ganglia*; SAS: *Subarachnoide space*.**

Ao avaliar o infiltrado de células a partir do protocolo de composição de medula espinal com vértebras lombares, foi observada a presença de um discreto número de células CCR2<sup>+</sup> no interior do espaço subaracnóide em contato com a dura-máter, nas proximidades do GRD ipsilateral à lesão. A marcação para as células CX3CR1<sup>+</sup> foi utilizada como referência, uma vez que após a indução do modelo de SNI, macrófagos residentes do GRD proliferam e aumentam a expressão desse marcador nessa

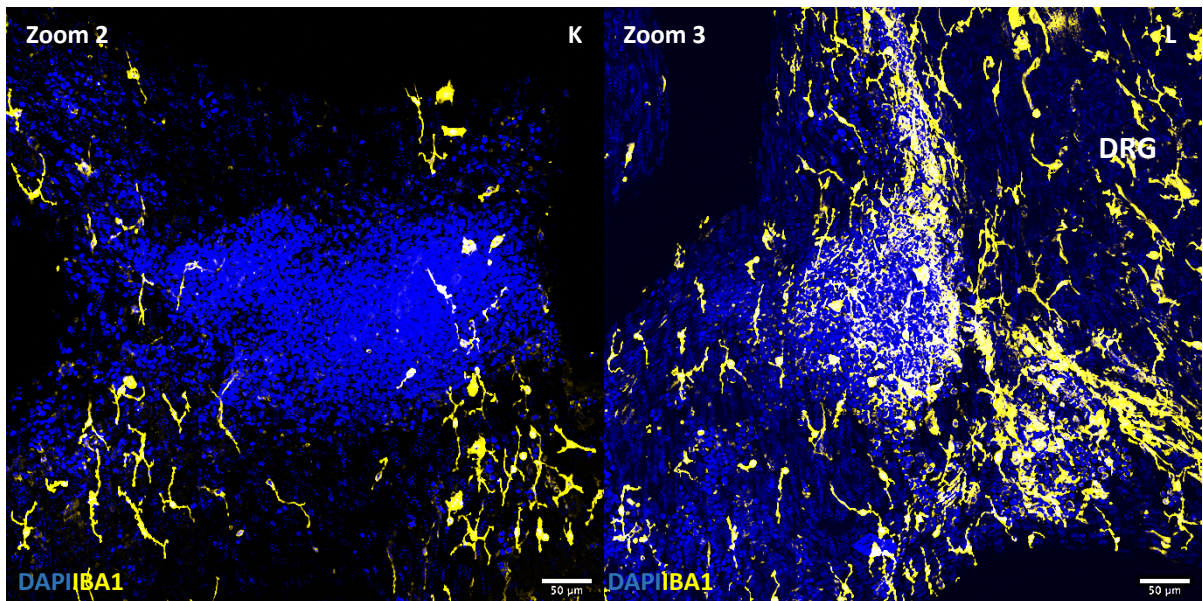
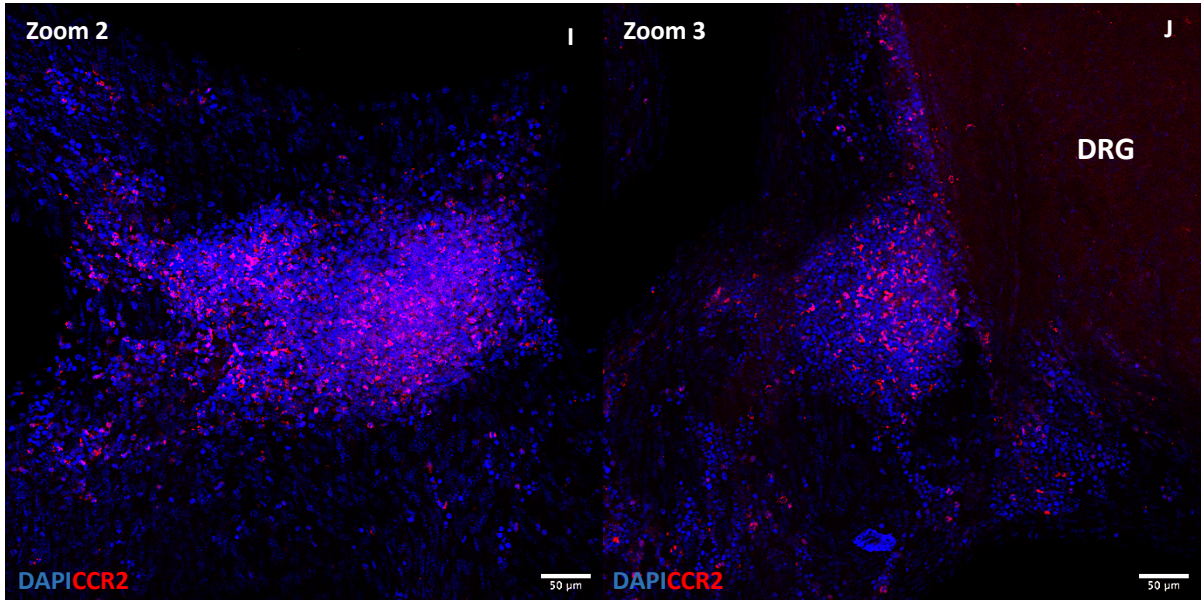
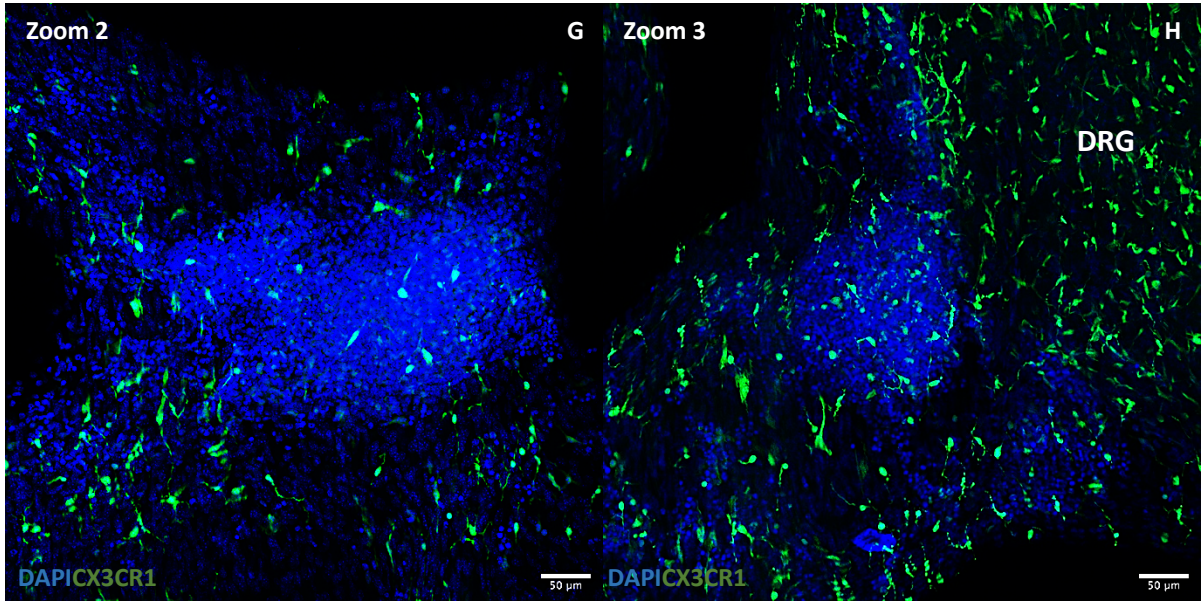
condição como já descrito na literatura e nos nossos achados (Figura 14) (GUIMARÃES & SILVA et al, 2022 *under review*). Além disso, podemos notar células residentes CX3CR1<sup>+</sup> na meninge (Figura 14E).

Com o objetivo de otimizar a visualização das células infiltradas na meninge, foi desenvolvido um protocolo de meninge isolada que consiste na coleta apenas da dura-máter e aracnóide com os receptivos GRDs lombares L3-L6 acoplados. Utilizando-se dos animais *Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>Ccr2<sup>RFP/+</sup>*, foi realizada a coleta das meninges no sétimo dia após a indução do modelo de neuropatia SNI. Como podemos observar na Figura 15A, o infiltrado leucocitário está presente ao longo de toda a membrana meníngea, com representatividade significativa nos arredores do GRD L5 (Figura 15B).

A partir das Figuras 15C-F, é possível distinguir que a meninge possui células residentes ao longo de toda a sua extensão, que possuem uma assinatura IBA1<sup>+</sup> após indução do modelo de neuropatia SNI. O infiltrado inflamatório, por sua vez, é composto quase exclusivamente de células CCR2<sup>+</sup>, corroborando os dados apresentados anteriormente. É importante salientar que, como se pode notar na Figura J, as células CCR2<sup>+</sup> mesmo na proximidade do GRD, não infiltram o parênquima deste órgão, localizando-se preferencialmente sobre a cápsula que envolve o GRD. Essas observações sugerem que este possa ser um dos mecanismos que contribuam para a modulação dos neurônios sensoriais a partir dessas células.







**Figura 15: Imagem representativa por confocal da presença de células positivas para CX3CR1, CCR2 e IBA1 em composição de meninge inteira da região lombar (L3-L6) dos animais submetidos ao modelo de indução de lesão neuropática SNI após 7 dias.** (A) Representação sobreposta da meninge e dos GRDs L3-L6 marcada com DAPI no campo claro (B) Focalização sobreposta da meninge e GRDs L5 marcada com DAPI no campo claro. (C) Focalização da meninge relativa ao GRD L5 marcada com DAPI. (D) Focalização da meninge relativa ao GRD L5 marcada com CX3CR1 (E) Focalização da meninge relativa ao GRD L5 marcada com CCR2. (F) Focalização da meninge relativa ao GRD L5 marcada com IBA1. (G) Focalização sobreposta do infiltrado inflamatório acima do GRD L5 marcado com DAPI e CX3CR1. (H) Focalização sobreposta do infiltrado inflamatório abaixo do GRD L5 marcado com DAPI e CX3CR1. (I) Focalização sobreposta do infiltrado inflamatório acima do GRD L5 marcado com DAPI e CCR2. (J) Focalização sobreposta do infiltrado inflamatório abaixo do GRD L5 marcado com DAPI e CCR2. (K) Focalização sobreposta do infiltrado inflamatório acima do GRD L5 marcado com DAPI e IBA1. (L) Focalização sobreposta do infiltrado inflamatório abaixo do GRD L5 marcado com DAPI e IBA1. As setas pretas indicam as áreas infiltradas por células na meninge. As setas amarelas indicam as áreas infiltradas por células em aumento. O corte de tecido foi corado com marcadores para núcleo (DAPI, azul), macrófagos residentes (CX3CR1, verde), células infiltrantes (CCR2, vermelho) e macrófagos ativados (IBA1, amarelo). Escalas indicam 1000 $\mu$ m para composição completa, 500 $\mu$ m para focalização apenas nos GRDs L5, 100 $\mu$ m para focalização na meninge e 50 $\mu$ m para focalização nos infiltrados de células. Legenda: BF: *Bright Field*; DRG: *Dorsal root ganglia*.

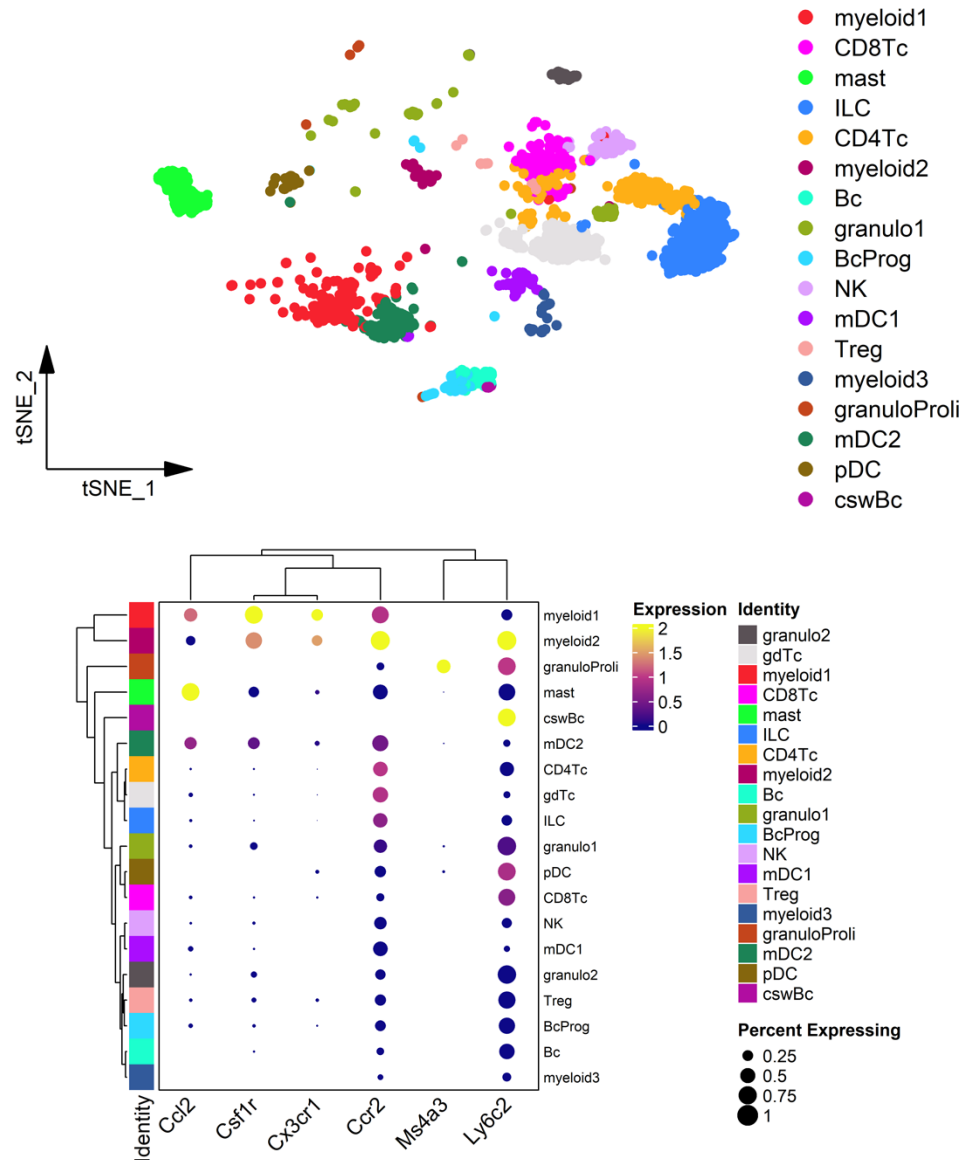


Diante disso, nos perguntamos qual seria o padrão de celularidade das meninges numa condição saudável. Para isso, foram reanalisados bancos de dados publicados anteriormente contendo transcriptomas de células únicas de meninges cerebrais de camundongos e ratos saudáveis (GSE165153) com o intuito de avaliar essa distribuição celular (SCHAFFLICK et al., 2021).

Na Figura 16A, é possível observar uma grande variedade de células do sistema imune nas meninges cerebrais em uma condição saudável. Dentre estas células, foram identificadas três populações de células mieloides, nas quais foram analisadas a expressão dos genes *Ccl2* e *Ccr2*, além de outros marcadores de endereçamento de macrófagos. No que diz respeito ao *Ccr2*, foi possível observar um enriquecimento deste receptor nas células mieloides 2, cuja assinatura gênica é *Ly6c2<sup>High</sup>* e *Cx3cr1<sup>int</sup>*, sugerindo que essas células possam ter vindo da circulação sanguínea. Em contrapartida, o agrupamento de células mieloides 1, apresenta uma assinatura *Cx3cr1<sup>High</sup>* e baixa expressão de *Ccr2*, sugerindo que estas células residam nas meninges. Ambas as populações são positivas para *Csfr1<sup>+</sup>*. Vale salientar que outras populações de células, tais como mastócitos, células dendríticas mieloides, células T CD4<sup>+</sup>, células T  $\gamma\delta$  e células linfoides inatas, apresentaram expressão menos pronunciada de *Ccr2*. Essas células também podem contribuir para a produção de outras citocinas em estados patológicos após seu recrutamento e ativação via CCR2 (SEO et al., 2015; ZHANG et al., 2015; MILGER et al., 2017; XU, et al., 2021).

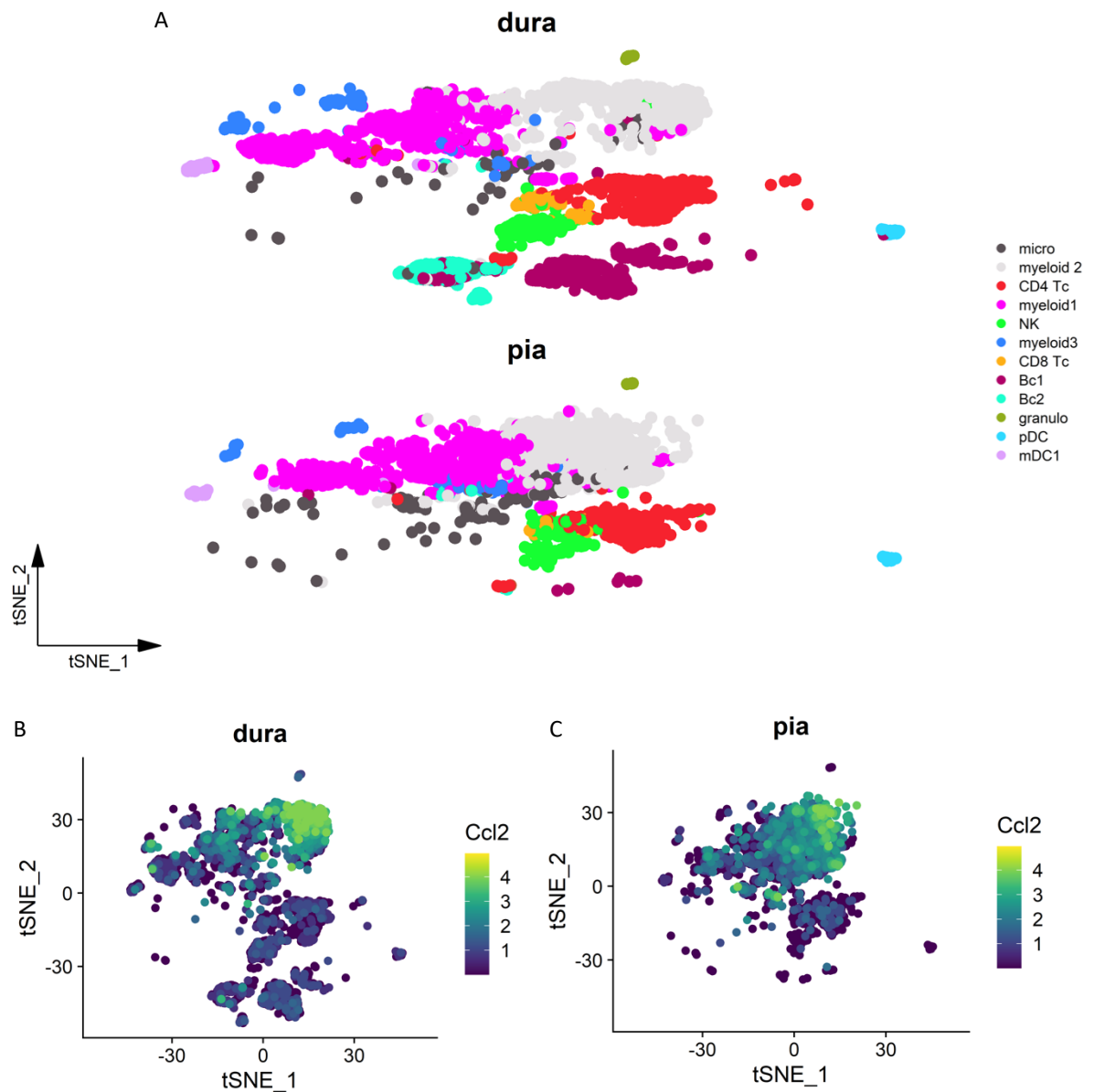
Em relação ao gene *Ccl2*, a população de células enriquecidas para a expressão dessa quimiocina foi a de mastócitos, bem como em células mieloides do agrupamento 1, sugerindo uma diversidade na sinalização de CCL2-CCR2 nas meninges (Figura 16B).

Na análise de células da meninge de ratos saudável foram identificadas 3 populações de células mieloides, nas quais foi analisado a expressão do gene da *Ccl2*. A expressão de *Ccl2* está enriquecida nas populações de células mieloides em ambas as membranas que compõem as meninges, dura-máter e pia-máter, sugerindo a possibilidade de participação dessas células na manutenção do recrutamento de células.



**Figura 16: Análise *Dotplot* e t-SNE das meninges em camundongos saudáveis.**

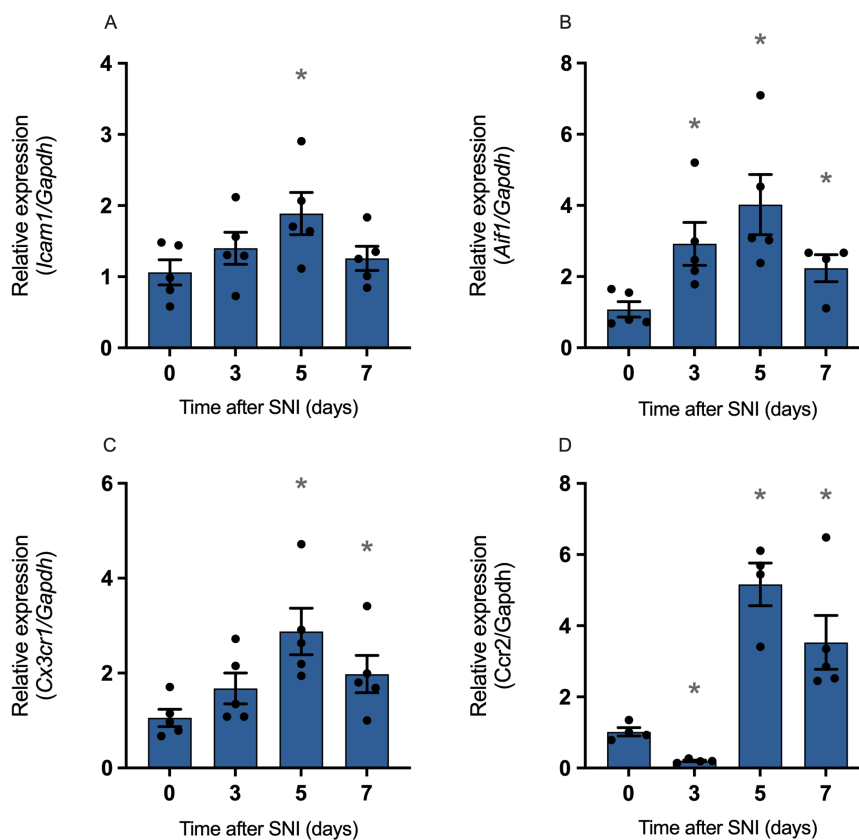
Os gráficos *dotplot* exibem a distribuição destacada de CCL2, CCR2, CSFR1, CX3CR1, LY6C2 e MS4A3 para cada população de célula indicada. Legenda: *ILC*: *Innate lymphoid cell*; *NK cells*: *Natural killer cells*; *gdTc*: *gamma-delta T cells*; *CD8Tc*: *CD8<sup>+</sup> T cells*; *CD4Tc*: *CD4<sup>+</sup> T cells*; *Bcs*: *B cells*; *myeloid*: *myeloid lineage cells*; *BcProg*: *B cells progenitors*; *cswBc*: *Class-switched B cell*; *granulo*: *granulocyte*; *granuloProl*: *Proliferating granulocyte*; *mDC*: *Myeloid dendritic cell*; *mas*: *Mast cell*; *Treg*: *Regulatory T cell*; *pDC*: *Plasmocitoid dendritic cell*.

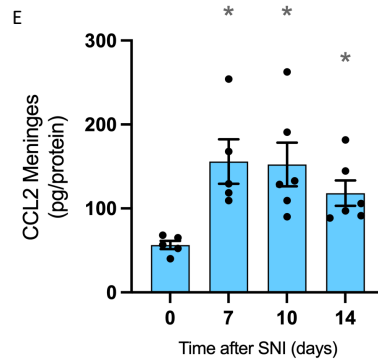


**Figura 17: Análise densitométrica por tecido das meninges em ratos saudáveis.** (A) Análise t-SNE das populações de células das meninges. (B) *Dotplot* da expressão de *Ccl2* na dura-máter. (C) *Dotplot* da expressão de *Ccl2* na pia-máter. Legenda: *micro*: microglia; *myeloid*: Myeloid cells; *CD4 Tc*:  $CD4^+$  T cells; *NK*: Natural killer cells; *CD8 Tc*:  $CD8^+$  T cells; *Bc*: B cell; *granulo*: granulocyte; *mDC*: Myeloid dendritic cell; *pDC*: Plasmocitoid dendritic cell.

A expressão de genes indicadores de lesão nas meninges também foi avaliada por RT-qPCR nos estágios iniciais de indução do modelo SNI. Os dados, como apresentados na Figura 18, sugerem um aumento na expressão de *Cx3cr1* e *Aif1* a partir do terceiro dia após a lesão neuronal SNI, indicando uma provável ativação e proliferação dos macrófagos residentes das meninges, corroborando os dados mostrados anteriormente na Figura 16 e 17. Ademais, a expressão de *Ccr2* nas meninges se apresentou diminuída em relação aos animais controle no terceiro dia após a indução do modelo, porém aumentou consideravelmente nos dias seguintes. Esses dados são consoantes ao aumento da expressão de *Icam1* (*Intercellular adhesion molecule 1*) no quinto dia após a indução do modelo SNI, uma molécula de adesão envolvida no recrutamento de células imunes para os sítios inflamatórios.

A expressão proteica de CCL2 nas meninges por imunoenensaio se apresentou aumentada ao longo do tempo após indução do modelo SNI, sugerindo a liberação dessa quimiocina para as meninges ao longo do estabelecimento da neuropatia (Figura 18E).





**Figura 18: Expressão gênica de marcadores de lesão nas meninges ao longo do decurso temporal em modelo de indução de lesão SNI.** (A) Quantificação relativa de *Icam1* ao longo de 7 dias. (B) Quantificação relativa de *Aif1* ao longo de 7 dias. (C) Quantificação relativa de *Cx3cr1* ao longo de 7 dias. (D) Quantificação relativa de *Ccr2* ao longo de 7 dias (E) Quantificação relativa de CCR2 por imunensaio ao longo de 14 dias. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EPM ( $n = 4-5$  por grupo,  $*p < 0,05$  versus tempo 0, One-way ANOVA múltiplas comparações, post-hoc Dunnett).  
 Legenda: SNI: *Spared Nerve Injury*; *Gapdh*: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *Icam1*: *Intercellular adhesion molecule 1*;

## 5. DISCUSSÃO

O estabelecimento da dor neuropática depende de um processo fisiopatológico multifatorial complexo (COLLOCA et al. 2017). Um grande número de alterações plásticas de longa duração nas vias nociceptivas já foram descritas como consequência da dor neuropática desencadeada por lesão neuronal periférica (PEIRS & SEAL, 2017). Nas últimas décadas, diversas evidências vêm sugerido que, além das respostas neuronais, a patogênese da dor neuropática envolve interações entre sistemas imune e nervoso, abrangendo todos os tecidos e órgãos que o compõem, tais como os nervos periféricos, gânglios, medula espinal e cérebro (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016; LEE, 2016).

Na interface entre inflamação e função do sistema nervoso em estados patológicos de dor, a participação leucocitária é dependente da expressão de pequenas proteínas secretadas conhecidas como quimiocinas, que ativam receptores acoplados à proteína G específicos na superfície da célula leucocitária (WHITE; FELDMAN; MILLER, 2009). Nesse contexto, os achados apresentados nesse estudo demonstram uma participação da sinalização CCL2/CCR2 no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida por lesão periférica.

Nós demonstramos que a lesão neuronal periférica aumentou a expressão de CCL2/CCR2 e que a inibição gênica dessa via levou à redução no estabelecimento da dor neuropática induzida pelo modelo SNI. Além disso, a neuropatia também aumentou a expressão de diversos genes relacionados à lesão neuronal e à ativação de macrófagos residentes no GRD e à ativação das células gliais na medula espinal. Contudo, a depleção específica de CCL2 em neurônios sensoriais não alterou significativamente o comportamento nocifensivo dos animais. Dessa forma, demonstramos que a CCL2 é expressa por outros tipos celulares que estão presentes no microambiente somatossensorial, principalmente macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> do GRD. Por fim, observamos o aumento da expressão proteica de CCL2 nas meninges acompanhado pela presença de um massivo infiltrado composto por células inflamatórias CCR2<sup>+</sup> nas meninges lombares após a lesão neuronal.

Portanto, nossos dados sugerem uma nova participação do eixo CCL2/CCR2, demonstrando um importante mecanismo de comunicação entre o GRD e as meninges lombares durante a dor neuropática induzida por lesão periférica.

Diversos estudos da literatura demonstraram a participação da via de sinalização CCL2/CCR2 na dor neuropática. Um estudo anterior sugeriu que a CCL2 poderia estar envolvida na manutenção da dor neuropática induzida por desmielinização neuronal e que a administração de antagonistas para CCR2 produziu efeitos anti-nociceptivos (JUNG et al, 2009). Além disso, outro estudo demonstrou que a CCL2 seria responsável pela dor neuropática orofacial e que a administração de antagonista para CCR2 via cisterna magna foi capaz de atenuar o fenótipo doloroso (ZHANG et al., 2012). Por fim, Illias e colaboradores (2018) demonstraram que a CCL2 e o seu receptor CCR2 estão aumentados no GRD após administração de oxaliplatina em paralelo ao desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica e a administração de anticorpo anti-CCL2 intratecal reverte o fenótipo doloroso. Nossos resultados demonstram a importância desta via, em consonância com esses achados, uma vez que o fenótipo doloroso é diminuído nos animais deficientes para a expressão de CCL2 e CCR2.

No entanto, apesar dos diversos trabalhos apontando o envolvimento da CCL2 na fisiopatologia da dor neuropática, existem controvérsias acerca da dinâmica de atuação da CCL2 nesse contexto, que contribuíram para questionamentos acerca da fonte celular presente no microambiente somatossensorial que secreta e ativa células imunes residentes ou recruta células circulantes.

Alguns trabalhos tem demonstrado a possibilidade da produção e secreção de CCL2 por neurônios. Jung e colaboradores (2009) sugeriram que a expressão de CCL2 é restrita aos GRDs lesados e que esta era empacotada em vesículas, assim como neuro-hormônios, neuropeptídeos e neurotrofinas. Além disso, tais vesículas teriam vias de secreção reguladas, que permitiam sua liberação diretamente na coluna dorsal da medula espinal, contribuindo para a inflamação local e dor após lesão neuronal periférica (VAN STEENWINCKEL et al, 2011; BIBER & BODDEKE, 2014). Adicionalmente, Kwon e colaboradores (2015) demonstraram que a utilização de anticorpo neutralizante para CCL2 via intraganglionar ou a deficiência de CCL2 foram capazes de alterar a proliferação de macrófagos ganglionares, sugerindo uma participação dos neurônios sensoriais no recrutamento de macrófagos CCR2<sup>+</sup> para o GRD.

Diante disso e utilizando-se de ferramentas genéticas, nosso trabalho mostrou que a depleção específica de CCL2 em neurônios sensoriais não-mielinizados Nav1.8<sup>+</sup> não foi capaz de modular as respostas mecânicas, motoras e térmicas nos

animais após a indução de lesão neuronal periférica SNI, sugerindo que talvez não sejam essas as células secretoras de CCL2 no GRD. Nosso trabalho também demonstrou através da análise de bancos de dados, que a produção de CCL2 no GRD está limitada aos macrófagos residentes CX3CR1<sup>+</sup> deste tecido em outros modelos de indução de lesão neuronal por esmagamento do nervo isquiático.

As controvérsias acerca da sinalização de CCL2 incluem também o mecanismo efetor via receptor CCR2. Trabalhos sugerem que a expressão de CCR2 pela micróglia residente é suficiente para o desenvolvimento de alodinia mecânica em modelo de ligação parcial do nervo isquiático. O tratamento com anticorpos neutralizantes para CCL2, por sua vez, preveniram o infiltrado de monócitos para a medula espinal e reverteu a alodinia (ZHANG et al, 2007). Komiya e colaboradores (2020), por sua vez, demonstraram em modelo de esclerose lateral amiotrófica que a expressão de CCR2 na medula espinal lombar aumenta ao longo do tempo com a progressão da doença. Ademais, os autores discutem acerca da micróglia e dos neurônios serem as principais células que expressam CCR2, bem como os monócitos CCR2<sup>+</sup> que infiltram o sistema nervoso central durante condições neuroinflamatórias e degenerativas.

Como podemos notar, todos os trabalhos relacionando a sinalização de CCL2 via seu receptor CCR2 sugerem um mecanismo de recrutamento de células leucocitárias para o parênquima dos tecidos inflamados (TAKEURA et al, 2019; SOMEBANG et al, 2021) ou ativação direta de neurônios medulares (XIE et al, 2017).

Inferências acerca da interação entre populações de macrófagos com diferentes assinaturas gênicas foram sugeridas por Montague e colaboradores (2018): a alodinia induzida por vincristina, um quimioterápico, é significativamente reduzida em animais deficientes para CX3CR1 quando tratados com antagonista para CCR2. Em adição a isso, a expressão de CCL2 e CCR2 está alterada no nervo ciático de animais deficientes para CX3CR1, um tecido já caracterizado pela existência de dois tipos de macrófagos residentes, que possivelmente estão sendo importantes para a sinalização da via CCL2/CCR2 (YDENS et al., 2020).

Trabalhos mais recentes do nosso laboratório trazem um olhar diferenciado sobre a dinâmica de sinalização CCL2/CCR2. Guimarães e colaboradores (2019) demonstraram robustas evidências de que, apesar da micróglia estar ativada e proliferar após uma lesão neuronal periférica, células hematopoiéticas periféricas (incluindo monócitos) não são capazes de infiltrar o parênquima da medula espinal



após a indução do modelo SNI. O trabalho mostrou ainda que não existe expressão de CCR2 nas células intrínsecas da medula espinal. Ademais, a deficiência de CCR2 afeta o grau de ativação e proliferação da micróglia.

O mesmo foi sugerido em outro trabalho do grupo em relação ao GRD: o número aumentado de macrófagos no GRD após a lesão neuronal periférica SNI é devido à proliferação local de macrófagos residentes CX3CR1<sup>+</sup> e não ao infiltrado de monócitos CCR2<sup>+</sup> circulantes. Em adição a isso, essa proliferação contribui para a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-nociceptivas, como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021; GUIMARÃES & SILVA et al. 2022 *under review*).

Esses achados levantam perguntas acerca do destino das células CCR2<sup>+</sup> derivadas da periferia. Nosso trabalho demonstrou por meio de microscopia confocal a presença de infiltrados inflamatórios CD45<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> nas meninges lombares dos animais submetidos à lesão neuronal periférica, além da modificação de genes relacionados à ativação de macrófagos, como *Cx3cr1* e *Aif1* e ao recrutamento de células, como *Ccr2* e *Icam1*. A análise de bancos de dados de meninges cerebrais de camundongos e ratos em condição saudável também demonstrou a presença de monócitos/macrófagos, descritos pelos autores como células mieloides, que são positivas para o gene *Ccr2*.

Nos últimos anos, o papel das meninges na homeostasia e em condições patológicas tem sido bastante discutido. Em condições homeostáticas, o parênquima do sistema nervoso central (SNC) possui poucos ou nenhum linfócito e capacidade de apresentação de antígenos menos potente em comparação com outros órgãos. No entanto, as meninges possuem diversas populações de células imunes mieloides e linfoides que influenciam o sistema nervoso a medida que condições neuroinflamatórias e degenerativas se desenvolvem (MESQUISTA; FU; KIPNIS, 2018; PAPADOPOULOS; HERZ; KIPNIS, 2020).

Os mecanismos propostos pela literatura envolvendo o recrutamento de células para as meninges são dois: a existência de vasos linfáticos nas meninges, indicando uma relevante ligação entre o SNC, por muitos anos descrito como imunoprivilegiado, e o sistema imune periférico. Esse sistema de drenagem tem sido relevante em patologias como a doença de Alzheimer, uma vez que o prejuízo no funcionamento desses vasos pode levar ao acúmulo acelerado de proteína  $\beta$ -amiloide no parênquima cerebral (LOUVEAU et al., 2018). O sistema linfático não se limita apenas as

estruturas superiores do SNC. Jacob e colaboradores (2019) demonstraram, por meio de uma tecnologia de imagem tridimensional de segmentos de coluna vertebral descalcificados e clarificados, que os vasos linfáticos vertebrais conectam os gânglios sensoriais e simpáticos em forma de circuitos metaméricos vertebrais, associados com a drenagem para os linfonodos e o recrutamento de células.

O segundo mecanismo envolve a migração de células a partir dos nichos de medula óssea do crânio e das vértebras. Um estudo sugeriu que, sob condições patológicas, tais como lesões medulares e neuroinflamação, as células mieloides infiltrantes do SNC podem se originar das bordas cerebrais e exibir assinaturas transcricionais distintas daquelas derivadas da corrente sanguínea (CUGURRA et al., 2021). Outro trabalho do mesmo grupo demonstrou que o líquido cefalorraquidiano (LCR) é capaz de acessar esses nichos através de canalículos formados pela dura-máter no interior do crânio. Após lesão medular, as proteínas presentes no LCR promovem mielopoiese e a saída de células mieloides para as meninges a partir desses canalículos (MAZZITELLI et al., 2022).

Mais recentemente, Mollgard e colaboradores (2023) descreveram a existência de uma quarta camada meníngea, a membrana linfática subaracnóidea, que compartimentaliza o espaço subaracnóideo em cérebros humanos e de camundongos. Essa membrana é morfológica e imunotipicamente similar às membranas mesoteliais em órgãos periféricos e cavidade corporais. Essa membrana permite a passagem de solutos de mais de 3kDa e hospeda uma grande população de células mieloides, cujo número aumenta em resposta a inflamação e ao envelhecimento. Dessa forma, essa membrana representa um nicho posicionado de forma ideal para a vigilância do LCR.

Nosso trabalho demonstrou que o recrutamento de células nas meninges lombares também é relevante no contexto da dor neuropática e que isso se dá pela presença de CCL2 sendo secretadas nas meninges. Em consonância com nosso estudo, um trabalho recente do nosso grupo demonstrou a presença de células imunes nas leptomeninges participando de outros processos fisiopatológicos da neuropatia (MAGANIN et al, 2022).

Nossos dados parecem indicar uma participação dos macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> do GRD na secreção parácrina de CCL2 para as leptomeninges que o envolvem, promovendo assim, o recrutamento de células CCR2<sup>+</sup> para o interior do espaço subaracnóideo. Pretendemos evoluir o trabalho utilizando-se de depleções

específicas do gene *Cc/2* em células imunes circulantes e residentes por meio de ferramentas genéticas, bem como em astrócitos e micróglia a fim de validar as proposições sugeridas aqui. Diante dessas considerações, o mecanismo proposto precisa ser melhor investigado.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando as controvérsias existentes na literatura acerca da sinalização via CCL2, nosso estudo sugere uma nova dinâmica no entendimento do recrutamento de células para o sistema nervoso somatossensorial após a indução de neuropatia. A participação das meninges espinais como importante sítio de modulação da dor neuropática através da dinâmica leucocitária nos indica um papel crucial de quimiocinas como a CCL2 como alvo terapêutico.

Assim, concluímos que a CCL2 contribui para o desenvolvimento da dor neuropática, atuando como agente quimiotático de leucócitos para as leptomeninges lombares, aumentando o estado inflamatório na dor neuropática.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADIE, C. Chemokines, chemokine receptors and pain. **TRENDS in Immunology**, v. 26, n. 10, p. 529-534, 2005.

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

ALBAYAR, A. A. et al. Biomarkers in spinal cord injury: prognostic insights and future potentials. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 27, 2019.

AVRAHAM, O. et al. Profiling the molecular signature of satellite glial cells at the single cell level reveals high similarities between rodents and humans. **Pain**, v. 00, p. 1-17, 2022.

AVRAHAM, O. et al. Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. **Nature Communications**, v. 11, p. 4891, 2020.

AYE-MON, A. et al. Ccr2 upregulation in drg neurons plays a crucial role in gastric hyperalgesia associated with diabetic gastropathy. **Molecular Pain**, v. 14, 2018.

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

BIBER, K.; BODDEKE, E. Neuronal CC chemokines: the distinct roles of CCL21 and CCL2 in neuropathic pain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 210, p. 1-10, 2014.

BROXMEYER, H. E.; COOPER, S. H.; ROPA, J. CXCL15/lungkine has suppressive activity on proliferation and expansion of multi-potential, erythroid, granulocyte and macrophage progenitors in S-phase specific manner. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 91, p. 102594, 2021.

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

CARR, M. W. et al. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 9, p. 3652-3656, 1994.

CHABAN, V. V. Peripheral sensitization of sensory neurons. **Ethnicity & Disease**, v. 20, 2010.

COELHO, A. L. et al. The chemokine CCL6 promotes innate immunity via immune cell activation and recruitment. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5474-5482, 2007.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic Pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17002, p. 1-20, 2017.

CONTI, G. et al. Macrophage infiltration and death in the nerve during the early phases of experimental diabetic neuropathy: a process concomitant with endoneurial induction of IL-1 $\beta$  and p75NTR. **Journal of the Neurological Sciences**, 2002.

CUGURRA, A. et al. Skull and vertebral bone marrow are myeloid cell reservoirs for the meninges and CNS parenchyma **Science**, v. 372, n. 6553, p. eabf7844, 2021.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

DE VLAMINCK, K. et al. Differential plasticity and fate of brain-resident and recruited macrophages during onset and resolution of neuroinflammation. **Immunity**, v. 55, p. 1-18, 2022.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, 2000.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2017.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

EDDY, N. B. LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 385-393, 1953.

EVERS, T. M. J. Single-cell analysis reveals chemokine-mediated differential regulation of monocyte mechanics. **iScience**, v. 25, n. 1, p. 103555.

FOX, J. M. et al. CXCL4/platelet factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9466, 2018.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, v. 16, p. 1248-1257, 2010.

GÓMEZ-NICOLA, D. et al. Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. **Journal of Neurochemistry**, 2008.

GUIMARÃES, R. M. et al. Frontline Science: Blood-circulating leukocytes fail to infiltrate the spinal cord parenchyma after spared nerve injury. **Journal of Leukocyte Biology**, p. 1-11, 2019.

GUIMARÃES, R. M. et al. Sensory neuron-associated macrophages proliferate in the sensory ganglia after peripheral nerve injury in a CX3CR1 signaling dependent manner. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.22.485276v1>.

HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 16, p. 2944-2971, 2018.

IASP. IASP announces revised definition of pain. **International Association for the Study of Pain**, 2022. <https://www.iasp-pain.org/publications/iasp-news/iasp-announces-revised-definition-of-pain/>.

ILLIAS, A. M. et al. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the dorsal root ganglion contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. **Pain**, v. 159, n. 7, p. 1308-1316, 2018.

JACOB, L. et al. Anatomy and function of the vertebral column lymphatic network in mice. **Nature Communications**, v. 10, n. 4594, 2019.

JI, R. R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 533-548, 2014.

JUNG, H. et al. Visualization of chemokine receptor activation in transgenic mice reveals peripheral activation of CCR2 receptors in states of neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8051-8062, 2009.

KIERDORF, K.; MASUDA, T.; JORDÃO, M. J. C.; PRINZ, M. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, p. 547-562, 2019.

KIGUCHI, N. et al. Pharmacological regulation of neuropathic pain driven by inflammatory macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

KIGUCHI, N. et al. The critical role of invading peripheral macrophage-derived interleukin-6 in vincristine-induced mechanical allodynia in mice. **European Journal of Pharmacology**, 2008.

KOLLER, G. et al. ADAM8/MS2/CD156, an emerging drug target in the treatment of inflammatory and invasive pathologies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 20, p. 2272-2281, 2009.

KOMIYA, H. et al. CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as, infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice. **Molecular Brain**, v. 13, n. 64, 2020.

KWON, M. J. et al. CCL2 mediates neuron-macrophage interactions to drive proregenerative macrophage activation following preconditioning injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 48, p. 15934-15947, 2015.

LANDY, M. A. et al. Loss of Prdm12 during development, but not in mature nociceptors, causes defects in pain sensation. **Cells Reports**, v. 34, n. 13, p. 108913, 2021.]

LATRAGNA, A. et al. Prdm12 modulates pain-related behavior by remodeling gene expression in mature nociceptors. **Pain**, v. 163, n. 8, p. e927-e941, 2022.

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

LEAN, J. M. et al. CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 87, n. 4, p. 386-393, 2002.

LEE, S. **Microglia and macrophages in different types of chronic pain**. 2016. 187 f. Thesis (Dental Sciences) – Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, 2016.

LI, Y. et al. Chemokines CCL2, 3, 14 stimulate macrophage bone marrow homing, proliferation, and polarization in multiple myeloma. **Oncotarget**, v. 6, n. 27, p., 24218-24229, 2015.

LI, Y.; WU, J.; ZHANG, P. CCL15/CCR1 axis is involved in hepatocellular carcinoma cells migration and invasion. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4501-4507, 2016.

LIU, L; DUFF, K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. **Journal of Visualized Experiments**, v. 21, n. e960, p. 2008.

LIU, Z. et al. Fate mapping via Ms4a3-expression history traces monocyte-derived cells. **Cell**, v. 178, n. 6, p.1509-1525, 2019.

LOUVEAU, A. et al. CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1380-1391, 2018.

LOWRY, D. B.; MAKKER, P. G. S.; TAYLOR, G. M. Cutaneous neuroimmune interactions in peripheral neuropathic pain states. **Frontiers of Immunology**, v. 12, n. 12, p. 660203, 2021.

MAEDA, T. et al. Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009.

MAGANIN, A. G. et al. Meningeal dendritic cells drive neuropathic pain through elevation of the kynurenine metabolic pathway in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 23, 2022.

MARSH, S. `_scCustomize`: custom visualizations & functions for streamlined analyses of single cell sequencing\_. R package version 1.1.0, 2022. <https://CRAN.R-project.org/package=scCustomize>.



MAZZITELLI, J. A. et al., Cerebrospinal fluid regulates skull bone marrow niches via direct access through dural channels. **Nature Neuroscience**, v. 25, n. 5, p. 555-560, 2022.

MENG, J. et al. CCL23 suppresses liver cancer progression through the CCR1/AKT/ESR1 feedback loop. **Cancer Science**, v. 112, n. 8, p. 3099-3110, 2021.

MESQUITA, S. da; FU, Z.; KIPNIS, J. The meningeal lymphatic system: a new player in neurophysiology. **Neuron**, v. 100, n. 2, p. 375-388, 2018.

MILGER, K. et al. Pulmonary CCR2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are immune regulatory and attenuate lung fibrosis development. **Thorax**, v. 72, n. 11, p. 1007-1020, 2017.

MILLIGAN, E. D. et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 2294-2302, 2004.

MOLLGARD, K. et al. A mesothelium divides the subarachnoid space into functional compartments. **Science**, v. 379, n. 6627, p. 84-88, 2023.

MONTAGUE, K. et al. A novel interaction between CX3CR1 and CCR2 signalling in monocytes constitutes an underlying mechanism for persistent vincristine-induced pain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 101, p. 2-15, 2018.

NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, 2012.

PAPADOPOULOS, Z.; HERZ, J.; KIPNIS, J. Meningeal lymphatics: from anatomy to central nervous system immune surveillance. **Journal of Immunology**, v. 204, n. 2, p. 286-293, 2020.

PEI, L. et al. Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. **British Journal of Anaesthesia**, v. 107, n. 6, p. 948-958, 2011.

PEIRS, C. & SEAL, R. P. Neural circuits for pain: recent advances and current views. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 578-584, 2017.

R Core Team. R: language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing), 2020.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 217-242, 2000.

SCHAFFLICK, D. et al. Single-cell profiling of CNS border compartment leukocytes reveals that B cells and their progenitors reside in non-diseased meninges. **Nature Neuroscience**, v. 24, p. 1225-1234, 2021.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, 2008.

SEO, S. U. et al. Intestinal macrophages arising from CCR2<sup>+</sup> monocytes control pathogen infection by activating innate lymphoid cells. **Nature communications**, v. 6, n. 8010, 2015.

SHECHTER, R. et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus, **Immunity**, 2013.

SHIELDS, S. D. et al. Nav.1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system. **Pain**, 2012.

SHOUMAN, K.; BENARROCH, E. E. Peripheral neuroimmune interactions: selected reviews and some clinical implications. **Clinical Autonomic Research**, v. 31, n. 4, p. 477-489, 2014.

SILVA, C. E. A.; GUIMARÃES, R. M. CUNHA, T. M. Sensory neuron-associated macrophages as novel modulators of neuropathic pain. **Pain Reports**, v. 6, n. 1, p. e873, 2021.

SIMATS, A. et al. CCL23: a new CC chemokine involved in human brain damage. **Journal of Internal Medicine**, v. 283, n. 5, p. 461-475, 2018.

SIMON, L. S. et al. The Jak/STAT pathway: a focus on pain in rheumatoid arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 51, n. 1, p. 278-284, 2021.

SOMEBANG, K. et al. CCR2 deficiency alters activation of microglia subsets in traumatic brain injury. **Cell Reports**, v. 36, n. 12, p. 109727, 2021.

SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. **Neurotherapeutics**, 2009.

STIRLING, L. C. et al. Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous Nav1.8-Cre recombinase mice. **Pain**, v. 113, n. 1-2, p. 27-36, 2005.

STUART, T. et al. Comprehensive integration of single-cell data. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1888-1902 e21, 2019.

TAKEURA, N. et al., Role of macrophages and activated microglia in neuropathic pain associated with chronic progressive spinal cord compression. **Scientific Reports**, v. 9, p. 15656, 2019.

TANEGASHIMA, K. et al. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. **FEBS Letter**, v. 587, n. 12, p. 1731-1735, 2013.

TANSLEY, S. et al. Single-cell RNA sequencing reveals time- and sex-specific responses of mouse spinal cord microglia to peripheral nerve injury and links ApoE to chronic pain. **Nature Communications**, v. 13, p. 843, 2022.

THACKER, M. A. CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 3, p. 263-272, 2009.

VAN STEENWINCKEL, J. et al. CCL2 released from neuronal synaptic vesicles in the spinal cord is a major mediator of local inflammation and pain after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 15, p. 5865-5875, 2011.

VAN STEENWINCKEL, J. et al. Stromal cell-derived CCL2 drives neuropathic pain states through myeloid cell infiltration in injured nerve. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 45, p. 198-210, 2015.

VARELA, M. L. et al. Acute inflammation and metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, 2018.

WEIERGRABER, O. H. et al. Structure and dynamics of human chemokine CCL16 – implications for biological activity. **Biomolecules**, v. 12, n. 11, p. 1588, 2022.

WHEELER, M. A. et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. **Nature**, v. 578, p. 593-599, 2020.

WHITE, F. A.; FELDMAN, P.; MILLER, R. J. Chemokine signaling and the management of neuropathic pain. **Molecular Interventions**, v. 9, n. 4, p. 188-195, 2009.

WHITE, F. A.; JUNG, H.; MILLER, R. J. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20151-20158, 2007.

WICKHAM, H. ggplot2: elegant graphics for data analysis (Springer Verlag), 2016.

WU, X. B.; ZHU, Q.; GAO, Y. J. CCL2/CCR2 contributes to the altered excitatory-inhibitory synaptic balance in the nucleus accumbens shell following peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **Neuroscience Bulletin**, v. 37, n. 7, p. 921-933, 2021.

XIE, R. G. et al. Spinal CCL2 promotes central sensitization, long-term potentiation, and inflammatory pain via CCR2: further insights into molecular, synaptic, and cellular mechanisms. **Neuroscience Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 13-21, 2018.

XU, L. L. et al. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, n. 3, p. 365-371, 1996.

XU, P. et al. Recruitment of  $\gamma\delta$  T cells to the lesion via the CCL2/CCR2 signaling after spinal cord injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 64, 2021.

XU, X. et al. Annexin A1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization via FPR2/ALX- dependent AMPK-mTOR pathway. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 119, 2021.

XU, Z. Z. et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nature Medicine**, v. 16, p. 592-597, 2010.

YDENS, E. et al. Profiling peripheral nerve macrophages reveals two macrophage subsets with distinct localization, transcriptome and response to injury. **Nature Neuroscience**, v. 23, p. 676-689, 2020.

YIM, A. K. Y. et al. Disentangling glial diversity in peripheral nerves at single-nuclei resolution. **Nature Neuroscience**, v. 25, p. 238-251, 2022.

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

ZHANG, Y. et al. CCR2<sup>+</sup> inflammatory dendritic cells and translocation of antigen by type III secretion are required for the exceptionally large CD8<sup>+</sup> T cell response to the protective YopE69-77 epitope during Yersinia infection. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005167, 2015.

ZHANG, Z. J. et al. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the medullary dorsal horn are involved in trigeminal neuropathic pain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 136, p. 1-13, 2012.

ZHOU, Y. Q. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 141, 2016.

ZHU, X. 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. **Journal of Pain**, v. 15, n. 5, p. 516-526, 2014.