

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

Fabio Bonifacio de Andrade

**Papel do sensor de DNA citoplasmático, STING, no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida por cisplatina**

RIBEIRÃO PRETO  
2023

Fabio Bonifacio de Andrade

**Papel do sensor de DNA citoplasmático, STING, no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida por cisplatina**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação do departamento de 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

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

Andrade, Fabio Bonifacio de

Papel do sensor de DNA citoplasmático, STING, no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida por cisplatina. Ribeirão Preto, 2023.

102 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Thiago Mattar Cunha.

Palavras chave: 1. Quimioterápico. 2. Dor Crônica. 3. Nociceptores. 4. Interleucina 6. 5. Receptores de Reconhecimento de Padrão

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabio Bonifacio de Andrade

### **Papel do sensor de DNA citoplasmático, STING, no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida por cisplatina**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação do departamento de 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

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

Prof. Dr.(a) : \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr (a) : \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE DOR E INFLAMAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COM AUXÍLIO DA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP - PROCESSO 2021/09854-9) DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) E DO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ).

*Agradecimentos*

Agradeço,

Agradeço primeiramente aos meus pais Augustinho Pereira de Andrade e Tânia Bonifacio de Andrade bem como minha irmã Camila Bonifacio de Andrade pelo apoio e incentivo, principalmente no início do percurso acadêmico, no qual foi imprescindível para meu ingresso e permanência ao doutorado.

À todos professores que de alguma forma me ensinaram e auxiliaram meu desenvolvimento acadêmico.

Ao professor Dr. Thiago Mattar Cunha, por permitir que fizesse parte de seu grupo de pesquisa e pelos momentos de ensinamentos e discussões científicas.

Ao professor Temugin Berta da Universidade de Cincinnati, pela valiosa e importante colaboração com este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo, permitindo que me dedicasse exclusivamente a pesquisa, e financiamento do projeto.

À banca de qualificação, Luís Osório Silveira Leiria, Carlos Artério Sorgi e Arthur Rocha Gomes, pela disponibilidade e atenção bem como pelas contribuições valiosas.

Aos professores componentes desta banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

A secretária do programa de Farmacologia, Gislaine Pedroso, sempre muito competente e disponível para resolução das dúvidas relacionadas a pós-graduação.

Aos técnicos do laboratório de dor e inflamação: Sérgio Rosa; Kátia dos Santos; Diva Amábile; Marcela Daruge; Vânia Fernandez.

Em particular os colegas: Beatriz Adjafre; Isadora Marques; Samara Damasceno; Alexandre Maganim; Glauce Pigatto; Gabriel Victor; Atlante Mendes e todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A Amanda Leite, pelo companheirismo, amor, amizade e apoio tornando a jornada mais leve e especial.

Aos amigos queridos que dividi moradia: Leonardo Lima e Danilo Augusto, pelos momentos de descontração, apoio, companheirismo, discussões, tornando a trajetória leve.



*Resumo*

ANDRADE, F. B. **Papel do Sensor de DNA Citoplasmático, STING, no Desenvolvimento e Manutenção da Dor Neuropática Induzida por Cisplatina.** Tese de Doutorado - Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2023.

A dor neuropática induzida por cisplatina (DNIC) é um efeito adverso comum experimentado por pacientes com câncer submetidos a terapêutica com cisplatina. Essa condição afeta a qualidade de vida e pode persistir mesmo após o término do tratamento. Associado a baixa eficácia das terapêuticas vigentes para o manejo da dor neuropática, a busca por novos alvos moleculares passíveis de intervenção farmacológica se faz necessária. Nesse sentido, evidências emergentes associam o envolvimento da disfunção mitocondrial com o desenvolvimento de neuropatia induzida por cisplatina; ademais, já foi demonstrado que a cisplatina provoca o escape citoplasmático de DNA mitocondrial (mtDNA) em células renais. Portanto, hipotetizamos que o dano mitocondrial induzido por cisplatina em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (GRD) poderia induzir a ativação do estimulador de genes de interferon (STING). O STING é um sensor de DNA citoplasmático que reconhece dinucleotídeos cíclicos anormalmente presentes no citoplasma celular que podem ser produzidos em resposta a ativação do GMP-AMP cíclico sintase (cGAS). A Ativação de STING promove a ativação de fatores de transcrição que levam a indução da expressão de genes associados a citocinas inflamatórias, como intérferons do tipo I, fator de necro tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do STING no desenvolvimento e manutenção da DNIC. Inicialmente, observamos que o tratamento com cisplatina foi capaz de induzir o aumento de DNA dupla fita no citoplasma das células do GRD de camundongos, como indicativo de injúria mitocondrial. Além disso, a expressão de STING foi observada em diferentes populações neuronais do GRD de camundongos. Notavelmente, foi observado que camundongos incapazes de sintetizar STING (STING GT) submetidos a DNIC apresentaram redução da hipersensibilidade nociceptiva mecânica ao longo dos dias quando comparado a animais selvagens. De maneira complementar, camundongos selvagens submetidos ao modelo de DNIC associado a administração sistêmica de antagonista de STING (C-176) também foram protegidos. Adicionalmente, camundongos cGAS<sup>-/-</sup> foram similarmente protegidos contra o desenvolvimento de DNIC. Para determinar o tipo celular no qual a expressão de STING seria determinante para o fenótipo observado, geramos animais em que o STING foi seletivamente deletado em nociceptores. Interessantemente, estes animais também apresentaram redução da hipersensibilidade nociceptiva mecânica ao longo dos dias quando comparado a animais controle. A análise da expressão aumentada de citocinas revelou aumento tão somente de IL-6 no GRD de camundongos selvagens submetidos às injeções de cisplatina, mas não no GRD de camundongos STING GT. Nesse contexto, foi visto que camundongos IL-6<sup>-/-</sup> são também protegidos contra o desenvolvimento de DNIC. A cultura primária de neurônios sensitivos do GRD estimulados com agonista de STING, CAY10748, revelou expressão aumentada de IL-6 nestas células. Em conjunto, nossos dados mostram que o STING expresso em nociceptores do GRD de camundongos é determinante para o desenvolvimento da DNIC. Ademais, demonstramos que a ativação de STING em resposta ao tratamento com cisplatina ocorre possivelmente as custas da injúria mitocondrial com conseqüente escape citoplasmático de mtDNA e que a atuação de STING se dá através da indução de IL-6 nos próprios nociceptores. Em suma, nossos dados demonstram que o STING expresso em nociceptores desempenha um papel pró-nociceptivo no contexto da DNIC e representa um possível alvo a ser explorado para o tratamento da dor neuropática.

**Palavras-chave:** Quimioterápico; Dor Crônica; Nociceptores; Interleucina 6; Receptores de Reconhecimento de Padrão.

*Abstract*

ANDRADE, F. B. **Role of cytoplasmic DNA sensor, STING, on development and maintenance of neuropathic pain Induced by cisplatin.** Thesis (PhD). Department of Pharmacology of Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo - Ribeirao Preto, SP, 2023.

Cisplatin-induced neuropathic pain (CINP) is a common and serious side effect experienced by cancer patients receiving cisplatin treatment. This condition can impact quality of life and can persist even though the therapy is over. Associated with the low efficacy of current therapies for neuropathic pain management, the search for new molecular targets for pharmacological intervention is essential. In this context, emerging evidence associates the involvement of mitochondrial dysfunction with the development of cisplatin-induced neuropathy; moreover, it was seen that cisplatin treatment can induce leakage of mitochondrial DNA (mtDNA) to the cytoplasm in kidney cells. Therefore, we hypothesized that cisplatin-induced mitochondrial damage in sensory neurons of the dorsal root ganglia (DRG) could promote the activation of interferon gene stimulator (STING) to induce CINP. STING is a cytoplasmic DNA sensor that recognizes cyclic dinucleotides abnormally present in the cell cytoplasm which can be produced in response to the activation of cyclic GMP-AMP synthase (cGAS). The activation of STING promotes the activation of transcription factors that induces the expression of genes associated with inflammatory cytokines, such as type I interferons, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6). Thus, the aim of this study was to evaluate the role of STING in the development and maintenance of CINP. Firstly, we observed that cisplatin treatment was able to induce increased quantification of double-stranded DNA in the cytoplasm of mouse DRG cells, as an indicative of mitochondrial dysfunction. Furthermore, STING expression was observed in different neuronal populations of mouse DRG. Notably, it was seen that mice lacking STING (STING<sup>GT</sup>) submitted to CINP showed a reduction in mechanical nociceptive hypersensitivity over the days when compared to wild-type (WT) mice. In addition, WT mice submitted to the CINP model and injected with systemic administration of STING antagonist (C-176) were also protected. Additionally, cGAS<sup>-/-</sup> mice were similarly protected against the development of CINP. To determine the cell type in which STING expression is necessary for the observed phenotype, we generated animals in which STING was selectively deleted in nociceptors. Remarkably, these animals also showed a reduction in mechanical nociceptive hypersensitivity over the days when compared to control group. Analysis of the increased expression of cytokines revealed an increase in IL-6 in the DRG of WT mice submitted to cisplatin injections, but not in the DRG of STING<sup>GT</sup> mice. In this context, it was seen that IL-6<sup>-/-</sup> mice are also protected against the development of CINP. Primary culture of DRG sensory neurons stimulated with STING agonist, CAY10748, showed increased expression of IL-6 in these cells. Taken together, our data show that STING expressed in DRG nociceptors of mice is necessary for the development of CINP. Furthermore, we demonstrated that activation of STING in response to cisplatin treatment is due to mitochondrial injury with the cytoplasmic escape of mtDNA and STING acts through the induction of IL-6 in the nociceptors. In summary, our data demonstrate that STING expressed in nociceptors plays a pro-nociceptive role for CINP and represents a possible target to be explored for the treatment of neuropathic pain.

**Key Words:** Chemotherapy; Chronic Pain; Nociceptors; interleukin 6; Pattern Recognition Receptors.

## *Lista de Ilustrações*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Ilustração 1</b> - Via de ativação e sinalização cGAS-STING.....	34
<b>Ilustração 2</b> - Representação do modelo experimental de dor neuropática induzida por cisplatina.....	43
<b>Ilustração 3</b> - Modelo esquemático acerca da ativação da via cGAS-STING em nociceptores de camundongos submetidos ao tratamento com cisplatina.....	90





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Expressão do sensor STING em diferentes subpopulações de neurônios sensitivos.....	54
<b>Figura 2</b> - Hibridização in situ da expressão de STING em neurônios sensitivos.....	55
<b>Figura 3</b> - Quantificação de DNA dupla fita no GRD de camundongos.....	56
<b>Figura 4</b> - Expressão de STING e cGAS no GRD e medula espinal após administração de cisplatina.....	56
<b>Figura 5</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos WT e STING GT submetidos a DNIC.....	59
<b>Figura 6</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos submetidos a DNIC tratados com C-176.....	60
<b>Figura 7</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos PIRT <sup>CRE</sup> STING <sup>loxP</sup> submetidos a DNIC.....	61
<b>Figura 8</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos Nav1.8 <sup>CRE</sup> STING <sup>loxP</sup> submetidos a DNIC.....	63
<b>Figura 9</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em animais cGAS <sup>-/-</sup> submetidos a DNIC.....	64
<b>Figura 10</b> - Análise da expressão aumentada de citocinas no sistema somatossensorial de animais tratados com cisplatina.....	65
<b>Figura 11</b> - Avaliação da expressão de IL-6 e TNF $\alpha$ no GRD de animais selvagens e STING GT.....	66
<b>Figura 12</b> - Avaliação da expressão de marcadores gliais na medula espinal de camundongos tratados com cisplatina.....	67
<b>Figura 13</b> - Avaliação de infiltrado de leucócitos no GRD de camundongos.....	68
<b>Figura 14</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos selvagens e IL-6 <sup>-/-</sup> .....	70
<b>Figura 15</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos selvagens e IFNAR <sup>-/-</sup> .....	71
<b>Figura 16</b> - Administração intraplantar do agonista CAY10748 gera dor em camundongos.....	72
<b>Figura 17</b> - Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos após administração intraplantar de CAY10748.....	73

**Figura 18** - Avaliação da expressão de citocinas em cultura primária de neurônios sensitivos estimulados com CAY10748.....74

*Sumário*

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>23</b>
1.1 Dor Crônica.....	23
1.2 Dor Neuropática.....	24
1.3 Dor neuropática induzida por cisplatina (DNIC).....	25
1.4 Fisiopatologia da DNIC.....	26
1.5 Quadro Clínico da neuropatia induzida por cisplatina.....	30
1.6 Tratamento da DNIC.....	31
1.7 Receptores de reconhecimento de padrão e sensor STING.....	32
1.8 Envolvimento do Sensor STING na dor crônica.....	36
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
<b>3. Métodos.....</b>	<b>42</b>
3.1 Animais.....	42
3.2 Drogas.....	43
3.3 Modelo experimental de dor neuropática induzida por cisplatina.....	43
3.4 Avaliação do comportamento nociceptivo.....	44
3.5 Avaliação da expressão gênica.....	45
3.6 Hibridização <i>in situ</i> .....	48
3.7 Citometria de fluxo.....	49
3.8 Cultura primária de neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal.....	50
3.9 Re-análise de dados de sequenciamento de <i>single-nuclei RNAseq</i> .....	52
3.10 Quantificação de RNA dupla fita no citosol de células do GRD.....	53
3.11 Análise estatística.....	53
<b>4. Resultados.....</b>	<b>55</b>
4.1 O sensor STING está expresso em nociceptores de camundongos.....	55
4.2 A cisplatina induz aumento de DNA dupla fita no citosol de células do gânglio da raiz dorsal de camundongos.....	56
4.3 O tratamento com cisplatina não altera a expressão do sensor STING.....	57
4.4 O sensor STING está envolvido no desenvolvimento e manutenção da DNIC.....	58

4.5 O STING expresso em neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal está envolvido no desenvolvimento e manutenção da DNIC.....	61
4.6 cGAS está envolvido no desenvolvimento e manutenção da DNIC.....	64
4.7 A cisplatina induz a expressão aumentada de citocinas inflamatórias que são <i>downstream</i> à ativação do sensor STING em animais selvagens mas não em camundongos IL-6 <sup>-/-</sup> .....	65
4.8 A cisplatina não induz ativação ou proliferação microglial e astrogliãl.....	68
4.9 Cisplatina não induz a migração de leucócitos para o gânglio da raiz dorsal de camundongos.....	69
4.10 Camundongos deficientes de IL-6, mas não deficientes para o receptor de interferons do tipo I, são protegidos da DNIC.....	70
4.11 A administração de agonista de STING promove dor em camundongos selvagens mas não em camundongos IL-6 <sup>-/-</sup> .....	72
4.12 CAY10748 induz a expressão aumentada de IL-6 em neurônios sensitivos de camundongos.....	74
<b>5. Discussão.....</b>	<b>77</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>93</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>95</b>

## ***Introdução***

## **1. Introdução**

### **1.1 Dor crônica**

De uma maneira geral, a sensação de dor é um mecanismo de alerta do organismo saudável, a qual indica a presença de um estímulo nocivo e que aciona respostas protetoras apropriadas (JULIUS, BASBAUM, 2001). Ao contrário dos sentidos como visão e audição, que dependem da ativação de áreas agrupadas do encéfalo, a sensação de dor acontece através da comunicação entre uma rede de neurônios complexa e adaptativa, que envolve várias áreas encefálicas de uma maneira multidimensional, como descrita na teoria da neuromatriz de Ronald Melzack (MELZACK, 2001). A dor é uma das funções mais importantes da evolução, dessa maneira, o funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais.

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês: International Association for the Study of Pain, IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a um dano tecidual real ou potencial<sub>[GP2]</sub>” (RAJA et al., 2020). Esta definição enfatiza que a dor é uma experiência complexa que inclui a cognição, a sensação e a emoção em sua percepção (MELZACK, 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001). Entretanto, em condições patológicas, este sistema pode se tornar sensibilizado, tendo como resultado o desenvolvimento de dor crônica (COLLOCA et al., 2017; FINNERUP et al., 2021).

A dor crônica pode ser classificada em diferentes tipos: dor inflamatória; dor provocada por câncer e dor neuropática (DWORKIN et al., 2010; KALSO et al., 2004). A tendência é preocupar-se com a dor crônica como sendo apenas um sintoma e geralmente

tornar o seu tratamento paliativo, quando na verdade, ela é a própria doença. Desta maneira, está claro que melhorar o tratamento para esta condição deve ser uma importante prioridade da área da saúde.

## **1.2 Dor Neuropática**

A dor neuropática é um tipo específico de dor crônica causada por lesão ou doença do sistema somatosensorial, podendo ser de origem central ou periférica (LOESER; TREEDE, 2008). Esta condição pode resultar de uma gama de doenças e disfunções que incluem lesões traumáticas; por secção de nervo; diabetes; infecção por agentes microbianos como o vírus do herpes zoster 1 (HSV-1); pelo tratamento com fármacos quimioterápicos; entre outros (COHEN e MAO, 2014; WOOLF e MANNION, 1999).

A dor neuropática pode ser espontânea e continuar sem a estimulação externa, sendo muitas vezes sentida como queimação, formigamento ou dor em pontadas. Ela também pode ser evocada por estímulos inócuos (alodinia) e, nesse caso, até mesmo vestir roupas ou tocar em superfícies frias pode gerar uma sensação de dor. A dor neuropática também pode gerar hiperalgesia, quando a exposição a estímulos nocivos resulta em uma sensação de dor mais forte do que antes da lesão (JI; WEN, 2006; COLLOCA et al., 2017). Estes sintomas surgem como resultado da sensibilização periférica e central, que se caracterizam por mudanças plásticas que modificam o desempenho da via nociceptiva, aumentando e prolongando a resposta aos estímulos periféricos (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Atualmente, acredita-se que cerca de 15 - 25% dos indivíduos que apresentam dor crônica possuam também dor neuropática, sendo que a prevalência é majoritária em indivíduos acima de 50 anos, afetando predominantemente os membros inferiores (MILLS et al., 2006 e BOUHASSIRA et al., 2008).



### **1.3 Dor neuropática induzida por cisplatina (DNIC)**

Uma das causas mais comuns que levam ao desenvolvimento de dor neuropática é a neurotoxicidade através da terapia com fármacos quimioterápicos (COLLOCA et al., 2017). De fato, aproximadamente 68% dos pacientes que realizam quimioterapia desenvolvem sintomas relacionados à neuropatia periférica dentro do primeiro mês de tratamento, seja por dose única ou por aplicação de doses cumulativas (STAROBOVA e VETTER, 2017). Adicionalmente, vale dizer que as altas taxas de sucesso observadas a partir da terapêutica com essas drogas no combate ao câncer refletem no aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes, acarretando, conseqüentemente, no aumento do número de indivíduos com dor neuropática, isso porque a conclusão do tratamento não garante a regressão do processo neuropático (ZHOU et al., 2020). Na prática, cerca de 20 a 30% dos sobreviventes ao câncer continuam a apresentar disfunção do sistema somatossensorial, podendo esta condição tornar-se irreversível (STARABOVA e VETTER, 2017; ZHOU et al., 2020).

Existem seis classes principais de fármacos quimioterápicos que estão envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática, são elas: os alcalóides de vinca (vincristina e vimblastina), epotilonas (ixabepilona), inibidores de proteassoma (bortezomibe), imunomoduladores (talidomida), taxanos (paclitaxel) e platinas (oxaliplatina, cisplatina) (STARABOVA e VETTER, 2017).

A cisplatina – listado no rol de medicamentos essenciais estruturado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) – foi introduzida efetivamente na década de 1970 como droga anticâncer (CALLS et al., 2020). Desde então, o uso de quimioterápicos platínicos ganhou destaque na rotina clínica devido ao seu amplo espectro de eficácia contra inúmeros tipos de tumores sólidos, especialmente cânceres de ovário, bexiga e de testículo (ALAE DINI

et al., 2008). De fato, estima-se que cerca de 50 – 70% dos pacientes com câncer sejam tratados com essas drogas derivadas de metais pesados (DYSON e SAVA, 2006).

O efeito terapêutico da cisplatina aumenta de maneira diretamente proporcional à dose administrada; em detrimento a isto, a terapêutica com altas doses fica muitas vezes limitada por sua toxicidade, especialmente: neurotoxicidade; nefrotoxicidade e ototoxicidade (DOS SANTOS et al., 2020). A respeito de seu extensivo uso nos últimos 50 anos, a dor neuropática induzida por cisplatina (DNIC) permaneceu como efeito adverso mais relevante, dose-limitante e não modificável, o que enfatiza o reconhecido efeito neurotóxico dos compostos platínicos (CALLS et al., 2020).

O mecanismo de ação da cisplatina sobre as células tumorais pode ser dividido em quatro principais etapas: captação celular, ativação, platinação do DNA e processamento dos danos no DNA (CALLS et al., 2020). Na corrente sanguínea, a fração de cisplatina não ligada a proteínas plasmáticas (5-35%) pode ser captada pelas células por difusão passiva pela membrana plasmática ou a partir de transporte ativo através de transportadores de cobre e dos transportadores de cátions orgânicos CTR1, OCT1 e OCT2. (CALLS et al., 2020; LIU et al., 2013). Uma vez dentro da célula, a cisplatina é ativada a partir de reações de hidratação, tornando-se reativa e interage com centros nucleofílicos das bases purinas (guanina e adenina) do DNA nuclear e mitocondrial (CALLS et al., 2020). Essas modificações resultam na formação de ligações cruzadas entre as bases purinas, acarretando distorções na dupla-hélice do DNA e prejudicando assim os processos de replicação e transcrição (GHOSH, 2019). O acúmulo dessas lesões culmina na morte celular por apoptose (CALLS et al., 2020; GHOSH, 2019).

#### **1.4 Fisiopatologia da DNIC**

Está cada vez mais claro que a sensação de dor está intimamente associada a interações moleculares e celulares entre os sistemas nervoso e imunológico (PINHO-RIBEIRO et al., 2017). Assim, uma injúria tecidual nos membros inferiores, por exemplo, induz inflamação periférica caracterizada pela sensitização de neurônios de primeira ordem, provocando o disparo e transmissão de potenciais de ação em direção aos corpos celulares desses neurônios, localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD), para serem transduzidos até a medula espinhal e cérebro para então serem processados como sinal de dor (PINHO-RIBEIRO et al., 2017).

A sensitização de neurônios de primeira ordem se dá pela ação de moléculas sinalizadoras, que são liberadas durante o processo inflamatório, sobre receptores de membrana e canais iônicos presentes nas terminações nervosas dessas células, tais interações com moléculas sinalizadoras como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, prostaglandinas, bradicinina, adenosina trifosfatada (ATP), íons hidrogênio ( $H^+$ ), provocam redução do limiar de nocicepção, culminando em aumento dos disparos de potenciais de ação e conseqüentemente hiperalgesia (JI et al., 2013; BASBAUM et al., 2009). De maneira recíproca, os nociceptores produzem neuropeptídeos e neurotransmissores que atuam na imunidade inata e adaptativa modulando sua atividade (JI et al., 2013)

A literatura acerca da complexa fisiopatologia da DNIC aponta que, além da já reconhecida atividade citotóxica direta sobre o tecido nervoso, diversas outras alterações induzidas pela cisplatina contribuem para o rompimento da homeostase das células neuronais (SALAT, 2020). Isto constitui a ideia de uma condição multifatorial e com diversos mecanismos farmacológicos em vários locais do sistema somatossensorial (SALAT, 2020; CAROZZI et al., 2015). O GRD – desprovido de barreira hematoencefálica – é particularmente vulnerável ao dano nervoso causado pela cisplatina, o que explica a predominância de sintomas sensoriais (CAROZZI et al., 2015). Ademais,

Gregg et al (1992) correlacionou o aumento da quantidade de cisplatina no GRD com a severidade da neurotoxicidade, observando-se uma relação diretamente proporcional.

O desenvolvimento de DNIC tem sido relacionado com a ocorrência de eventos incluindo estresse oxidativo e dano mitocondrial; degeneração axonal; produção de mediadores inflamatórios e aumento da excitabilidade neuronal (DOS SANTOS et al., 2020). Primeiramente, sabe-se que a cisplatina é capaz de induzir a formação de adutos de DNA mitocondrial (mtDNA) em células neuronais e não neuronais, resultando no comprometimento da função mitocondrial dada a ausência de mecanismos de reparo intrínsecos de seu material genético (WASEEM et al., 2018). Como consequência, a formação dos adutos de DNA prejudicam a replicação e transcrição mitocondrial levando a alterações funcionais na cadeia respiratória (CANTA et al., 2015).

O dano mitocondrial instalado provoca outros dois eventos importantes: em primeiro lugar, a maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que prejudicam o funcionamento adequado de biomoléculas como enzimas e proteínas celulares; em segundo lugar, o esgotamento das reservas de moléculas antioxidantes, como a glutatona, amplificando o processo patológico (STARABOVA e VETTER, 2017; WASEEM et al., 2018; SALAT, 2020; CAROZZI et al 2015).

A degeneração axonal também é um elemento importante na fisiopatologia da DNIC. Em murinos, já foi demonstrado que a cisplatina danificou fibras mielinizadas do nervo ciático, diminuiu a amplitude do potencial de ação e reduziu a velocidade de condução nervosa do nervo caudal (BOEHMERLE et al., 2014). Apesar de tais eventos terem sido correlacionados a alterações a nível de transporte axonal de proteínas, os exatos mecanismos relacionados permanecem pouco conhecidos (BOEHMERLE et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2020).

A excitabilidade neuronal, por sua vez, é considerada outro componente chave no desenvolvimento e manutenção da DNIC. De fato, a atividade espontânea neuronal bem como respostas alteradas a estímulos é reportada tanto em pacientes quanto em modelos experimentais de DNIC (CAROZZI et al., 2015). A hiperexcitabilidade neuronal é governada pelo padrão de expressão, sequestro e função de canais iônicos regulados por voltagem, que são críticos para a neurotransmissão de informações periféricas para o corno dorsal da medula espinal (COLLOCA et al., 2017). A exposição de camundongos a cisplatina tem sido relacionada a alterações na expressão de diversos receptores de potencial transitório (TRP) mecânicos e termais incluindo o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1); receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) e potencial receptor transitório membro 8 (TRMP8) (TA et al., 2010; BOLCSKEI et al., 2005; NAZIROGLU e BRAIDY, 2017; STARABOVA e VETTER, 2017).

Fármacos quimioterápicos geram efeitos importantes no sistema imune inato e adaptativo bem como em células acessórias do sistema somatossensorial como células satélites; células de Schwann; astrócitos e micróglia (LI et al., 2016; WARWICK E HANANI, 2013; CAVALETTI et al 1995; ROBINSON et al 2014; RUIZ-MEDINA et al., 2012). Já foi demonstrada, por exemplo, a participação da cisplatina na modulação de linfócitos TCD8+ para a prevenção e resolução da DNIC (LAUMET et al., 2019). A produção excessiva de ROS se relaciona diretamente com a síntese de mediadores pró-inflamatórios no gânglio da raiz dorsal e medula espinal (STARABOVA e VETTER, 2017).

Os nociceptores expressam em sua membrana diversos receptores capazes de se ligarem a mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, lipídeos, proteases e fatores de crescimento (PINHO-RIBEIRO et al., 2017). Uma vez ativados, esses

receptores desencadeiam cascatas intracelulares de sinalização de modo a modificar as propriedades de canais iônicos como TRPA1; TRPV1; Nav1.7; Nav1.8; Nav1.9 (PINHO-RIBEIRO et al., 2017). Isso culmina no aumento da atividade de disparo de potenciais de ação e conseqüentemente na sensação de dor (PINHO-RIBEIRO et al., 2017). Diversos mediadores inflamatórios já foram descritos como capazes de desempenhar esse tipo de modulação. A liberação de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6). A ligação de IL-1 $\beta$  com seu receptor em nociceptores acarreta no aumento da expressão na membrana de canais TRPV1; enquanto que a ligação do TNF $\alpha$  com seu receptor causa a fosforilação dos canais Nav1.9 (EBBINGHAUS et al., 2012; CONSTANTIN et al., 2008; GUEDES et al., 2014). A IL-6, por sua vez, liga-se a receptores de glicoproteína 130 (GP130) expresso na membrana dos nociceptores induzindo o aumento na expressão de ambos canais TRPA1 e TRPV1 (MALSH et al., 2014; FANG et al., 2015).

### **1.5 Quadro clínico da neuropatia induzida por cisplatina**

O início do quadro clínico relacionado a neuropatia causada por cisplatina é variável, com pacientes relatando aparecimento de sintomas após a primeira administração e outros relatando sintomas somente após 12 ciclos de terapia (STARABOVA e VETTER, 2017). Desse modo, mais de 90% dos pacientes experienciam sintomas característicos de neurotoxicidade como perda de sensibilidade ao toque, parestesia e dor neuropática (KRARUP-HANSEN et al., 2007; STAFF et al., 2019). Este último sintoma, quando presente, pode ser disparado de maneira mais intensa em resposta a um estímulo nocivo (hiperalgesia) ou simplesmente em resposta a um estímulo inocuo (alodinia) (CALLAGHAN et al., 2012). Ademais, a neuropatia se desenvolve com maior frequência em membros superiores e

inferiores, incluindo não somente efeitos sobre fibras sensoriais, mas também em fibras motoras e autonômicas, acarretando tremores e fraqueza muscular (KRARUP-HANSEM et al., 2007). Vale ressaltar que a sintomatologia pode persistir durante meses após cessar o tratamento, podendo haver piora ao longo do tempo, evento denominado “acostamento” (do inglês *coasting*), neste estágio, a neuropatia é praticamente irreversível (SIEGAL e HAIM, 1990).

Dentro do contexto social, a DNIC é uma condição que afeta diretamente a qualidade de vida do indivíduo, tanto físico quanto psicologicamente, culminando muitas vezes na descontinuação do tratamento (SALAT, 2020). De fato, pacientes com DNIC enfrentam problemas como distúrbios do sono, prejuízo cognitivo, ansiedade e depressão, bem como diminuição da produtividade no trabalho (COLLOCA et al., 2017).

## **1.6 Tratamento da DNIC**

As terapêuticas para o manejo da DNIC, além de fornecerem neuroproteção direcionada e alívio dos sintomas, não devem interferir no efeito antitumoral do quimioterápico (STARABOVA e VETTER, 2017). Infelizmente, embora diversos estudos avaliando a eficácia de agentes químicos neuroprotetores e nutracêuticos tenham sido desempenhados para o alívio da DNIC, atualmente não existem drogas que cumpram integralmente com essas premissas (STARABOVA e VETTER, 2017).

Conseqüentemente, apesar da realização de grandes esforços nas últimas duas décadas para o incremento do tratamento da dor em pacientes com neuropatia, há carência de abordagens mais eficazes e direcionadas. As terapêuticas vigentes são baseadas na administração de medicamentos, dentre eles estão anticonvulsivantes tais como pregabalina e gabapentina, inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina como a duloxetina e

antidepressivos tricíclicos, por exemplo, a amitriptilina (JAVED et al., 2015). Apesar das variadas alternativas farmacológicas, a eficácia da maioria dos medicamentos fica restrita somente a uma parcela dos indivíduos com dor neuropática (FELDMAN et al., 2019; COLLOCA et al., 2017). Além disso, é importante considerar que todas as classes mencionadas produzem efeitos colaterais em nível de sistema nervoso central (SNC), podendo trazer diversos prejuízos ao indivíduo (FELDMAN et al., 2019; COLLOCA et al., 2017). Vale salientar ainda que o uso de opióides como alternativa para alívio da dor, apesar de eficácia comprovada, não deve ser recomendado, devido ao seu potencial risco de adicção bem como efeitos colaterais relacionados.

### **1.7 Receptores de reconhecimento de padrão e sensor STING**

A capacidade do sistema imunológico de detectar uma grande variedade de microrganismos bem como moléculas derivadas se dá através da ligação destes em receptores expressos em células imunológicas, sendo essa interação de suma importância para o desenvolvimento de uma defesa adequada (AKIRA et al., 2006). Os componentes derivados de microrganismos são denominados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), já as moléculas receptoras são conhecidas como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (KUMAR et al., 2011; AKIRA et al., 2006). A interação de PAMPs e PRRs promove a ativação dos receptores e consequente ativação de vias intracelulares orquestradas por cinases que visam a indução de resposta imunológica sob medida contra o estímulo microbiano (KUMAR et al., 2011). Dentre os PRRs, existem os receptores semelhantes a *toll* (TLRs); receptores semelhantes a *NOD* (NLRs) (NOD: domínio de oligomerização de nucleotídeos), receptores semelhantes a



RIG (RLRs) (RIG: ácido retinóico indutível do gene 1); receptores AIM2 (ALRs) (ausente no melanoma 2), entre outros (KUMAR et al., 2011).

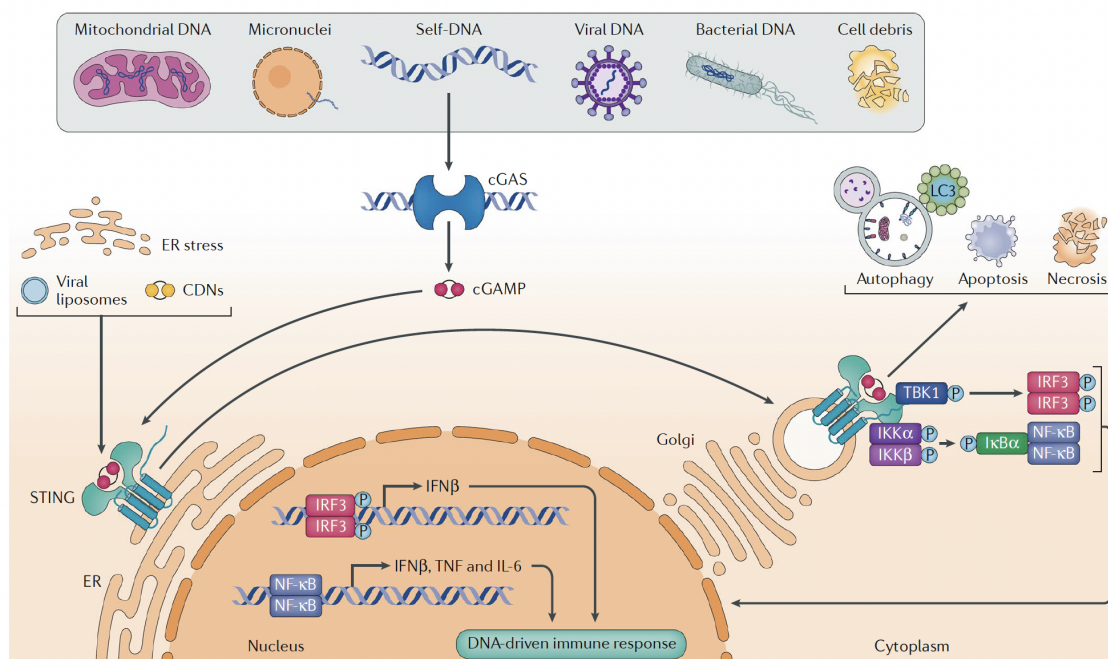
Paralelamente, processos que envolvam injúria tecidual com estresse celular ou morte celular não programada também ocasionam na indução de uma resposta inflamatória através da liberação de substâncias endógenas chamadas de padrões moleculares associados a dano (DAMPs) que também são capazes de se ligar aos PRRs (LAND et al., 2015). Exemplos de DAMPs incluem proteínas de choque térmico; proteínas da família S100; ATP; entre outros (VENÉREAU et al., 2015).

A detecção de DNA citoplasmático é um elemento crucial para a imunidade (DECOUT et al., 2021). O STING (Stimulator of Interferons Genes), também conhecido como proteína transmembrana 173 (TMEM173), é uma molécula sinalizadora acoplada ao retículo endoplasmático e sua ativação é essencial para o controle da transcrição de diversos genes envolvidos na defesa do hospedeiro, incluindo aqueles que codificam a transcrição de interferons do tipo I e de citocinas pró-inflamatórias (BARBER, 2015). O STING é expresso em diversos tipos celulares endoteliais e epiteliais, bem como em células hematopoiéticas, como células T, macrófagos e células dendríticas (ISHIKAWA e BARBER, 2008; ISHIKAWA et al., 2009).

A ativação deste sensor é disparada através de sua ligação com dinucleotídeos cíclicos anormalmente presentes no citosol celular, sendo que as principais fontes que podem induzir a formação dessas moléculas incluem infecções virais e bacterianas (infecções pelo vírus herpes zoster 1, por exemplo); estresse de retículo e dano mitocondrial que causa liberação de DNA mitocondrial para o citoplasma (SAUER et al., 2011; BARBER, 2015; ISHIKAWA e BARBER, 2008). Adicionalmente, o sensor STING pode se ligar diretamente ao DNA dupla-fita, entretanto, a relevância fisiológica dessa interação ainda é pouco conhecida (ABE et al., 2013). Vale salientar ainda que o

STING pode ser estimulado indiretamente via produção de dinucleotídeos cíclicos em resposta a ativação de outro receptor intracelular, o GMP-AMP cíclico sintase (cGAS) (MOTWANI et al., 2019).

cGAS - membro da família das nucleotidiltransferases - é um receptor citoplasmático de ácidos nucleicos, capaz de reconhecer sequências de DNA dupla-fita com mais de 30 pares de base. Uma vez ativado, cGAS converte ATP e GTP em cGAMP, um dinucleotídeo cíclico que trabalha como segundo mensageiro ativando STING (OU et al., 2021). Uma vez ativado, o sensor STING é desacoplado da membrana reticular e é translocado até a membrana do complexo de golgi, onde recruta e se associa à proteína TANK-binding cinase 1 (TBK1) e IκB cinase (IKK), formando um complexo proteico capaz de fosforilar e ativar fatores de transcrição como fator nuclear-κB (NF-κB) e fator regulador do interferon 3 (IRF3) (BARBER, 2015; ISHIKAWA e BARBER, 2008; ISHIKAWA et al., 2009). Uma vez ativados, essas moléculas são translocadas para o núcleo onde estimulam a expressão de genes associados a mediadores inflamatórios (MONTWANI et al., 2019). A ativação do fator de transcrição IRF3 induz a expressão de genes relacionados a interferons do tipo I, como interferon alfa e interferon beta (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ), enquanto que a ativação do fator de transcrição NF-κB induz a expressão de genes relacionados a citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 (DECOUT et al., 2021) (Ilustração 1).



**Ilustração 1: Via de ativação e sinalização cGAS-STING.** A ligação do DNA anormalmente presente no citosol ativa o cGAS para gerar o segundo mensageiro cGAMP, que se liga à proteína adaptadora no retículo endoplasmático STING. Outros estímulos além do cGAMP, incluindo estresse do retículo endoplasmático, lipossomas virais e dinucleotídeos cíclicos, também podem ativar STING. Após a ativação, o STING transloca-se da membrana reticular para o Golgi, onde recruta cinases TBK1 e IKK, que fosforilam IRF3 e NF- $\kappa$ B, respectivamente. O IRF3 fosforilado dimeriza e transloca-se para o núcleo para ativar a transcrição de genes que codificam interferons tipo I, como IFN $\beta$ . A fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  resulta na translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF. Retirado de Motwani et al., 2019.

A via de sinalização desencadeada pela ativação do sensor STING é essencial para a imunidade, especialmente na resposta contra microrganismos; autoimunidade; lesão mitocondrial e imunidade tumoral (BARBER, 2015). Quando se trata de seu papel no combate a infecções por microrganismos, já se sabe que o STING é capaz de suprimir a replicação de vírus de DNA e RNA bem como combater infecções por bactérias gram positivas e negativas através da intensa resposta por interferons do tipo 1 (AGUIRRE et al., 2012; LAM et al., 2014; WOODWARD et al., 2010; MITZEL et al., 2014). Por outro lado, a ativação da via STING em resposta a liberação de DNA próprio oriundo de células necróticas ou células que entraram em apoptose inapropriadamente com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias prejudiciais tem sido relacionada com o desenvolvimento de doenças auto-inflamatórias (BARBER et al., 2015).

Apesar da ênfase da detecção de DNA próprio liberado por células danificadas, bem como de DNA proveniente de vírus, é importante considerar que outra fonte de material genético também possui grande relevância no desencadeamento da ativação do sensor STING: o DNA mitocondrial. As milhares mitocôndrias citosólicas contêm cópias de mtDNA que podem ser liberadas em resposta ao estresse mitocondrial como os causados por agentes químicos, físicos e biológicos (MOTWANI et al., 2019, WEST et al., 2015).

Outro aspecto digno de nota é a propriedade anticarcinogênica da via STING. É possível que a via cGAS-STING reconheça eventos iniciais de dano ao material genético das células para então desencadear a produção de citocinas iniciadoras de reparo (BARBER, 2015). Nesse sentido, a produção de interferons do tipo 1 chama atenção pela capacidade desses mediadores inflamatórios atuarem na modulação de células T antitumorais, favorecendo a imunovigilância contra desenvolvimento tumoral (ZHU et al., 2014; BARBER, 2015). O fenótipo observado em animais deficientes para STING submetidos ao tratamento com agentes químicos carcinogênicos (dextran sulfato de sódio e azoximetano) mostrou que a perda de STING gerou maior susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinogênese associada a colite (AHN et al., 2015).

### **1.8 Envolvimento do Sensor STING na dor crônica**

O papel do STING em processos patológicos do sistema somatossensorial ainda não é bem compreendido e pouco explorado. Wang et al (2019) demonstrou uma participação importante da via de sinalização STING na injúria de medula espinal através da modulação da atividade microglial a partir da fosforilação de TBK1. Adicionalmente, estudos recentes demonstram um papel antinociceptivo do STING dependente da

sinalização via interferons do tipo 1 em neurônios nociceptivos em camundongos submetidos aos modelos: traumático, químico (paclitaxel) e de câncer ósseo (DONELLI et al., 2021; WANG et al., 2021; SUN et al., 2022). Apesar disso, abordagens para a investigação dos mecanismos moleculares por trás dessa atividade são escassos nos mesmos estudos, sendo as conclusões baseadas praticamente em testes comportamentais. Destarte, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares acerca da atividade da via STING no contexto da dor crônica tão pouco seu papel diante outros contextos.

Interessantemente, evidências emergentes demonstram que o dano ocasionado a mitocôndrias de neurônios sensoriais é capaz de disparar o desenvolvimento de DNIC em camundongos (WEST et al., 2015; MAEKAWA et al., 2019; MAJ et al., 2017). Ademais, já foi mostrado que a cisplatina induz o escape citoplasmático de mtDNA, culminando na ativação do sensor STING no contexto de lesão renal aguda (MAEKAWA et al., 2019). Essas observações nos levam a hipotetizar que o dano mitocondrial gerado nos neurônios sensoriais em resposta ao tratamento com cisplatina promove o escape citoplasmático de mtDNA, o que resultaria na ativação da via STING e, conseqüentemente, na produção de citocinas inflamatórias relevantes para o desenvolvimento da DNIC. Levando isso em consideração, associado a necessidade da busca por novos alvos moleculares passíveis de intervenção farmacológica no contexto da dor crônica, o papel do sensor STING na gênese da DNIC foi investigado.

***Objetivos***

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o papel do sensor STING no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática periférica induzida por cisplatina bem como investigar mecanismos adjacentes.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Avaliar a quantificação de DNA dupla fita no citoplasma das células do GRD em camundongos submetidos a administração de cisplatina;

2.2.2. Determinar a expressão do sensor STING no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal de camundongos;

2.2.3. Verificar a nocicepção mecânica e térmica de camundongos selvagens e camundongos incapazes de sintetizar o sensor STING (STING GT);

2.2.4. Avaliar a hipersensibilidade nociceptiva mecânica após o tratamento com cisplatina em camundongos selvagens e camundongos STING GT bem como em animais selvagens que receberam a injeção de antagonista de sensor STING (C-176);

2.2.5. Analisar a hipersensibilidade nociceptiva mecânica após o tratamento com cisplatina em camundongos selvagens e camundongos deficientes para o receptor cGAS;

2.2.6. Avaliar a hipersensibilidade nociceptiva mecânica após o tratamento com cisplatina em camundongos selvagens e camundongos em que o sensor STING foi seletivamente deletado em neurônios sensitivos;

2.2.7. Determinar o perfil de indução de citocinas no gânglio da raiz dorsal e medula espinal após o tratamento com cisplatina em camundongos selvagens e camundongos STING GT;

2.2.8. Verificar a migração de células imunes para o gânglio da raiz dorsal após o tratamento com cisplatina em camundongos selvagens;

2.2.9. Avaliar a hipersensibilidade nociceptiva mecânica após o tratamento com cisplatina em camundongos selvagens e camundongos deficientes para IL-6 e para o receptor de interéferons do tipo I (IL-6<sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup>);

2.2.10. Analisar a hipersensibilidade nociceptiva mecânica após a administração de agonista do sensor STING (CAY10748) na pata de camundongos selvagens e camundongos IL-6<sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup>;

2.2.11. Investigar o perfil de indução de citocinas em culturas primárias de neurônios sensitivos estimulados com agonista do sensor STING (CAY10748);





### 3. Métodos

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (*wild type* - WT); camundongos incapazes de sintetizar o sensor STING (STING<sup>GT</sup>) e animais deficientes (<sup>-/-</sup>); para o sensor cGAS; para o receptor de interferons do tipo 1 (IFNAR) e para a citocina interleucina 6 (IL-6). Ademais, foram cruzados camundongos que possuem o gene da proteína Cre-recombinase sobre o promotor do gene do canal iônico Nav1.8 (Nav1.8<sup>CRE</sup>) com camundongos que possuem o gene STING flanqueado por regiões loxp (STING<sup>loxP</sup>) resultando em animais nocauteados condicionalmente em que o gene STING está deletado especificamente nos nociceptores (Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>loxP</sup>). Todos esses animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (USP-RP) e do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Adicionalmente, foram cruzados animais que possuem o gene da proteína Cre-recombinase sobre o promotor do gene PIRT (PIRT<sup>CRE</sup>) com camundongos STING<sup>loxP</sup> resultando em animais que possuem a deleção do gene STING especificamente em neurônios sensitivos em geral (PIRT<sup>CRE</sup>STING<sup>loxP</sup>). Estes animais foram obtidos em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Temugin Berta da Universidade de Cincinnati, provenientes e mantidos no biotério de criação de camundongos especiais da Universidade de Cincinnati.

Os animais possuíam entre 8 e 12 semanas de idade e pasavam de 20 a 25g, sendo mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia FMRP-USP sob condições de temperatura (23 a 25°C) e ciclo claro/escuro (12 horas) controlados, com livre acesso à ração e água até o dia de experimentação. Todos os protocolos experimentais deste trabalho foram

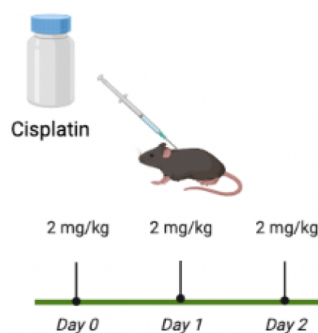
conduzidos de acordo com as normas de ética estabelecidas para a experimentação com animais recomendadas pela IASP (do inglês: *International Association for the study of Pain* – IASP) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP) com número de protocolo 1027/2021.

### **3.2 Drogas**

As drogas foram adquiridas das seguintes fontes: CAY10748 (Cayman®, EUA) e C-176 (Sigma-Aldrich, EUA). Para testes de avaliação do comportamento nociceptivo, o agonista STING, CAY10748, foi administrado por via intraplantar (20µg/20µl). Esta droga foi diluída inicialmente em uma solução de 10 mg/mL em DMSO e no momento do uso foram dissolvidos 2 µL da solução inicial em 18 µL de PBS. Já o antagonista do sensor STING, C-176, foi administrado por via intraperitoneal (100µg/100µl). Esta droga foi diluída em PBS.

### **3.3 Modelo experimental de dor neuropática induzida por cisplatina (DNIC)**

Para a indução do modelo de DNIC, os animais foram submetidos à administração intraperitoneal (i.p.) de cisplatina (2 mg/kg) por três dias consecutivos, resultando em uma dose cumulativa de 6mg/kg. Este modelo é baseado no trabalho de Laumet et al (2019) em que a dose apresentada foi capaz de induzir dor tanto em camundongos machos quanto em fêmeas. A cisplatina foi adquirida da Sigma-Aldrich-EUA e foi dissolvida em solução salina apirogênica (0,9%). O grupo experimental controle foi composto de animais que receberam a administração somente de solução salina apirogênica (0,9%).



**Ilustração 2: Representação do modelo experimental de dor neuropática induzida por cisplatina.** Os camundongos receberam 3 injeções i.p. em 3 dias consecutivos de cisplatina na dose de 2 mg/kg, resultando em uma dose cumulativa de 6 mg/kg (Fonte: próprio autor).

### 3.4 Avaliação do comportamento nociceptivo

A avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos foi realizada conforme descrito anteriormente por Cunha et al (2004), a partir do uso de filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA). Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 30-45 minutos antes do experimento, para habituação ao ambiente.

Essa técnica é baseada na estimulação plantar em camundongos a partir de uma série de microfilamentos de náilon com aumento da rigidez (0,008g - 2g de força) para a avaliação do limiar de retirada de pata. Os filamentos foram aplicados perpendicularmente sobre a superfície plantar da pata posterior direita dos camundongos por aproximadamente 3 segundos ou até que se demonstre o comportamento nociceptivo. O limiar mecânico será determinado pelo filamento de menor força capaz de induzir resposta reconhecida com nociceptiva (retirada de pata, lambida, sacudida) (log mg). Outro parâmetro utilizado foi a avaliação da frequência de retirada de pata, em que os filamentos de 0,02g e 0,16g foram aplicados dez vezes sobre a superfície plantar da pata posterior direita dos camundongos para

avaliação da alodinia e hiperalgesia, respectivamente. Foi avaliado o número de vezes que os animais apresentaram comportamento nociceptivo diante das 10 aplicações dos filamentos.

Foi avaliado também a sensibilidade ao frio nos animais através do teste de acetona. Para avaliar a sensibilidade ao frio, no mesmo aparato onde é realizado o teste de Von Frey, e sob as mesmas condições, foi instilada uma gota (50  $\mu$ L) de acetona P.A. (Synth, BR) (considerada como um estímulo de temperatura a 0° C) na superfície plantar da pata posterior direita do animal com auxílio de uma seringa de 1 mL, sem agulha. Serão avaliados os comportamentos de aversão (sacudida e elevação da pata além de lambidas). Durante 60 segundos após a instilação da acetona, será computado o tempo, através de um cronômetro, em que o animal passa executando respostas aversivas.

### **3.5 Avaliação da expressão gênica**

#### **3.5.1 Processamento das amostras e extração de RNA Mensageiro**

Camundongos tratados e camundongos controle foram terminalmente anestesiados com uma solução de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via de administração intraperitoneal (i.p.), a caixa torácica foi exposta e o ventrículo esquerdo do coração canulado para a perfusão durante 2 minutos com PBS 1X pH 7,4. Foram coletadas amostras do corno dorsal da medula espinal e gânglio da raiz dorsal (compreendidos em L4, L5 e L6) em 500 $\mu$ L de Trizol (Sigma-Aldrich) e homogeneizados com auxílio de triturador (IKAT 10 basic ultra-turrax). A seguir, foram adicionados 100 $\mu$ L de clorofórmio (Merck) e 100 $\mu$ L de água ultra pura (Sigma-Aldrich); os tubos foram centrifugados a 12000 G a 4° C durante 20 minutos e após, a fase aquosa contendo RNA foi coletada e colocada em um novo tubo

contendo 500 $\mu$ L de isopropanol (Merck) gelado. Após, os tubos foram agitados com auxílio de vortex e acondicionados a -80° C *overnight*.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000 G a 4° C durante 20 minutos e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Nessa etapa, ao RNA precipitado aderido ao fundo do tubo foi adicionado 10 $\mu$ L de água ultrapura (Sigma-Aldrich). A quantidade de RNA foi determinada através de densidade óptica no comprimento de onda de 260nm, por meio do equipamento NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

### **3.5.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) e Reação de Cadeia da Polimerase-Transcriptase Reversa em Tempo Real (RT-qPCR)**

O RNA foi transcrito para cDNA através da seguinte reação conforme recomendado pelo fabricante do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific): o volume correspondente a 500 $\mu$ g ou 1000 $\mu$ g da solução contendo RNA q.s.p. 14,2 $\mu$ L de água ultrapura (Sigma-Aldrich) + 0,8 $\mu$ L de dNTP mix 10X (100mM) + 2 $\mu$ L de RT-Buffer 10X + 2 $\mu$ L de RT-Random primers 10X + 1 $\mu$ L da enzima transcriptase reversa MultiScribe™. Após, as amostras foram dispostas no termociclador (Eppendorf Mastecycle Gradient) para conversão a cDNA conforme recomendado em sequência pelo fabricante: 10 minutos a 25° C; 120 minutos a 37° C; 5 minutos a 85° C e finalização a 4° C.

A qPCR foi realizada com volume final de 13 $\mu$ L sendo: 6,25 $\mu$ L de SYBR-Green® contendo Rox® (Invitrogen); 3,75 $\mu$ L de água ultrapura (Sigma-Aldrich); 0,5 $\mu$ L de primer sense; 0,5 $\mu$ L de primer antisense; 2 $\mu$ L de amostra de cDNA. Todos esses reagentes foram dispostos em poços em placa de 96 poços adequadas para a reação no aparelho StepOne™ (Thermo Fisher Scientific) e mantidas a 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de: 94° C durante 1 minuto; 56° C durante 1 minuto e 72° C durante 2 minutos.

A curva de dissociação foi analisada de 65 a 95° C para verificar a qualidade e eficiência dos primers. As amostras serão analisadas através do método comparativo de “Cycle Threshold” e os níveis da expressão relativa dos genes alvos serão normalizados com base na expressão de GAPDH como controle endógeno, como descrito anteriormente (LIVAK e SCHIMITTGEN, 2001). As seqüências de primer utilizados estão listadas na tabela abaixo:

**Tabela 1: Sequência dos pares de primers**

<b>Primers</b>	<b>Sequência Sense</b>	<b>Sequência Antisense</b>
GAPDH	AGGAGCGAGACCCCACTAAC	GTGGTTCACACCCATCACAA
TNF $\alpha$	TGTGCTCAGAGCTTTCAACAA	CTTGATGGTGGTGCATGAGA
IFN $\beta$	ACCTACAGGGCGGACTTCAA	TTCATCCAGGAGACGTACAACAA
IBA	TGAGGAGCCATGAGCCAAAG	GCTTCAAGTTTGGACGGCAG
GFAP	TGTGGATTTGGAGAGAAAGGT	CCGATACTCCTCTGTCTCT
STING	GTGTGTTACATCTCGGGACCT	CTCAGCTCGCTTCCTCAGTAA
cGAS	CGGCTCTCGTCTTAGATTGGT	CCCTTTCTTTGCTTCACTGTGT
IL-6	ACAAAGAAATGATGGATGCTACC	ACTCCAGAAGACCAGAGGAAAT
CXCL10	TCGAAGGCCATCAAGAATTT	TCCCCTCTGGTTTTAAGGAGA

### 3.6 Híbridização *in situ*

Camundongos foram terminalmente anestesiados com uma solução de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via de administração intraperitoneal (i.p.), a caixa torácica foi exposta e o ventrículo esquerdo do coração canulado para a perfusão durante 2 minutos com PBS 1X pH 7,4. Os GRDs (compreendidos em L4, L5 e L6) foram coletados e fixados com fixados com paraformaldeído 4% tamponado com solução de fosfato 0,1 M, pH 7,2-7,4, por 4 horas a 4°C. Em seguida, os tecidos foram crioprotetidos em série em 10%, 20% e 30% de sacarose em solução de PBS 1X Dulbecco durante a noite a 4°C. Os cortes (espessura de 20µm) foram lavados duas vezes em PBS 1X, desidratados em série em etanol 50%, 70% e 100% por 5 min cada e armazenados em álcool 100% até a execução do ensaio. O ensaio de hibridização *in situ* RNAscope® para amostras frescas congeladas foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit RNAscope® Multiplex Fluorescent Reagent v2 (Cat. No. 323100, Advance Cell Diagnostics (ACD), Hayward, CA, EUA). Todas as etapas de incubação foram realizadas no sistema de hibridização HybEz™ (ACD). Resumidamente, nas etapas de pré-tratamento, as amostras foram incubadas com o reagente peróxido de hidrogênio durante 10 min à temperatura ambiente e lavadas com água ultrapura duas vezes. Em seguida, as amostras foram incubadas com solução de protease IV por 30 min à temperatura ambiente e lavadas com 1X PBS duas vezes. A sonda HAAO RNAscope de camundongo personalizada foi projetada e adquirida da ACD. A sonda HAAO visa a região 332-1252 (número de acesso: NM\_025325.2) da sequência HAAO com 20 pares de sondas de alvo ZZ. A sonda foi aplicada e deixada hibridizada por 2 h a 40°C. As etapas de amplificação e detecção foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. A detecção foi desenvolvida usando fluoróforos Opal® Dye (Akoya Biosciences) diluídos em tampão TSA (1:750, Cat. No. 322809, ACD) por 30 min a 40°C. Após as etapas de



hibridação, as seções foram lavadas com tampão de lavagem TBST sob agitação suave e bloqueadas com 10% de soro normal em TBS-1% BSA por 30 min à temperatura ambiente. Anticorpos primários para CD11c (colocar referência e concentração) e HAAO (colocar referência e concentração) diluídos em TBS-1% BSA foram incubados durante a noite a 4°C. Os cortes foram lavados cinco vezes com Tampão de Lavagem TBST e anticorpos secundários foram realizados. Ao final, os cortes foram incubados com solução DAPI (ACD) e as imagens foram adquiridas. Seções de baço foram usadas como controle positivo da sonda HAAO.

### **3.7 Citometria de fluxo**

Para análise de citometria de fluxo, os gânglios da raiz dorsal (compreendidos entre L4, L5 e L6) e baço foram coletados de camundongos tratados e camundongos controle que foram previamente sacrificados e perfundidos transcardialmente com PBS 1X pH 7,4. A seguir, para isolamento das células do baço, foram macerados com PBS 1X pH 7,4 e filtrados em *cell strainer* de 70µM (BD Biosciences) para obtenção de uma solução única de células. As células obtidas foram centrifugadas a 500 G durante 10 minutos a 4° C e posteriormente incubadas com tampão de lise de hemácias a temperatura ambiente durante 4 minutos. A seguir, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X pH 7,4 e a análise de viabilidade celular foi feita utilizando Azul de Trypan em Câmara de Neubauer. Para isolamento das células dos GRDs, os órgãos foram coletados e cortados em pequenos pedaços; posteriormente, os tecidos foram incubados em 500µL de solução contendo colagenase tipo II (1mg/mL) (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas a 37°C por 40 min sob agitação (400 G). A reação foi bloqueada com solução de PBS 1X pH 7,4 contendo 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as amostras foram filtradas em *cell strainer* de 40µM (BD Biosciences)

com posterior centrifugação a 500 G durante 10 minutos a 4° C e ressuspendidos em PBS 1 X pH 7,4 para a análise de viabilidade celular com Azul de Trypan em Câmara de Neubauer. A partir da obtenção da suspensão de células, as mesmas foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente em local protegido da luz com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície a serem avaliadas. Após a marcação com os anticorpos, as células foram lavadas com PBS 1X pH 7,4 e então submetidas ao equipamento BD FACSAria III - BD Bioscience. A identificação de leucócitos (CD45<sup>+</sup>) foi realizada a partir da marcação com anticorpo anti-CD45 (clone - BD Biosciences). As amostras foram ressuspendidas em solução tampão e submetidas a análise no aparelho de citometria de fluxo (BD FACSAria III - BD Bioscience). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo X (Tree Star, Ashland, OR).

### **3.8 Cultura primária de neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal**

Camundongos C57BL/6, 6 – 8 semanas de idade, foram terminalmente anestesiados com uma solução de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via de administração intraperitoneal (i.p.) e perfundidos com PBS 1X pH 7,4 por via transcardíaca a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, foi feita uma incisão póstero-mediana no animal, seguida de abertura, por planos, até a lâmina óssea. Após laminectomia, a região medular foi exposta, permitindo a coleta bem como dos gânglios da raiz dorsal da medula espinal L3-L6 bilateralmente. Foram coletados de 9-12 gânglios sensitivos e esses foram coletados em tubos cônicos de 15 mL contendo 14 mL de solução de Hanks balanceada de sais sem magnésio e cálcio (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, MA, EUA) gelada (4°C) para manutenção da integridade celular dos neurônios ali contidos. Após centrifugação (200G) por 2 minutos, a solução de Hanks foi descartada e 30µL/mL de uma solução de papaína foi adicionada às

amostras para digestão enzimática por 30 minutos a 37°C com pressão parcial de CO<sub>2</sub> de 5% e foi agitada a cada 10-15 minutos. Após isso, os gânglios foram centrifugados na mesma condição anterior, o sobrenadante foi removido e 3 mL de uma solução de collagenase tipo II e 4,7 mL de dispase tipo II foi adicionada às amostras, que foram então incubadas nas mesmas condições anteriores. Em seguida, foram adicionados às amostras soro fetal bovino e solução de Hanks (1:1) para inibição enzimática e foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de meio F12 suplementado (para cada 50 mL de meio F12 foram utilizados 500µL de N2 (Gemini Bio-Products), 1000µL de B27 (Gibco), 500µL de glutamina (por marca), 500µL de penicilina (Sigma-Aldrich), 50ng/mL de NGF (Sigma-Aldrich), glicose 5.56 mM (Sigma-Aldrich), HEPES 25mM (Sigma-Aldrich), Bicarbonato de sódio 44mM (Sigma-Aldrich) e após filtragem, foi pesado 55 mg de glicose para concentração final de 6.1 mM de glicose). As amostras de gânglio da raiz dorsal foram trituradas de 15 a 20 vezes usando-se uma ponteira de 1000µL e em seguida uma ponteira de 200µL. Após isso, a amostra resultante foi filtrada através de *cell strainer* para células 40 µM (BD Biosciences) para que se obtenha uma suspensão celular livre debris celulares não digeridos. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada, o sobrenadante removido e ressuspensionado com 1 mL de meio F12. A suspensão celular foi purificada em uma solução contendo albumina sérica bovina (BSA) a 3,5% diluído em F12 por 20 minutos a 14000 G em temperatura ambiente para separar neurônios sensoriais, que se encontram no precipitado, de células satélites e debris celulares na camada de BSA. Após purificação em BSA, os neurônios foram ressuspensionados em 1 mL de meio F12 e a contagem dessas células foi realizada em câmara de Neubauer por meio da coloração de azul de Trypan. A preparação da placa para RT-qPCR começa com o pré-tratamento com poli-L-lisina para permitir a aderência células, nela foram adicionados meio F12 o suficiente para 200µL/poço e espera-se 60 minutos em temperatura ambiente no fluxo laminar para garantir que não haja formação de grumos celulares. As

células foram então conferidas diariamente, o meio substituído após 2 dias e o ensaio foi feito no terceiro dia. Para a estimulação dos neurônios sensitivos, foram utilizadas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  do agonista dos sensor STING CAY10748 durante 60 minutos. Após, as células foram coletadas para RT-qPCR.

### **3.9 Re-análise de dados de sequenciamento de *single-nuclei RNAseq***

O seguinte banco de dados públicos foi utilizado: GSE154659 (RENTHAL et al., 2020). O Banco de dados públicos foi analisado 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 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).

### **3.10 Quantificação de RNA dupla fita no citosol de células do GRD**

Camundongos C57BL/6 foram terminalmente anestesiados com uma solução de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via i.p. e perfundidos com PBS 1X pH 7,4 por via transcardíaca a temperatura ambiente por 2 minutos. Os GRDs (compreendidos entre L4 - L6) foram coletados e colocados em tubos contendo PBS 1X pH 7,4. A extração do citosol de células provenientes do GRD frescas foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit de extração de citosol da Minute™. O ensaio de quantificação de DNA dupla fita foi realizado a partir de Kit específico para tal fim e conforme as recomendações do fabricante Quant-iT™

### **3.11 Análise estatística**

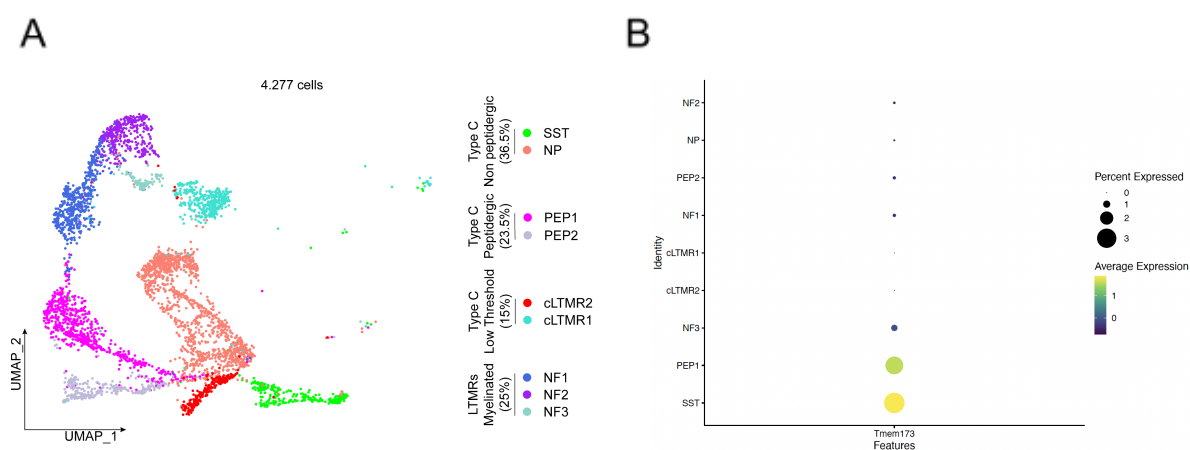
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Comparações foram feitas utilizando análise de variância de uma via com múltiplas comparações seguida de teste de Bonferroni para análises de RT-qPCR ou Teste t de Student com múltiplas comparações seguinte de teste de Holm-Sidák para as análises comportamentais, em software Graphpad Prism versão 9.4.1. (San Diego, CA, EUA). Valores de probabilidade de 5% foram considerados significativos.



## 4. Resultados

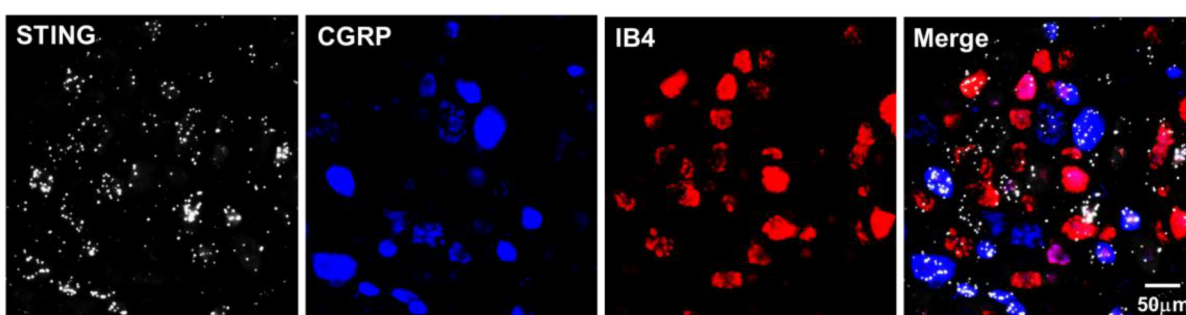
### 4.1 O sensor STING está expresso em nociceptores de camundongos

Primeiramente, para determinar a expressão do sensor STING (*TMEM173*) em diferentes subpopulações de neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal foi realizada re-análise de dados de sequenciamento de RNA de núcleo único produzido e disponibilizado por Renthal et al (2020) (GSE154659). Neste estudo, foram coletados e analisados, a nível transcriptômico, GRDs de camundongos *naive*. A partir da re-análise, foi possível observar a expressão do sensor STING sobre uma grande variedade de subpopulações de neurônios sensitivos (Figura 1A e 1B). A subpopulação de fibras do tipo-C peptidérgicas (PEP1<sup>+</sup>) bem como a subpopulação de neurônios marcados pela expressão de somatostatina (SST<sup>+</sup>) apresentaram a maior expressão de STING (Figura 1B). Estas subpopulações correspondem a pruriceptores (neurônios sensitivos que respondem à coceira) e nociceptores, respectivamente.



**Figura 1: Expressão do sensor STING em diferentes subpopulações de neurônios sensitivos.** Re-análise transcriptômica da expressão do sensor STING a partir de banco de dados (GSE154659) de sequenciamento de RNA de núcleo único realizado com GRDs de camundongos *naive* (Renthal et al., 2020). As subpopulações neuronais foram categorizadas de acordo com o tipo de fibra (A) e foi determinada a expressão do sensor STING em cada uma destas subpopulações (B).

A seguir, para confirmar a expressão do sensor STING em neurônios sensitivos de camundongos, foi executada hibridização *in situ* (RNA scope®) de GRDs de camundongos *naive*. Corroborando os dados mostrados anteriormente, é possível observar que há colocalização do STING tanto com neurônios sensitivos peptidérgicos (CGRP<sup>+</sup>) quanto em não-peptidérgicos (IB4<sup>+</sup>) (Figura 2), demonstrando que o STING está expresso em ambas populações.



**Figura 2: Hibridização *in situ* da expressão de STING em neurônios sensitivos.** A análise demonstrou que o sensor STING (branco) está expresso tanto em neurônios sensitivos peptidérgicos (CGRP<sup>+</sup> marcados em azul) quanto em não-peptidérgicos (IB4<sup>+</sup> marcados em vermelho), uma vez que há colocalização da marcação de STING com a marcação de ambas populações.

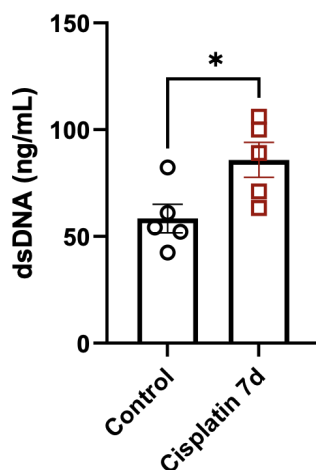
#### 4.2 A cisplatina induz aumento de DNA dupla fita no citosol de células do gânglio da raiz dorsal de camundongos

Como indicativo de dano mitocondrial com consequente liberação de mtDNA para o citosol das células, camundongos selvagens foram submetidos as injeções de cisplatina e 7 dias a partir da primeira injeção do quimioterápico, os GRDs dos animais foram coletados e submetidos a extração do citosol de suas células a partir do kit de extração (Minute<sup>TM</sup>). O citosol extraído então foi submetido a análise de quantificação de DNA dupla fita.

O resultado mostrou que os GRDs de camundongos submetidos às injeções com cisplatina apresentaram aumento na quantificação de DNA dupla fita quando comparado ao grupo controle (Figura 3). Assim, é possível considerar que a administração de cisplatina foi



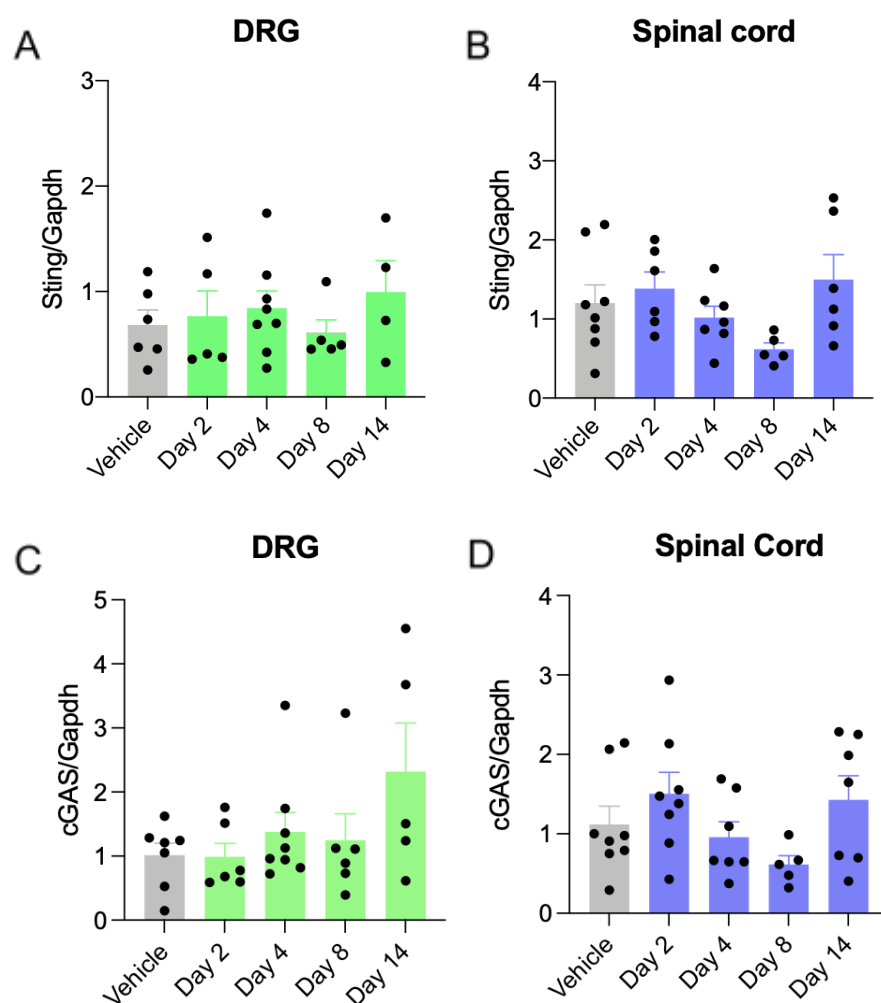
capaz de induzir o aumento de DNA dupla fita de origem não nuclear no citosol de células do GRD de camundongos.



**Figura 3: Quantificação de DNA dupla fita no GRD de camundongos.** Camundongos selvagens foram submetidos às injeções de cisplatina e após 7 dias da primeira administração, os GRDs foram coletados para avaliação da quantificação de DNA dupla fita no citosol das células. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Control

#### 4.3 O tratamento com cisplatina não altera a expressão do sensor STING

Para avaliar se o tratamento com o quimioterápico cisplatina seria capaz de acarretar aumento na expressão do sensor STING e/ou de cGAS nos diferentes segmentos do sistema somatossensorial de camundongos submetidos ao tratamento com cisplatina, foram coletados os gânglios da raiz dorsal (compreendidos em L4, L5 e L6) bem como corno dorsal da medula espinal destes animais nos tempos de 2, 4, 8 e 14 dias a partir da primeira administração de cisplatina. A análise destas amostras, a partir de RT-qPCR, indicou que o tratamento com cisplatina não foi capaz de modificar a expressão tanto do sensor STING (Figura 4A e 4B) quanto de cGAS (Figura 4C e 4D) em todos os tempos avaliados, tanto no gânglio da raiz dorsal como na medula espinal, quando comparada ao grupo de animais que recebeu veículo.



**Figura 4: Expressão de STING e cGAS no GRD e medula espinal após administração de cisplatina.** Camundongos WT foram submetidos às injeções de cisplatina e nos tempos de 2, 4, 8 e 14 dias a partir da primeira administração foram coletados GRD e corno dorsal da medula espinal para análise de expressão de STING (verde) e cGAS (roxo) por RT-qPCR. O grupo controle recebeu injeções de veículo (NaCl 0,9%). Os gráficos mostram que a administração de cisplatina não modificou a expressão de STING tanto no GRD (A) como na medula espinal (B). Resultados semelhantes foram observados quanto a expressão de cGAS (C e D). Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 - 8 animais por grupo.

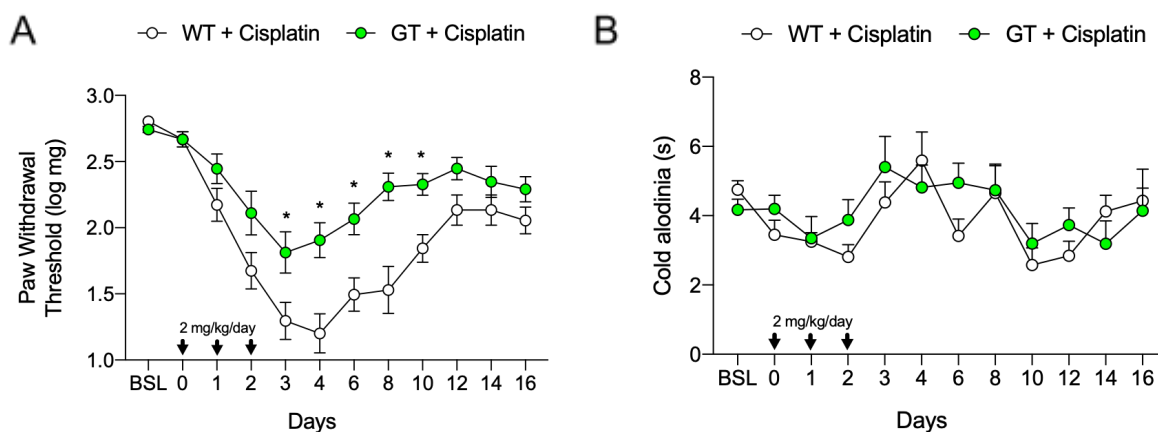
#### 4.4 O sensor STING está envolvido no desenvolvimento e manutenção da DNIC

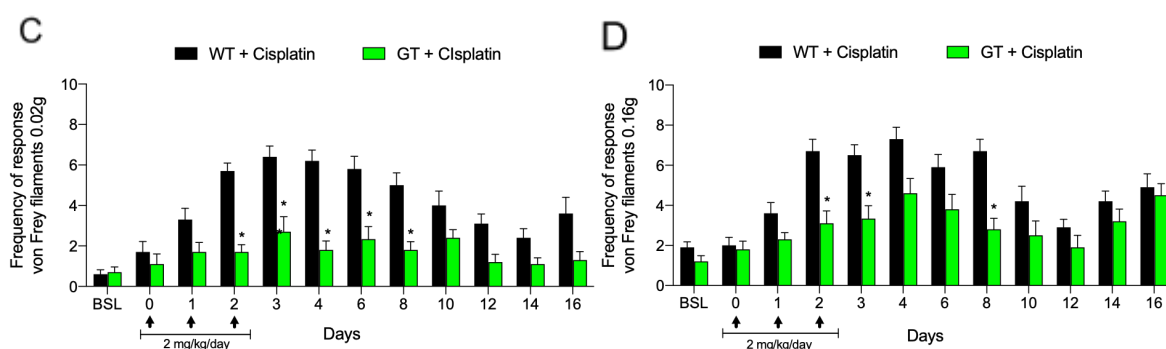
Para investigar o papel do sensor STING no desenvolvimento e manutenção da DNIC camundongos WT e camundongos deficientes para STING (GT) foram submetidos ao modelo de DNIC e o comportamento nocifensivo foi determinado através da técnica de Von Frey

filamento (limiar de retirada de pata e frequência de resposta nos filamentos de 0,02g e 0,16g) durante 16 dias. Primeiramente, vale dizer que os animais WT submetidos às injeções de cisplatina desenvolvem dor neuropática ao longo dos dias, com pico da dor 4 dias após a primeira administração (Figura 5). Adicionalmente, vale salientar que a avaliação basal do limiar de retirada de pata e frequência de resposta aos filamentos 0,02g e 0,16g em camundongos STING GT demonstrou-se ser similar ao padrão de respostas observadas em camundongos selvagens, sendo indicativo de ausência de alterações intrínsecas nos sistemas nociceptivos desses animais (Figura 5).

A avaliação do comportamento nocifensivo de animais submetidos a DNIC demonstrou que os camundongos STING GT são protegidos ao longo dos dias do desenvolvimento e manutenção de DNIC uma vez que estes apresentaram limiar de retirada de pata aumentado e frequência de resposta aos filamentos 0,02g e 0,16g diminuída em comparação ao grupo de camundongos WT (Figura 5A, 5C e 5D). Assim, estes dados mostram que a ausência do sensor STING impede a DNIC em camundongos.

Ademais, foi feita avaliação do comportamento nocifensivo em resposta a estímulo termal de animais submetidos a DNIC através do teste de sensibilidade ao frio (teste da acetona). Os dados mostraram que a administração de cisplatina não provoca sensibilidade ao frio tanto animais WT quanto animais STING GT, sendo observadas respostas similares às basais em ambos os grupos. (Figura 5B).

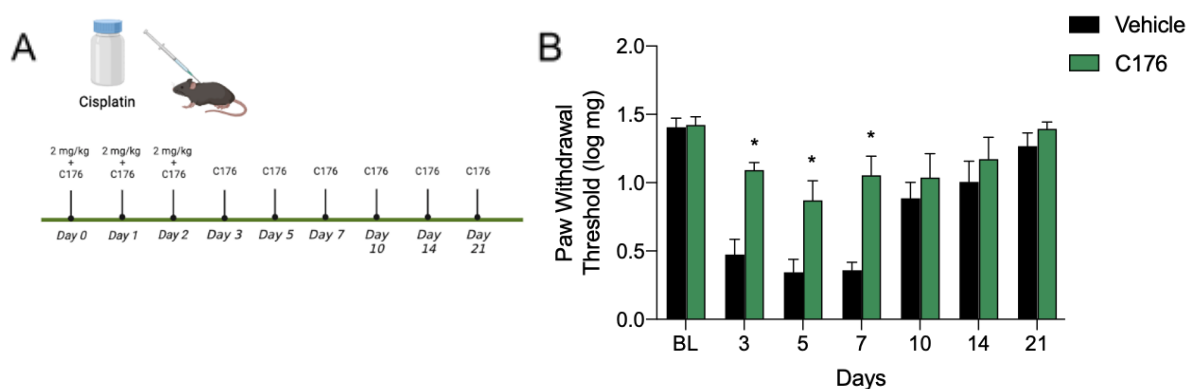




**Figura 5: Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos WT e STING GT submetidos a DNIC.** Os animais WT (branco ou preto) e STING GT (verde) receberam as injeções de cisplatina e o comportamento nociceptivo (limiar de retirada de pata (A); sensibilidade ao frio pelo teste de acetona (B); e frequência de resposta aos filamentos de 0,02g (C) e 0,16g (D)) foi avaliado ao longo de 16 dias. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo WT + Cisplatin.

Para confirmar o papel do STING no desenvolvimento e manutenção da DNIC, foi utilizada uma estratégia farmacológica na qual o STING é antagonizado através da administração intraperitoneal de C-176 em camundongos selvagens. As injeções de C-176 foram realizadas nos mesmos dias de aplicação de cisplatina, com intervalo de 6 horas entre as aplicações sendo a primeira aplicação a de C-176, bem como em todos os dias de avaliação do comportamento nociceptivo, conforme esquematizado (Figura 6A).

Os dados demonstraram que camundongos que receberam o antagonista de STING foram protegidos do desenvolvimento de DNIC, uma vez que apresentaram limiar de retirada de pata aumentado em comparação com o grupo de animais que receberam veículo (NaCl 0,9%) (Figura 6B). Logo, corroborando os dados anteriores, o bloqueio de STING protege os camundongos do desenvolvimento da DNIC.



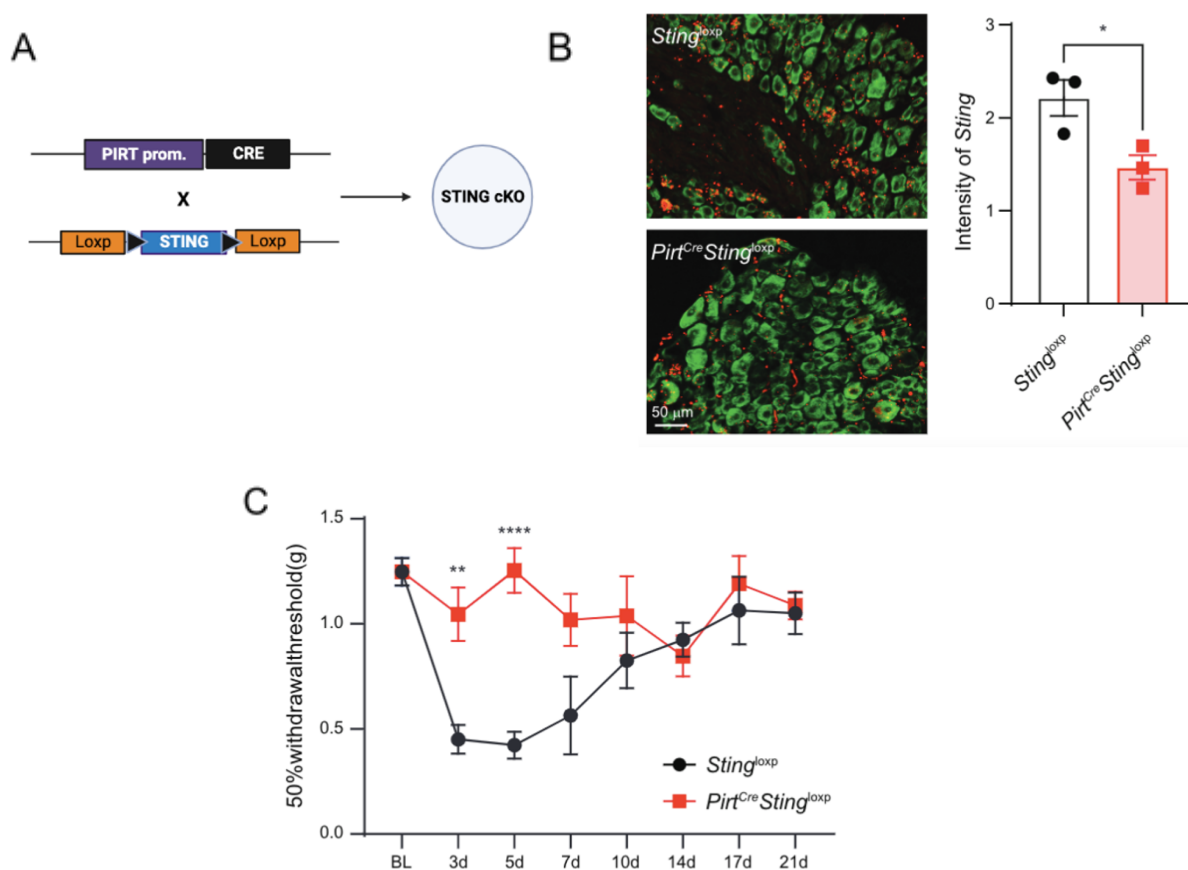
**Figura 6: Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos submetidos a DNIC tratados com C-176.** Camundongos receberam injeções de C-176 (100µg/100µl) em todos os dias de avaliação do comportamento nociceptivo (A). Avaliação do comportamento nociceptivo (B). Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Vehicle.

#### 4.5 O STING expresso em neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal está envolvido no desenvolvimento e manutenção da DNIC

A próxima etapa foi determinar em qual célula a expressão de STING estaria sendo determinante para o desenvolvimento e manutenção da DNIC. Para isso, obtivemos vantagem sobre camundongos nocauteados condicionalmente em que o sensor STING é deletado especificamente em neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal (camundongos  $PIRT^{CRE}STING^{loxP}$ ) (Figura 7A). Primeiramente, estes camundongos foram validados para confirmar a ausência de expressão de STING nos neurônios sensitivos através de hibridização *in situ*. As imagens mostram diminuição da expressão de STING no GRD (Figura 7B).

Ademais, foi realizada avaliação do comportamento nociceptivo nestes animais em condições basais para determinar se os mesmos possuíam respostas nocifensivas alteradas. Foi possível observar nos dados que estes animais desempenham respostas nocifensivas normal em condições basais, como indicativo de funcionalidade adequada dos sistemas nociceptivos (Figura 7C).

Quando submetidos ao modelo de DNIC, foi possível determinar que os camundongos  $PIRT^{CRE}STING^{loxp}$  foram protegidos do desenvolvimento de DNIC uma vez que apresentaram limiar de retirada de pata aumentado quando comparada ao grupo controle  $STING^{loxp}$ , indicando que o STING expresso em neurônios nociceptivos do GRD é responsável pelo fenótipo observado (Figura 7C).



**Figura 7: Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos  $PIRT^{CRE}STING^{loxp}$  submetidos a DNIC.** Camundongos  $PIRT^{CRE}$  foram cruzados com animais  $STING^{loxp}$  para obtenção do nocaute condicional ( $PIRT^{CRE}STING^{loxp}$ ) (A). Hibridização *in situ* do GRD de animais  $STING^{loxp}$  e  $PIRT^{CRE}STING^{loxp}$  demonstrando diminuição da expressão de STING (vermelho) em neurônios sensitivos (verde) (B). Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos  $PIRT^{CRE}STING^{loxp}$  submetidos a DNIC (C). Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 3 - 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo  $STING^{loxp}$

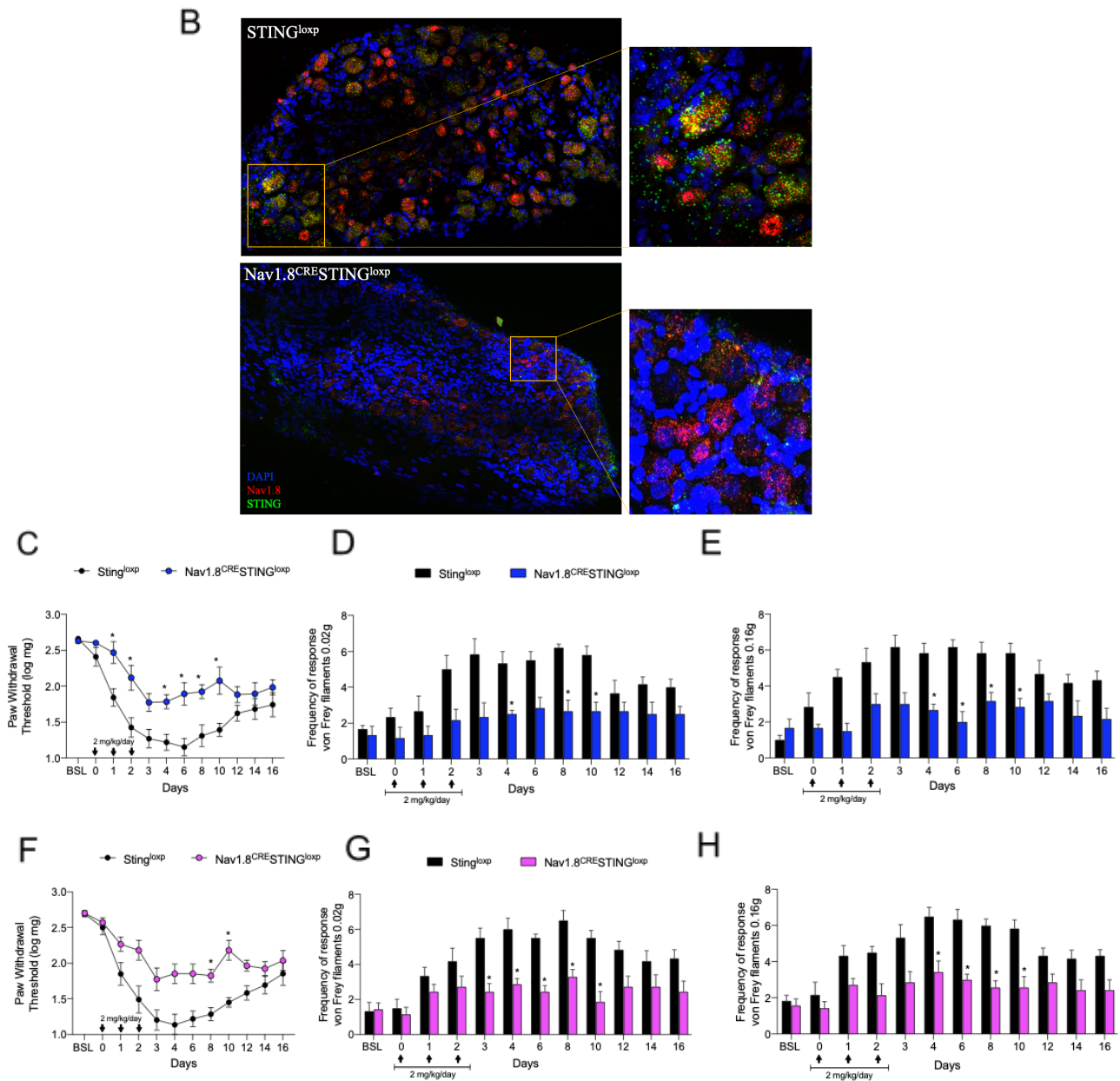
Para verificar se o STING expresso especificamente em nociceptores do GRD seria determinante para o desenvolvimento e manutenção da DNIC, obtivemos vantagem sobre

outros camundongos nocauteados condicionalmente em que o sensor STING é deletado especificamente em nociceptores do gânglio da raiz dorsal (camundongos Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>loxp</sup>) (Figura 8A). Primeiramente, estes camundongos foram validados para confirmar a ausência de expressão de STING nos neurônios sensitivos através de hibridização *in situ*. As imagens mostram diminuição da expressão de STING em nociceptores do GRD (Figura 8B).

Adicionalmente, foi realizada avaliação do comportamento nociceptivo nestes animais em condições basais para determinar se os mesmos possuíam respostas nocifensivas alteradas. Foi possível observar nos dados que estes animais desempenham respostas nocifensivas normais em condições basais, como indicativo de funcionalidade adequada dos sistemas nociceptivos (Figura 8C, 8D e 8E).

Quando submetidos ao modelo de DNIC, foi possível determinar que os camundongos Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>loxp</sup> foram protegidos do desenvolvimento de DNIC uma vez que apresentaram limiar de retirada de pata aumentado e freqüências de resposta aos filamentos 0,02 e 0,16g diminuídas quando comparada ao grupo controle STING<sup>loxp</sup>, indicando que o STING expresso especificamente em nociceptores do GRD é responsável pelo fenótipo observado (Figura 8C, 8D e 8E). Ademais, para averiguar se haveriam diferenças entre os sexos, os mesmos experimentos foram realizados com camundongos fêmeas condicionalmente nocauteadas. Os resultados apontaram que as fêmeas apresentaram fenótipo semelhante aos machos: àquelas nocauteadas condicionalmente foram também protegidas do desenvolvimento de DNIC uma vez que apresentaram limiar de retirada de pata aumentando e freqüências de resposta aos filamentos 0,02 e 0,16g diminuídas quando comparado ao grupo controle STING<sup>loxp</sup> (Figura 8F, 8G e 8H).





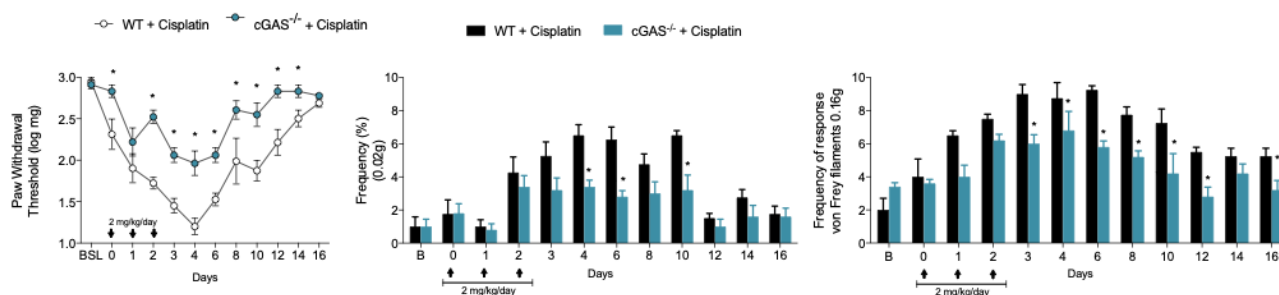
**Figura 8: Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>lox</sup> submetidos a DNIC.** Camundongos Nav1.8<sup>CRE</sup> foram cruzados com animais STING<sup>lox</sup> para obtenção do nocaute condicional (Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>lox</sup>) (A). Hibridização *in situ* do GRD de animais STING<sup>lox</sup> e Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>lox</sup> demonstrando diminuição da expressão de STING (verde) em nociceptores (vermelho) (B). Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos machos (C, D e E) e fêmeas (F, G e H) Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>lox</sup> submetidos a DNIC. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 3 - 7 animais por grupo. \*p<0,05 quando comparado ao grupo STING<sup>lox</sup>.

#### 4.6 cGAS está envolvido no desenvolvimento e manutenção da DNIC



Para verificar se a expressão de cGAS também poderia exercer algum papel no desenvolvimento e manutenção da DNIC, camundongos cGAS<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo de DNIC e o comportamento nociceptivo foi determinado. Os resultados mostram que animais cGAS<sup>-/-</sup> foram também protegidos contra o desenvolvimento de DNIC, uma vez que os animais apresentaram aumentado limiar de retirada de pata e diminuídas frequências de resposta aos filamentos 0,02g e 0,16g quando comparado aos animais selvagens (Figura 9A, 9B e 9C). Assim, o cGAS está envolvido no desenvolvimento da DNIC.

Adicionalmente, vale salientar que a avaliação basal do limiar de retirada de pata e frequência de resposta aos filamentos 0,02g e 0,16g em camundongos cGAS<sup>-/-</sup> demonstrou-se ser similar ao padrão de respostas observadas em camundongos selvagens, sendo indicativo de ausência de alterações intrínsecas nos sistemas nociceptivos desses animais (Figura 9A, 9B e 9C).

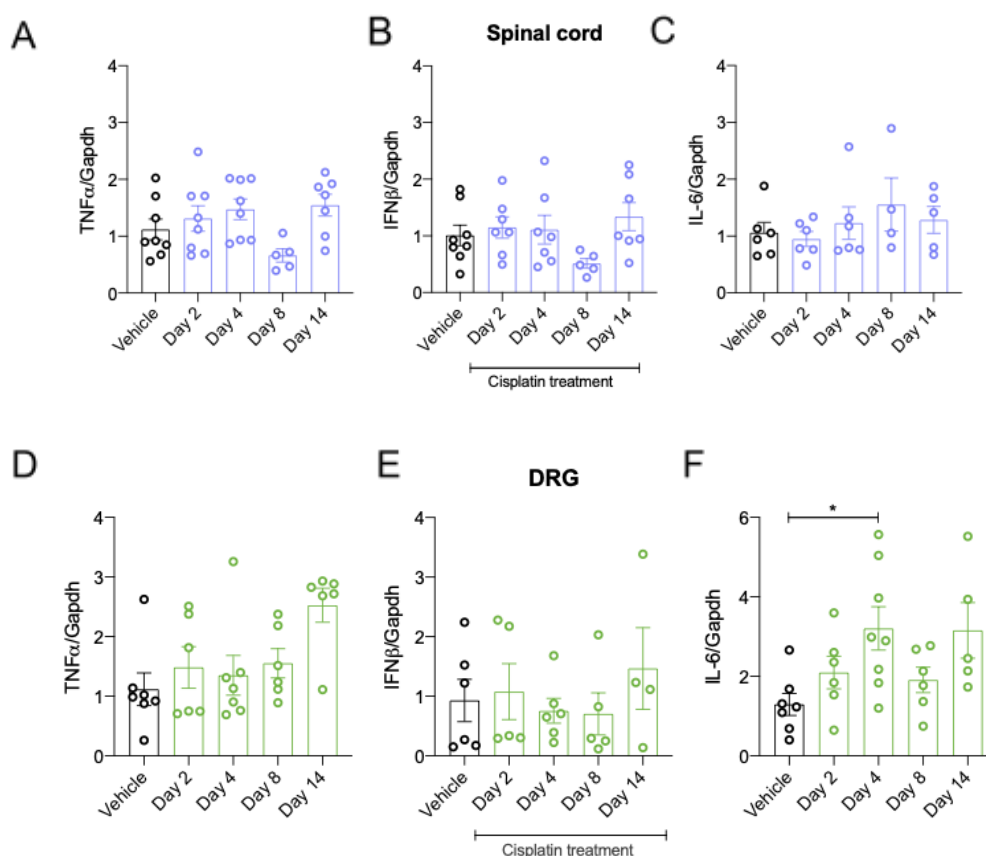


**Figura 9: Avaliação do comportamento nociceptivo em animais cGAS<sup>-/-</sup> submetidos a DNIC.** Animais cGAS<sup>-/-</sup> apresentaram aumentado limiar de retirada de pata (A) e diminuídas respostas aos filamentos de 0,02g (B) e 0,16g (C). Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 6 animais por grupo. \*p<0,05 quando comparado ao grupo WT + Cisplatin.

**4.7 A cisplatina induz a expressão aumentada de citocinas inflamatórias que são downstream à ativação do sensor STING em animais selvagens mas não em camundongos STING GT**

Para a próxima etapa, considerando que a ativação da via cGAS-STING culmina no aumento da expressão de citocinas inflamatórias, investigamos a capacidade da cisplatina em gerar aumento dessas citocinas nos diferentes segmentos do sistema somatossensorial. Para isso, nos tempos de 2, 4, 8 e 14 dias a partir da primeira injeção de cisplatina, foram coletados o GRD e a medula espinal dos animais para análise da expressão de citocinas que são classicamente induzidas em resposta a ativação da via cGAS-STING: IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\beta$ .

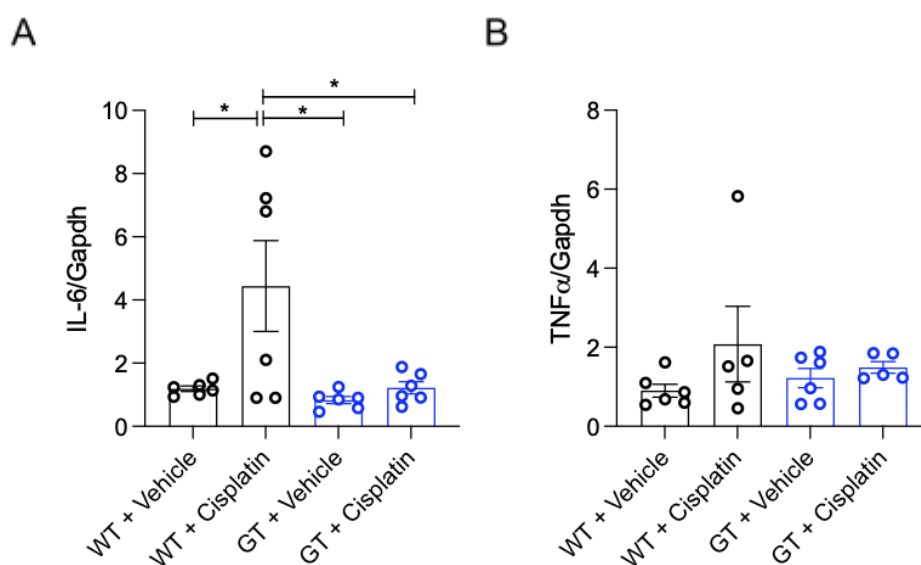
A análise de expressão destas citocinas no GRD e na medula de animais submetidos às injeções com cisplatina mostrou que há aumento da IL-6 no GRD 4 dias a partir da primeira injeção da cisplatina quando comparada com o grupo controle (Figura 10F). Ademais, não foram observadas alterações na expressão das outras citocinas tanto no GRD quanto na medula espinal em outros tempos (Figura 10A, 10B, 10C, 10D, 10E). Logo, a cisplatina induz expressão aumentada de IL-6 no GRD.



**Figura 10: Análise da expressão aumentada de citocinas no sistema somatossensorial de animais tratados com cisplatina.** A medula espinal e o GRD foram coletados nos tempos indicados e submetidos a análise de expressão por RT-qPCR. Foi realizada análise da expressão de IL-6 (A e D), TNF $\alpha$  (B e E) e IFN $\beta$  (C e F). Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Vehicle.

O próximo passo foi verificar a expressão aumentada de citocinas que são induzidas a partir da ativação da via cGAS-STING (IL-6 e TNF $\alpha$ ) em camundongos deficientes para o sensor STING. Para isso, camundongos selvagens e STING GT foram submetidos às injeções de cisplatina e os GRDs foram coletados 4 dias a partir da primeira administração do quimioterápico. A expressão aumentada de citocinas foi realizada através de RT-qPCR.

A análise mostrou que a expressão aumentada de IL-6, observada 4 dias a partir da primeira administração de cisplatina em camundongos selvagens, foi abolida em camundongos deficientes para o sensor STING (Figura 12A). Logo, o sensor STING é necessário para promoção da expressão aumentada de IL-6 no GRD de camundongos submetidos às injeções de cisplatina. A avaliação da expressão de TNF $\alpha$  mostrou que camundongos selvagens ou STING GT não apresentam modificação na expressão dessa molécula (Figura 12B).

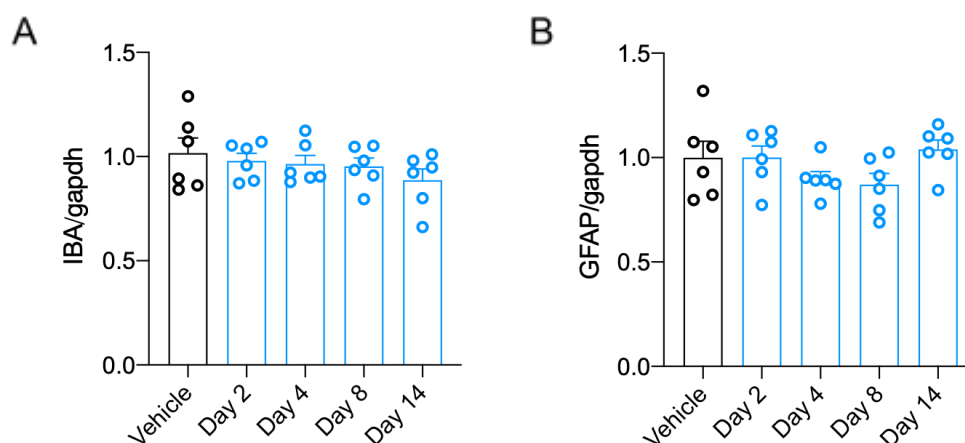


**Figura 11: Avaliação da expressão de IL-6 e TNF $\alpha$  no GRD de animais selvagens e STING GT.** Camundongos selvagens e deficientes para o sensor STING foram submetidos a administração de cisplatina e tiveram os GRDs coletados para avaliação de expressão aumentada de citocinas IL-6 (esquerda) e TNF $\alpha$  (direita) por RT-qPCR. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 - 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo WT + Vehicle; GT + Vehicle or GT + Cisplatin.

#### 4.8 A cisplatina não induz ativação ou proliferação microglial e astrogliol

Para determinar se a cisplatina possui algum efeito sobre as células gliais presentes na medula espinal, foi avaliada a expressão, a partir de RT-qPCR, de marcadores que são indicativos de ativação/proliferação de astrócitos (GFAP) e micróglia (IBA) na medula espinal de camundongos submetidas as injeções de cisplatina nos tempos de 2, 4, 8 e 14 dias a partir da primeira injeção.

A análise mostrou que não houveram alterações nos marcadores gliais em todos os tempos avaliados (Figura 11A e 11B). Logo, a cisplatina não provoca alterações nos marcadores de células gliais.

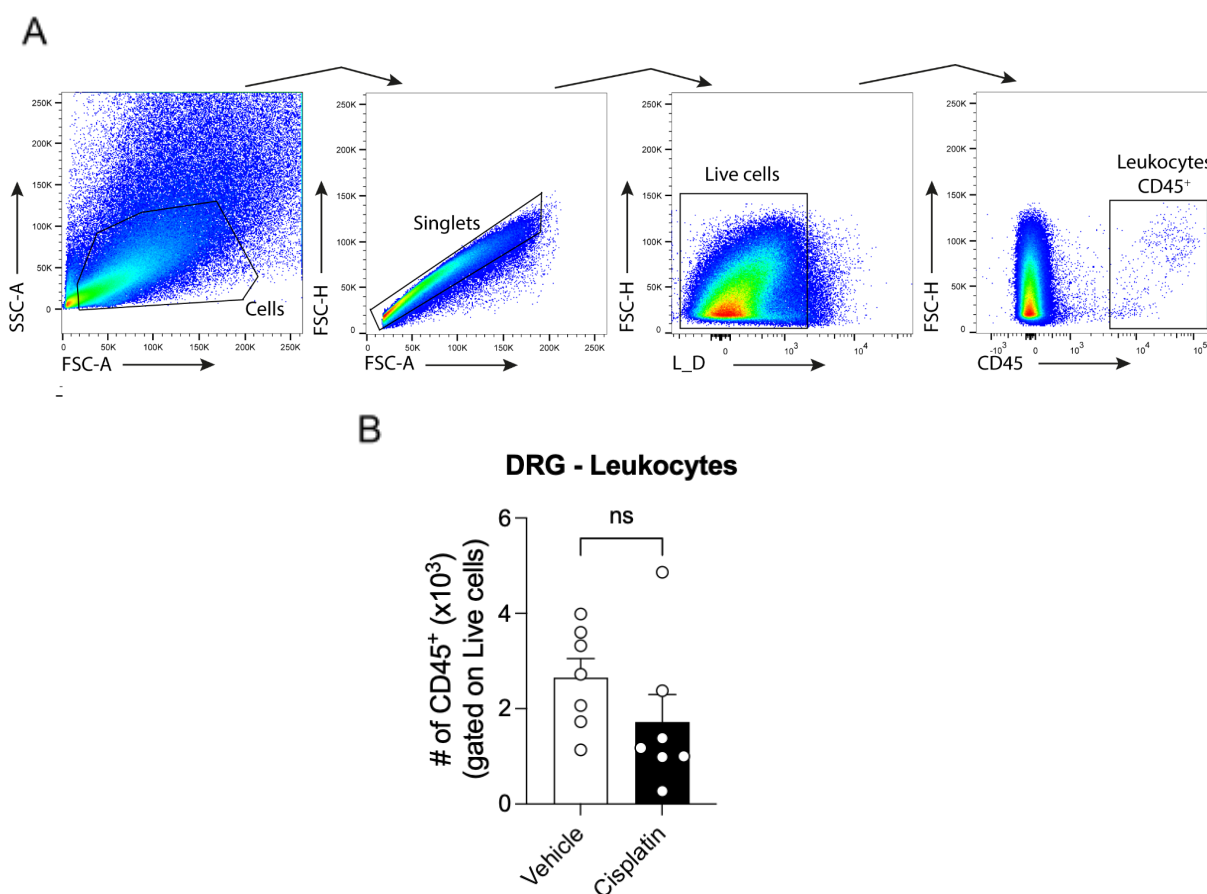


**Figura 12: Avaliação da expressão de marcadores gliais na medula espinal de camundongos tratados com cisplatina.** Nos tempos indicados, foi coletada a medula espinal dos animais tratados com cisplatina nos tempos indicados. Foi avaliada a expressão de IBA (A) e GFAP (B) como indicativo de ativação/proliferação de micróglia e astrócitos, respectivamente. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Vehicle.

#### 4.9 Cisplatina não induz a migração de leucócitos para o gânglio da raiz dorsal de camundongos

Nesta etapa, considerando o potencial pró-inflamatório da cisplatina observado anteriormente, verificamos a capacidade do quimioterápico em induzir migração de leucócitos para o GRD em camundongos selvagens. Para isso, os animais receberam injeções de cisplatina e o GRD foi coletado após 4 dias a partir da primeira administração de cisplatina. Os GRDs foram submetidos a análise de migração por citometria de fluxo.

Para análise de infiltrado de leucócitos no GRD, foi avaliada a expressão na membrana de CD45 (Figura 13A). Os dados mostram que camundongos selvagens submetidos às injeções de cisplatina não apresentam infiltrado de leucócitos no GRD, uma vez que não houve diferença na quantidade de células CD45<sup>+</sup> quando comparada ao grupo controle (Figura 13B).



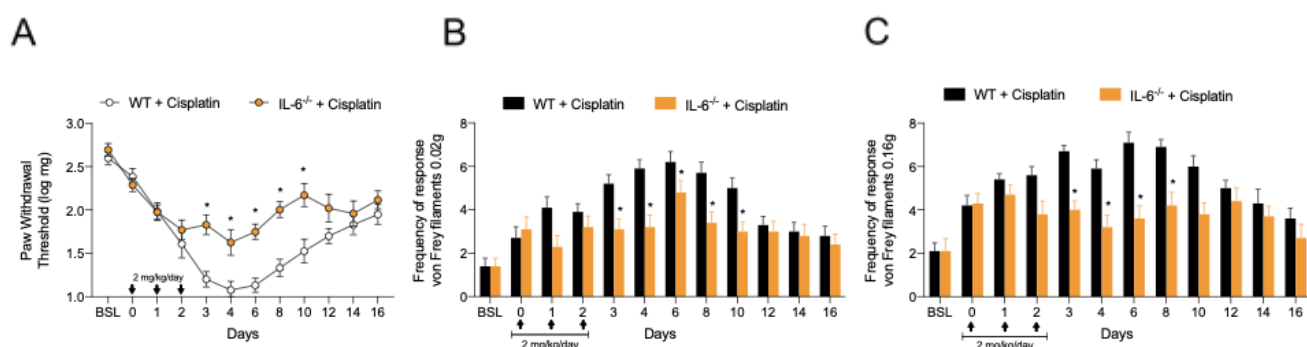
**Figura 13: Avaliação de infiltrado de leucócitos no GRD de camundongos.** Camundongos selvagens foram submetidos às injeções de cisplatina e tiveram os GRDs coletados após 4 dias a partir da primeira administração de cisplatina para análise de infiltrado leucocitário por citometria de fluxo. Foram avaliadas células CD45<sup>+</sup> presentes no tecido.

#### **4.10 Camundongos deficientes de IL-6, mas não deficientes para o receptor de interferons do tipo I, são protegidos contra DNIC**

Uma vez demonstrada a expressão aumentada de IL-6 no GRD de camundongos selvagens submetidos às injeções de cisplatina bem como a ausência deste fenômeno em animais deficientes para o sensor STING, o papel da IL-6 para o desenvolvimento e manutenção da DNIC foi verificado. Para isso, camundongos deficientes de IL-6 (<sup>-/-</sup>) submetidos ao modelo de DNIC e o comportamento nociceptivo foi determinado ao longo dos dias.

Os resultados demonstram que camundongos deficientes em IL-6 são protegidos contra o desenvolvimento de DNIC uma vez que estes animais apresentaram aumentado limiar de retirada de pata e reduzidas frequências de respostas aos filamentos 0,02g e 0,16g ao longo dos dias (Figura 14A, 14B e 14C). Logo, a síntese de IL-6 é determinante para o desenvolvimento de DNIC.

Adicionalmente, vale salientar que a avaliação basal do limiar de retirada de pata e frequência de resposta aos filamentos 0,02g e 0,16g em camundongos IL-6<sup>-/-</sup> demonstrou-se ser similar ao padrão de respostas observadas em camundongos selvagens, sendo indicativo de ausência de alterações intrínsecas nos sistemas nociceptivos desses animais. (Figura 14A, 14B e 14C).

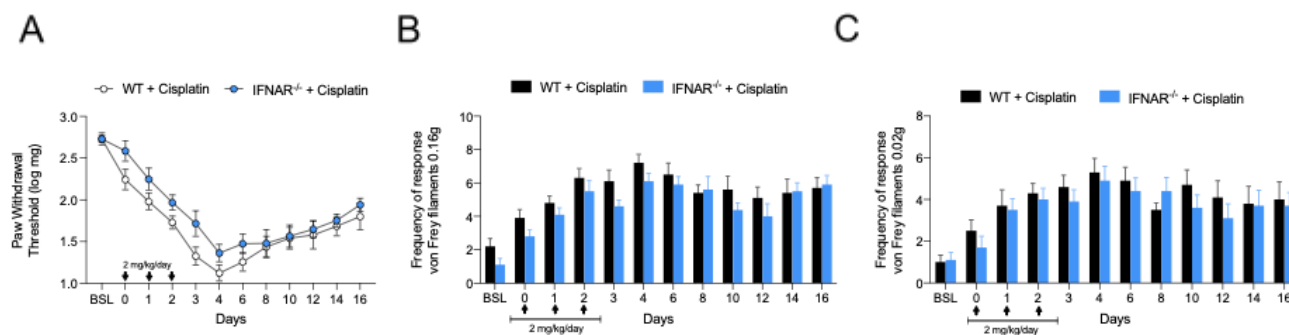


**Figura 14: Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos selvagens e IL-6<sup>-/-</sup>.** Camundongos selvagens e IL-6<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo de DNIC e o comportamento nociceptivo foi avaliado: limiar de retirada de pata (A) e frequência de resposta aos filamentos de 0,02g (B) e 0,16g (C). Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. \*p<0,05 quando comparado ao grupo WT + Cisplatin.

Os interferons do tipo I são umas das principais citocinas produzidas em resposta a ativação da via cGAS-STING, por isso, o papel dessas citocinas no desenvolvimento e manutenção da DNIC foi avaliado. Para isso, camundongos deficientes no receptor de interferons do tipo I (IFNAR<sup>-/-</sup>) foram submetidos ao modelo de DNIC e o comportamento nociceptivo foi determinado ao longo dos dias.

Os resultados obtidos mostram que animais deficientes no receptor de interferons do tipo I desenvolvem DNIC de maneira similar a animais selvagens, uma vez que apresentaram reduzido limiar de retirada de pata e aumentadas frequências de resposta aos filamentos de 0,02g e 0,16g (Figura 15A, 15B e 15C). Assim, é possível considerar que os interferons do tipo I não participam do desenvolvimento e manutenção da DNIC.

Adicionalmente, vale salientar que a avaliação basal do limiar de retirada de pata e frequência de resposta aos filamentos 0,02g e 0,16g em camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> demonstrou-se ser similar ao padrão de respostas observadas em camundongos selvagens, sendo indicativo de ausência de alterações intrínsecas nos sistemas nociceptivos desses animais (Figura 15A, 15B e 15C).



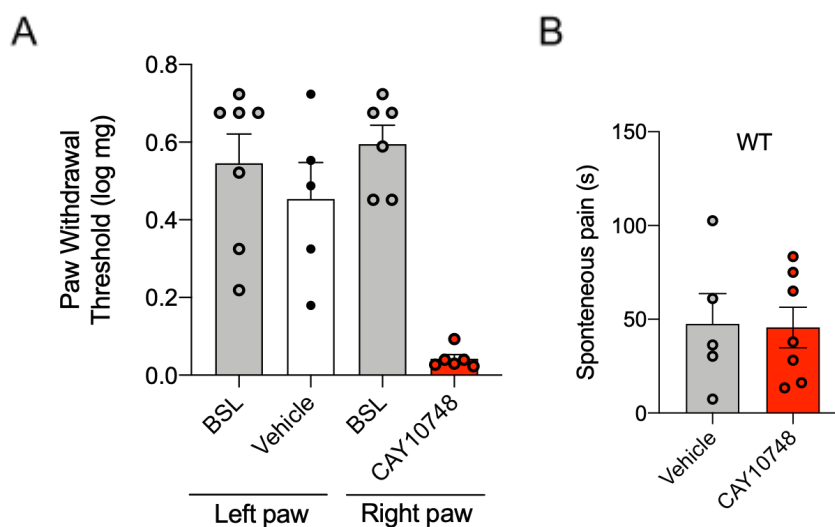
**Figura 15: Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos selvagens e IFNAR<sup>-/-</sup>.** Camundongos selvagens e IFNAR<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo de DNIC e o comportamento nociceptivo foi avaliado: limiar de retirada de pata (A) e frequência de resposta aos filamentos de 0,02g (B) e 0,16g (C). Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. \*p<0,05 quando comparado ao grupo WT + Cisplatin.

#### 4.11 A administração de agonista de STING promove dor em camundongos selvagens mas não em camundongos IL-6<sup>-/-</sup>

Para investigar a capacidade do sensor STING por si só em desencadear dor em camundongos, foi realizada administração i.pl. do agonista CAY10748 e após 60 minutos as respostas nocifensivas dos animais foram avaliadas através da técnica de Von Frey filamento. Como mostrado, animais que receberam injeção de veículo (NaCl 0,9%), na pata traseira esquerda, mantiveram o limiar de retirada de pata semelhante à avaliação basal (Figura 16A). Já os mesmos animais, que receberam a injeção do agonista CAY10748 na pata traseira direita, apresentaram dor, verificado pela redução do limiar de retirada de pata, indicando que a ativação do sensor STING através da inoculação de seu agonista na pata foi capaz de gerar dor nos animais (Figura 16A).

Apesar disso, a partir da análise e comparação de dor espontânea nos 30 primeiros minutos após a administração do agonista (pata traseira direita) e veículo (pata traseira esquerda) não foi possível observar diferença no tempo em que os animais passavam executando comportamentos relativos à dor espontânea (Figura 16B).

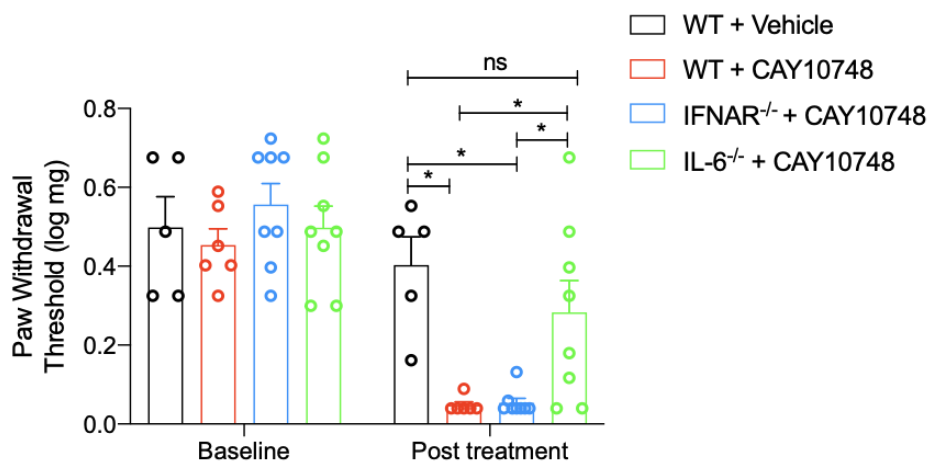




**Figura 16: Administração intraplantar do agonista CAY10748 gera dor em camundongos.** Camundongos WT receberam injeção de veículo (pata traseira esquerda) e de CAY10748 (pata traseira direita). 60 minutos após a injeção foi avaliado o limiar de retirada de pata pelo método de Von Frey filamento. Durante os 30 primeiros minutos após a injeção do agonista e veículo foi contabilizado o tempo em que os animais desempenhavam respostas relacionadas a dor espontânea. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 - 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Vehicle

Para verificar o papel das citocinas produzidas em resposta a ativação da via cGAS-STING no desenvolvimento de dor induzida pela administração intraplantar do agonista de STING, CAY10748, camundongos deficientes de IL-6 e do receptor de interferons do tipo I foram submetidos à injeção do agonista e, após 60 minutos, o comportamento nociceptivo destes animais foi determinado.

Os resultados obtidos mostraram que os camundongos IL-6<sup>-/-</sup> não desenvolveram dor após 60 minutos da administração de CAY10748, uma vez que mantiveram o limiar de retirada de pata aumentado (Figura 17). Já os animais IFNAR<sup>-/-</sup> desenvolveram dor similar àquela de animais selvagens, com reduzido limiar de retirada de pata após 60 minutos (Figura 17). Isso indica que a IL-6 participa do desenvolvimento de dor induzida pelo agonista CAY10748 enquanto que os interferons do tipo não estão envolvidos nesse fenômeno.



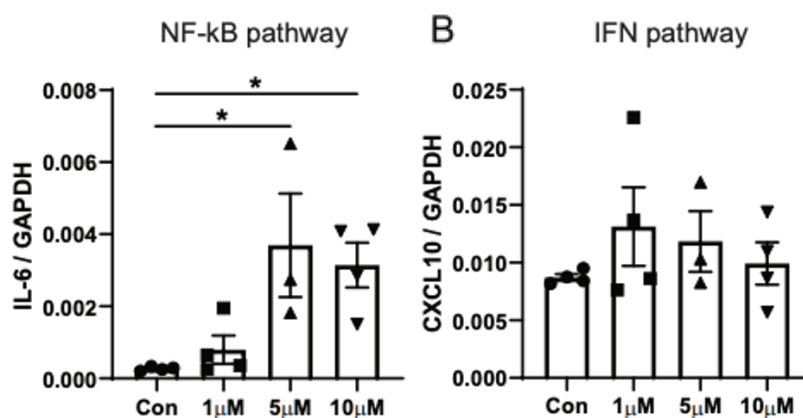
**Figura 17: Avaliação do comportamento nociceptivo em camundongos após administração intraplantar de CAY10748.** Camundongos selvagens, IL-6<sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup> foram submetidos a administração intraplantar do agonista do sensor STING, CAY10748. O comportamento nociceptivo foi avaliado 60 minutos após a injeção. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. \*p<0,05.

#### 4.12 CAY10748 induz a expressão aumentada de IL-6 em neurônios sensitivos de camundongos

De modo a verificar a possível fonte celular da expressão aumentada de IL-6 observada no GRD de animais tratados com cisplatina, foi desempenhada cultura primária de neurônios sensitivos a partir da coleta de GRDs de camundongos selvagens com posterior purificação por digestão enzimática e separação destas células. Uma vez obtidos, os neurônios sensitivos foram estimulados durante 60 minutos com CAY10748 nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu$ M e após o tratamento, o lisado celular foi coletado para avaliação da expressão de citocinas por RT-qPCR.

Os resultados mostraram a expressão aumentada de IL-6 em neurônios sensitivos estimulados com CAY10748 nas concentrações de 5 e 10  $\mu$ M em comparação ao controle (Figura 18A). Ademais, a partir da análise da expressão de CXCL10 não foram observadas alterações na expressão desta citocina em qualquer concentração de CAY10748 (Figura 18B).

Assim, a ativação da via de sinalização cGAS-STING através do CAY10748 estimula a expressão aumentada de IL-6 em neurônios sensitivos do GRD de camundongos mas não de CXCL10.



**Figura 18: Avaliação da expressão de citocinas em cultura primária de neurônios sensitivos estimulados com CAY10748.** Os GRDs de camundongos (L4-L6) foram coletados e submetidos à purificação por digestão enzimática e separação. Os neurônios sensitivos foram plaqueados e estimulados durante 60 minutos com diferentes concentrações do agonista CAY10748 (1, 5 e 10  $\mu$ M). O lisado celular foi coletado e a expressão de IL-6, como indicativo de ativação de NF-kB (A), e CXCL10, como indicativo de ativação de IRF3 (B), foram avaliadas por RT-qPCR. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 3 - 4 amostras por grupo \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Controle (Con).

*Discussão*

## 5. Discussão

O estudo da dor, apesar de desempenhado mundialmente, ainda é bastante prematuro no que se refere a transição para alternativas farmacológicas que impactam a vida dos indivíduos com dor crônica. De fato, as terapêuticas vigentes para o manejo da dor crônica neuropática são baseadas na administração de medicamentos na maioria das vezes pouco eficazes ou, quando eficazes, restritos a uma parcela dos indivíduos (FELDMAN et al., 2019; COLLOCA et al., 2017). Nesse sentido, estudos concentrados na busca por novos alvos moleculares passíveis de intervenção farmacológica e mais eficazes para o manejo da dor se faz necessária.

A dor neuropática, de fato, é uma patologia complexa, que envolve tanto mecanismos relacionados ao sistema nervoso central (por exemplo, hipersensibilidade de neurônios de segunda ordem presentes na medula espinal) quanto periférico (hipersensibilidade de nociceptores presentes no gânglio da raiz dorsal) (BASBAUM et al., 2009). Ademais, nos últimos anos diversos estudos têm demonstrado que a interação entre neurônios sensitivos e células imunológicas e/ou gliais é um elemento chave para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (PINHO-RIBEIRO et al., 2017; JI et al., 2016). A interação dessas moléculas inflamatórias com receptores expressos na membrana plasmática de neurônios sensitivos têm sido exaustivamente demonstrada e culmina na alteração das propriedades eletrofisiológicas destas células (PINHO-RIBEIRO et al., 2017; JI et al., 2016).

O desenvolvimento de dor neuropática em resposta à administração de cisplatina em modelos animais é descrito na literatura (AUTHIER et al., 2002). De fato, a ausência de barreira hematoencefálica abrangendo os gânglios da raiz dorsal torna esses tecidos, que contêm os corpos celulares dos neurônios sensitivos, vulneráveis aos efeitos adversos do quimioterápico (CAROZZI et al., 2015). Dentre os mecanismos que têm sido propostos para o

entendimento dos fenômenos moleculares acerca do desenvolvimento e manutenção da DNIC, está a participação de PRRs, como demonstrado, por exemplo, por Park et al (2014) em que camundongos TLR3<sup>-/-</sup>; TLR4<sup>-/-</sup> e Myd88<sup>-/-</sup> submetidos a 6 administrações em 6 dias consecutivos de 2,3mg/kg de cisplatina apresentaram aumentado limiar de retirada de pata quando comparada aos animais selvagens, indicando um papel importante desses PRRs bem como da via de sinalização desencadeada por estes no desenvolvimento de DNIC. Outro estudo publicado por Luo et al. (2019) demonstra que o receptor TLR9, relacionado ao reconhecimento de material genético, é importante para o desenvolvimento de dor neuropática induzida por paclitaxel em camundongos, uma vez que animais com TLR9 mutado apresentaram atraso no desenvolvimento de dor neuropática.

Nesse sentido, a participação de PRRs que atuam no reconhecimento de material genético parece ser importante para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida por quimioterápicos. A via de sinalização cGAS-STING também é ativada em resposta a presença de DNA (MOTWANI et al., 2019). Entretanto, estes sensores estão localizados no citoplasma e são desencadeados pela presença anormal de DNA citoplasmático, como acontece em infecções virais; infecções bacterianas; dano mitocondrial com escape de mtDNA; entre outros (BARBER, 2015; ISHIKAWA e BARBER, 2008; ISHIKAWA et al., 2009).

Nesse contexto, evidências emergentes sugerem que o dano mitocondrial atua como um elemento primordial para o desenvolvimento de DNIC (MAJ et al., 2017). Foi demonstrado que o tratamento de camundongos com cisplatina promove estresse celular de modo a provocar alterações mitocondriais não somente nos neurônios sensitivos do GRD mas também na medula espinal, além do desenvolvimento de DNIC. Modificações como acúmulo de p53, redução do potencial de membrana mitocondrial, perda de função e desestruturação da morfologia foram detectadas no sistema somatossensorial destes animais (MAJ et al., 2017).

Interessantemente, a prevenção do dano mitocondrial através da administração de um inibidor de p53 mitocondrial nesse mesmo estudo impediu o desenvolvimento de DNIC, reforçando a ideia de que o dano mitocondrial de fato representa um fenômeno indutor de DNIC (MAJ et al., 2017).

Associado a isso, um outro estudo, publicado por Maekawa et al (2019), demonstrou no contexto de lesão renal aguda induzida por cisplatina que o tratamento com o quimioterápico em camundongos permeabiliza a membrana mitocondrial de células renais com consequente escape de mtDNA para o citoplasma. Ademais, a presença de mtDNA no citoplasma foi capaz de ativar a via cGAS-STING com consequente indução da produção de citocinas inflamatórias.

Nesse sentido, hipotetizamos que fenômenos similares ocorrem no GRD de camundongos submetidos a administração de cisplatina. Este estudo é significativo e inovador uma vez que caracterizamos pela primeira vez a participação de STING na dor neuropática induzida por cisplatina e porque vários medicamentos direcionados a STING estão em ensaios clínicos ou já estão no mercado e podem ser rapidamente reaproveitados para aliviar a dor neuropática de pacientes com câncer submetidos a terapêutica com cisplatina.

Nesse contexto, nossa primeira pergunta foi justamente se o tratamento com cisplatina poderia, de maneira semelhante como ocorre em células tubulares renais estimuladas com este quimioterápico (MAEKAWA et al., 2019), gerar injúria mitocondrial nas células do GRD de camundongos tratados com consequente escape de mtDNA para o citoplasma. Como indicativo disso, quantificamos o DNA dupla fita presente no citosol de células de GRD de camundongos submetidos às injeções com cisplatina. Interessantemente, observamos aumento na quantidade de DNA dupla fita presente no citosol destas células quando comparado ao grupo controle. É possível considerar, portanto, que a cisplatina induz o escape de mtDNA para o citoplasma de células do GRD, isso porque durante o processamento das amostras,

conseguimos extrair tão somente o citosol das células, excluindo-se dessa maneira a interferência de DNA dupla fita proveniente do núcleo destas células. Assim, nossos dados envolvendo o modelo de DNIC vão ao encontro dos resultados obtidos por Maekawa et al. (2019) envolvendo o modelo de lesão aguda renal, reforçando a possibilidade da ativação do sensor STING por escape de mtDNA citoplasmático.

Em que pese Donelli et al. (2021) ter avaliado e descrito previamente a expressão de STING em diferentes subtipos de neurônios sensoriais presentes no GRD de camundongos, vale ressaltar que a análise de expressão desempenhada neste estudo foi baseada em dados de bulk-RNAseq produzidos com neurônios geneticamente classificados (Zheng et al., 2019). A análise realizada a partir de dados obtidos por bulk-RNAseq possui desvantagem quando comparada a análise com dados obtidos por sequenciamento de RNA de célula única, isso porque na primeira técnica, não é possível a identificação específica de quais células estão sendo responsáveis pela expressão de determinado gene; ainda que realizada com neurônios geneticamente classificados como realizado por Zheng et al. (2019).

Com intuito de obter uma análise mais eficiente acerca da expressão de STING nos diferentes subtipos de neurônios sensitivos, utilizamos um banco de dados provenientes de sequenciamento de RNA de núcleo único realizado com o GRD de camundongos selvagens (RENTHAL et al., 2020 - GSE154659). A re-análise realizada demonstrou a expressão de STING em diversos subtipos neuronais, sendo que as subpopulações de nociceptores e pruriceptores chamaram a atenção pela expressão acentuada de STING quando em comparação com os outros subtipos.

Nesse sentido, nossos dados acerca da expressão acentuada de STING em nociceptores e pruricetores vão ao encontro de trabalhos como o de Donelli et al. (2021) e Li et al. (2023), respectivamente. No primeiro, é demonstrado que STING exerce papel importante no controle da nocicepção em modelos animais traumático, químico e de câncer;



enquanto que o segundo trabalho demonstra que o STING também desempenha papel importante no controle da coceira em camundongos.

Confirmamos a expressão de STING em neurônios sensitivos através de hibridização *in situ* em GRD de camundongos selvagens. De fato, foi observada a marcação de TMEN173 em corpos celulares de neurônios peptidérgicos (CGRP+) e não-peptidérgicos (IB4+). Ambas as populações mencionadas fazem parte do heterogêneo grupo de nociceptores de fibras não mielinizadas tipo C (BASBAUM et al., 2009).

Dados *in vivo* na literatura apontam tão somente aumento dos níveis proteicos de cGAS e STING no córtex renal de camundongos submetidos a administração de cisplatina no contexto de lesão renal aguda (MAEKAWA et al., 2019). Ademais, dados *in vitro* em que há estimulação de células HK-2 com cisplatina durante 48 horas demonstram aumento da expressão de mRNA tanto de STING quanto de cGAS (MAEKAWA et al., 2019). Apesar de não termos encontrado alteração na expressão de mRNA do sensor STING nem de cGAS nos diferentes segmentos do sistema somatossensorial (GRD e medula espinal) de camundongos submetidos a administração de cisplatina, não fica descartada a hipótese de que estes sensores estejam sendo ativados, isso porque a avaliação da expressão de mRNA não determina necessariamente que esteja ocorrendo ativação dos sensores.

Nesse sentido, fomos investigar definitivamente o papel do sensor STING no desenvolvimento e manutenção da DNIC. Como ferramenta para isto, utilizamos animais em que o gene TMEN173 mutado impede a formação da proteína referente ao sensor STING. Primeiramente, é importante dizer que quando estes animais foram submetidos à análise de comportamento nocifensivo em condições basais, não foram observadas diferenças nas respostas à estimulação mecânica (por filamentos de Von Frey) ou térmica (estimulação com acetona) quando comparado a animais selvagens. Estes dados foram confirmados com os mesmos animais no laboratório de nosso colaborador Prof. Dr. Temugin Berta, na

Universidade de Cincinnati (EUA) (dados não mostrados). Ademais, um estudo envolvendo modelo de osteoartrite experimental com camundongos STING<sup>-/-</sup> demonstrou comportamento nocifensivo basal destes animais em resposta à estimulação mecânica comparável a de animais selvagens (SHIN et al., 2023). Em contrapartida, resultados obtidos com os mesmos animais por Donelli et al. (2021) e Wang et al. (2021) demonstram que os animais STING GT apresentam hipersensibilidade à estimulação mecânica e térmica em condições basais. Em que pese ter sido demonstrado que os neurônios sensitivos do GRD de camundongos STING GT apresentam aumento no disparo de potenciais de ação, não é demonstrada nenhum mecanismo ou se quer sugerida qualquer hipótese tentando explicar o motivo dessa hipersensibilidade basal.

Quando submetidos ao modelo de DNIC, animais STING GT apresentaram aumentado limiar de retirada de pata e reduzida frequência de resposta ao longo dos dias avaliados, indicando papel pró-nociceptivo do sensor STING neste contexto. Isso indica que a ablação total de STING em camundongos foi capaz de proteger os animais do desenvolvimento de DNIC. Interessantemente, tanto animais selvagens quanto animais STING GT não apresentaram alteração de comportamento nociceptivo em resposta à estimulação térmica com acetona. É possível que a dose utilizada não tenha sido suficiente para indução de sensibilidade ao frio; conforme demonstrado por Ta et al. (2009) nem mesmo a administração de uma dose cumulativa de 23 mg/kg de cisplatina foi capaz de induzir resposta nocifensiva ao frio em camundongos C57/BL6 no teste de placa fria. Em contrapartida, Becker et al. (2023) demonstrou que camundongos Swiss desenvolvem sensibilidade ao frio pelo teste de acetona em resposta ao tratamento com cisplatina em uma dose cumulativa de 13,8 mg/kg.

Foi observado também tanto animais selvagens quanto animais STING GT se recuperaram da DNIC uma vez que o limiar de retirada de pata começou a aumentar a partir

do oitavo dia, assim como a frequência de resposta começou a diminuir. Isso pode ser explicado em parte pela atuação de mecanismos protetivos inerentes às células. A cisplatina tem como principal efeito nas células a formação de ligações cruzadas entre purinas, que podem ser reparadas a partir de mecanismos celulares como o reparo de excisão de nucleotídeo (REN) e o reparo de excisão de base (REB) (CALLS et al., 2020). A recuperação dos animais pode refletir a reparação destas ligações cruzadas ao longo do tempo restabelecendo condições homeostáticas o suficiente para o adequado funcionamento dos sistemas nociceptivos. Além disso, também verificamos a ausência da expressão aumentada de citocinas inflamatórias no sistema somatossensorial (GRD e medula espinal) 8 e 14 dias após a primeira administração de cisplatina, o que também pode ter contribuído para a recuperação dos animais.

O papel pró-nociceptivo do sensor STING foi confirmado através do tratamento de camundongos submetidos a DNIC com o antagonista de STING, C-176. Este fármaco faz uma ligação covalente com resíduos de cisteína impedindo o recrutamento de TBK1 no complexo de golgi e, conseqüentemente, prejudica o prosseguimento da sinalização (HAAG et al., 2018). Ademais, segundo Haag et al. (2018), quanto a farmacodinâmica deste antagonista, foi identificado que o C-176 atua promovendo uma ligação irreversível no resíduo 91 transmembrana de cisteína. Diante disso e corroborando os dados com animais STING GT, o tratamento com antagonista de STING promoveu efeito protetor contra o desenvolvimento de DNIC.

Neste trabalho, demonstramos não somente que o sensor STING, mas também o sensor cGAS desempenham um papel importante no desenvolvimento da DNIC. Isso porque foi observado que camundongos deficientes para cGAS foram protegidos contra o desenvolvimento de DNIC. Na literatura, trabalhos avaliando o papel de cGAS em camundongos nocautes para esse sensor em modelos de dor crônica são inexistentes.

A atuação do sensor STING no contexto da dor neuropática tem sido demonstrada em diferentes populações celulares. Por exemplo, Wu et al. (2022) foi demonstrado que em ratos (WU et al., 2022) e camundongos (SUN et al., 2022) submetidos ao modelo traumático de lesão do nervo poupado ocorre ativação espinal da via cGAS-STING em neurônios e na micróglia; ademais, foi realizada associação entre a ativação da via cGAS-STING com a polarização do tipo M1 microglial, sendo que a inibição desta via através da administração do antagonista C-176 provocou diminuição na ativação microglial e aumento do limiar de retirada de pata dos animais submetidos a SNI.

Nesse trabalho, devido a: 1) evidências demonstrando que o dano mitocondrial causado pela administração de cisplatina ocorre em neurônios sensitivos do GRD de camundongos (MAJ et al., 2017) e 2) O dano mitocondrial pode estar associado a ativação da via cGAS-STING quando há escape citoplasmático de mtDNA (MOTWANI et al., 2019); nos concentramos em verificar se o STING expresso especificamente em neurônios sensitivos do GRD seria determinante para o fenótipo protetivo observado.

Para isso, utilizamos camundongos em que o sensor STING foi geneticamente deletado especificamente de neurônios sensitivos do GRD ( $PIRT^{CRE}STING^{loxP}$ ) bem como camundongos em que o sensor STING é deletado especificamente em nociceptores do GRD ( $Nav1.8^{CRE}STING^{loxP}$ ). Vale ressaltar que ambos os animais apresentaram comportamento nocifensivo em condições basais similar ao de animais selvagens, ou seja, esses animais não possuem alterações intrínsecas nos sistemas nociceptivos. Isto está de acordo com dados da literatura, visto que Donelli et al. (2021) e Wang et al. (2021) também observaram que animais  $Nav1.8^{CRE}STING^{loxP}$  apresentam comportamento nocifensivo em condições basais similar ao de animais selvagens.

Notavelmente, quando camundongos  $PIRT^{CRE}STING^{loxP}$  foram submetidos às injeções de cisplatina, os mesmos foram protegidos do desenvolvimento da DNIC, indicando que o

STING expresso em neurônios sensitivos, especificamente em nociceptores, são determinantes para a observação do fenótipo protetivo. Os mesmos eventos observados em camundongos Nav1.8<sup>CRE</sup>STING<sup>loxP</sup> machos foram também observados em fêmeas, indicando que não existem diferenças entre machos e fêmeas. Os trabalhos de Donelli et al. (2021) e Wang et al. (2021) também demonstram que não há diferença entre machos e fêmeas dentro dos mecanismos propostos de cada estudo.

Mecanicamente, a ativação do sensor STING promove a ativação de dois fatores de transcrição que são responsáveis pela indução de genes associados a citocinas inflamatórias. Um destes fatores é o IRF3 e sua ativação leva a indução de interferons do tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) que podem atuar de maneira autócrina ou parácrina sobre seus receptores (IFNAR), sendo fortemente associados a defesa do hospedeiro contra infecções virais (MOTWANI et al., 2019). Outro fator de transcrição ativado por STING é o NF- $\kappa$ B que leva a indução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 (MOTWANI et al., 2019).

Interessantemente, ao analisar a expressão de mRNA das citocinas que podem ser induzidas pela ativação de STING, verificamos tão somente a expressão aumentada de IL-6 no GRD de animais submetidos às injeções de cisplatina 4 dias após a primeira administração. Notavelmente, o aumento da expressão de IL-6 no dia 4 coincide com o pico de dor em animais selvagens, visto que neste tempo há o menor limiar de retirada de pata registrado do grupo. Ademais, essa expressão aumentada de IL-6 foi abolida em camundongos STING GT, o que sugere fortemente que a IL-6 induzida por STING em resposta ao tratamento com cisplatina seria determinante para o desenvolvimento da DNIC. De fato, quando camundongos IL-6<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo de DNIC, estes animais foram protegidos do desenvolvimento da dor, indicando que a IL-6 desempenha papel primordial para o desenvolvimento de DNIC.

Demonstramos também que a administração do agonista de STING, CAY10748, na pata de camundongos selvagens por si só foi capaz de induzir redução do limiar de retirada de pata nos animais. Entretanto, esse efeito foi abolido em animais IL-6<sup>-/-</sup> indicando que a produção de IL-6 é necessária para a dor induzida pelo agonista de STING.

Uma vez demonstrado que o STING expresso em neurônios sensitivos é responsável pelo desenvolvimento de DNIC; que a ativação de STING por si só induz dor e que a IL-6 tem um papel preponderante em ambos eventos, avaliamos a expressão de IL-6 em neurônios sensitivos do GRD estimulados com agonista de STING. Nesse sentido, desempenhamos uma cultura de neurônios sensitivos do GRD de camundongos e estimulamos com CAY10748. O resultado mostrou aumento da expressão de IL-6 nestas células, o que indica que são capazes de induzir o transcrito de IL-6. Juntos, esses dados sugerem que a ativação de STING em resposta a administração de cisplatina induz a produção de IL-6 por neurônios sensitivos sendo este evento necessário para o desenvolvimento da DNIC.

A produção de IL-6 no sistema somatossensorial de camundongos submetidos a modelos de dor neuropática é bem descrita, por exemplo, em modelos traumáticos como lesão do nervo poupado e injúria por constrição crônica (HU et al., 2020) bem como modelos químicos como o induzido por paclitaxel (HUEHNCHEN et al., 2020). No tocante à exploração da produção e sinalização de IL-6 no sistema somatossensorial de animais tratados com cisplatina, praticamente não existem estudos. O que a literatura tão somente aponta é a capacidade de células satélites, presentes no gânglio da raiz dorsal, estimuladas com cisplatina de produzirem IL-6 (LEO et al., 2021). Interessantemente, este mesmo estudo também demonstra que a IL-6 derivada de células satélite estimuladas com cisplatina é capaz de alterar as propriedades eletrofisiológicas de neurônios sensitivos do GRD de camundongos. Nesse sentido, em que pese não termos explorado a produção de IL-6 em células satélite de

animais tratados com cisplatina, é possível que parte da produção de IL-6 seja proveniente das mesmas.

Um questionamento importante é a partir de quais mecanismos a produção de IL-6 por neurônios sensitivos estaria induzindo o desenvolvimento de DNIC. Nesse sentido, acreditamos que a IL-6 produzida atue de forma autócrina nas próprias células neuronais, ligando-se a receptores na superfície da membrana plasmática destas células. De fato, já é conhecido que neurônios sensitivos, incluindo nociceptores, do gânglio da raiz dorsal expressam o receptor de IL-6, a glicoproteína GP130, em sua superfície de membrana; sendo este receptor associado ao desenvolvimento de dor neuropática (PINHO-RIBEIRO et al., 2017; ANDRATSCH et al., 2009; KALPACHIDOU et al., 2022).

A GP130, atua como a subunidade receptora de transdução de sinal de IL-6, sendo que este receptor homodimeriza apenas se ativado pelos complexos IL-6/IL-6R, iniciando então a sinalização JAK/STAT que é essencial para a imunidade inata, bem como para as funções neuronais (HUNG et al., 2017). O envolvimento do eixo IL-6/IL-6R/GP130 é associado ao desenvolvimento de dor neuropática em murinos submetidos a modelos traumáticos, químicos, por diabetes e por infecções virais (HUNG et al., 2017; LU et al., 2021; ZHOU et al., 2016). O principal mecanismo de desenvolvimento de dor associado a ativação do eixo IL-6/IL-6R/GP130 em neurônios sensitivos é a indução do aumento da expressão de ambos os canais TRPA1 e TRPV1, gerando o rompimento da homeostasia dos sistema nociceptivos pela alteração das propriedades eletrofisiológicas destas células (PINHO-RIBEIRO et al., 2017; ANDRATSCH et al., 2009; KALPACHIDOU et al., 2022). O estudo publicado por Kalpachidou et al. (2022) demonstrou que camundongos em que a GP130 foi seletivamente deletada em nociceptores são protegidos do desenvolvimento de dor neuropática induzida por modelo traumático sendo este efeito associado ao aumento da expressão de TRPA1 dependente da sinalização da GP130. Nesse contexto, é possível que estes mecanismos

também estejam relacionados ao desenvolvimento de DNIC através da produção de IL-6 proveniente da ativação de STING em nociceptores.

Interessantemente, Hu et al. (2020) mostrou, a partir da indução de modelo traumático de injúria do nervo ciático em camundongos, que as células de Schwann de animais submetidos ao modelo de dor liberam fator neurotrófico ciliar (CNTF) no qual se liga ao seu receptor CNTFR expresso na membrana axonal, induzindo a fosforilação do fator de transcrição STAT3. Além disso, é demonstrado que o STAT3 fosforilado alcança os neurônios sensitivos do GRD a partir de transporte axonal retrógrado, induzindo a expressão aumentada de IL-6 nestas células. Esta produção de IL-6 em neurônios sensitivos foi capaz de induzir a ativação microglial na medula espinal culminando em dor neuropática. Não podemos descartar a hipótese de que eventos similares aos observados por Hu et al. (2020) aconteçam com animais submetidos ao modelo de DNIC. Entretanto, vale ressaltar que não observamos microgliose nem astrogliose na medula espinal de camundongos tratados com cisplatina, indicando que os eventos moleculares responsáveis pela indução de DNIC parecem ficar restritos à periferia dos sistemas nociceptivos.

Corroborando essa idéia, vale salientar que devido a presença de barreira hematoencefálica abrangendo a medula espinal, a cisplatina quase não penetra neste tecido (PÉREZ et al., 2019). De fato, o estudo publicado por Jacobs (2010) mostra que menos de 5% da concentração plasmática de cisplatina administrada por via intravenosa (2mg/kg) em primatas penetra no sistema nervoso central destes animais; o que pode ajudar a explicar a ausência de ativação glial bem como ausência da expressão aumentada de citocinas na medula espinal de camundongos tratados com cisplatina.

Um outro fator de transcrição que pode ser ativado a partir da via cGAS-STING é o STAT6, que induz a expressão de genes associados a quimiocinas como CCL2 e CCL26, relacionadas com a migração de leucócitos para os tecidos injuriados (MOTWANI et al.,



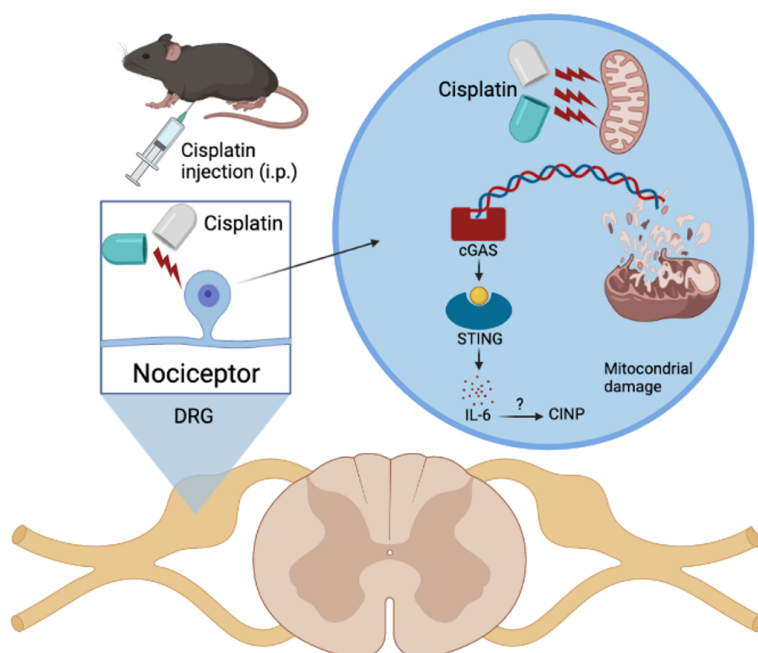
2019). Nesse contexto, quando verificamos a migração de leucócitos para o GRD de camundongos submetidos às injeções de cisplatina, não observamos alteração quando comparado ao GRD de animais controle, indicando que, em que pese o tratamento com cisplatina atue na indução de STING, não observamos migração de leucócitos indicando que possivelmente não há atuação do fator STAT6, reforçando também a ideia de que os eventos moleculares ficam restritos as próprias células do GRD.

Interessantemente, Donelli et al. (2021) e Wang et al. (2021) demonstram que a produção no GRD de interferons do tipo I resultante da ativação da via cGAS-STING aumenta o limiar de retirada de pata de camundongos submetidos aos modelos traumático, químico (paclitaxel) e de câncer ósseo. De fato, é demonstrado que camundongos submetidos a administração de paclitaxel, por exemplo, param de sentir dor quando é injetado agonista de STING (DMXAA ou ADU-S100) por via intratecal (DONELLI et al., 2021). Foi mostrado que esta ativação de STING induz a produção de interferons do tipo I por neurônios sensitivos do GRD de camundongos que poderiam estar atuando nestas próprias células, uma vez que também foi observada a expressão de IFNAR nas mesmas (DONELLI et al., 2021). Esses dados sugerem uma atividade antinociceptiva dos interferons do tipo I induzidos por STING.

Interessante notar que não observamos expressão aumentada de interferons do tipo I no GRD e na medula espinal de animais submetidos a administração de cisplatina, o que explicaria a ausência de um possível efeito antinociceptivo em camundongos IFNAR<sup>-/-</sup>. Ademais, quando administramos CAY10748 na pata de camundongos selvagens e IFNAR<sup>-/-</sup>, ambos desenvolvem redução do limiar de retirada de pata, o que reforça a ideia de que os interferons do tipo I não estão relacionadas a um efeito pró-nociceptivo. É plausível considerar que essa contradição entre efeito pró-nociceptivo e antinociceptivo no que tange a ativação do sensor STING está diretamente associado ao tipo de citocina que essa ativação resultará, visto que neurônios sensitivos do GRD de camundongos apresentam a expressão de

receptores que respondem a produção de IL-6 e interferons do tipo I. Assim, a determinação de um fenótipo protetivo ou não parece ficar a cargo do fator de transcrição que será engajado após a ativação de STING: a fosforilação de NF- $\kappa$ B com consequente produção de IL-6 estando relacionada a um fenótipo pró-nociceptivo enquanto que a fosforilação de IRF3 com consequente produção de interferons do tipo I relacionada a um fenótipo anti-nociceptivo. Nesse sentido, esforços devem ser feitos para descobrir o que determina a inclinação da via STING para engajamento de um ou de outro fator de transcrição.

Neste trabalho, demonstramos que a administração de cisplatina induz o desencadeamento da via de sinalização cGAS-STING em nociceptores do GRD possivelmente em resposta ao dano mitocondrial com consequente escape de mtDNA para o citoplasma destas células. A ativação de STING promove a expressão aumentada de IL-6 em nociceptores sendo este evento determinante para o desenvolvimento de DNIC. Os mecanismos acerca da atuação da IL-6 induzida por STING no desenvolvimento desta condição precisam ser melhor investigados visando o entendimento pleno da fisiopatologia da DNIC. Assim, a anulação da ativação do sensor STING em camundongos através de estratégias genéticas e farmacológicas demonstrou-se eficaz para evitar o desenvolvimento de DNIC tornando a via cGAS-STING um alvo a ser discutido para futuros tratamentos de dor neuropática.



**Ilustração 3: Modelo esquemático acerca da ativação da via cGAS-STING em nociceptores de camundongos submetidos ao tratamento com cisplatina.** Uma vez administrada, a cisplatina alcança os nociceptores presentes no gânglio da raiz dorsal, desprovido de barreira hematoencefálica, onde promove dentre outros efeitos, a injúria mitocondrial com conseqüente escape de mtDNA para o citoplasma. O mtDNA é reconhecido pelo sensor cGAS no citoplasma, gerando a produção do dinucleotídeo cíclico cGAMP. O cGAMP é reconhecido pelo sensor STING culminando na indução de genes associados a citocinas inflamatórias, como a IL-6, que é preponderante para o desenvolvimento de DNIC (Fonte: próprio autor).

***Conclusão***

## 6. Conclusão

O conjunto de dados apresentados permite concluir que o sensor STING expresso em nociceptores é primordial para o desenvolvimento e manutenção da DNIC a partir da indução de IL-6 nestas células. Ademais, a ativação do sensor STING ocorre possivelmente por conta da injúria mitocondrial com conseqüente escape de mtDNA para o citoplasma de nociceptores de camundongos submetidos a administração sistêmica de cisplatina. Estes mecanismos representam uma nova abordagem para elucidar os mecanismos envolvidos não somente da dor neuropática induzida por quimioterápicos mas também para dor crônica em geral bem como reforça a ideia de um possível alvo terapêutico para o manejo da dor.



## 7. Referências

- ABE, T. et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Molecular Cell*, **50**(1):5-15 (2013).
- AGUIRRE, S. et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathogens*, **8**(10):e1002934 (2012).
- AHN J., BARBER G.N. Self-DNA, STING-dependent signaling and the origins of autoinflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, **31**:121–126 (2014).
- AKIRA, S. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**(4):783-801 (2006).
- ALAEDINI, A. et al. Up-regulation of apoptosis and regeneration genes in the dorsal root ganglia during cisplatin treatment. *Experimental Neurology*, **210** (2):368-374 (2008)
- ANDRATSCH, M. et al. A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathological pain. *The Journal of Neuroscience*, **29**(43):13473-83 (2009).
- AUTHIER, N. et al. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Experimental Neurology*, **182**(1):12-20 (2003).
- BARBER, G. N. STING: infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, **15**(12):760-770 (2015).
- BASBAUM AI, BAUTISTA DM, SCHERRER G, JULIUS D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, **139**:267–84 (2009).
- BECKER, G. Kinin B1 and B2 Receptors Contribute to Cisplatin-Induced Painful Peripheral Neuropathy in Male Mice. *Pharmaceutics*, **15**(3):852 (2023).
- BOEHMERLE, W. et al. Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Scientific Reports*, **4**:6370 (2014).
- BOLCSKEI, K Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*, **117**(3):368-376 (2005).
- BOUHASSIRA D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, **136**(3):380-387 (2008).

CALLAGHAN, B. C. et al. Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurology*, **11**(6): 521–534 (2012).

CALLS, A. et al. Pathogenesis of platinum-induced peripheral neurotoxicity: Insights from preclinical studies. *Experimental Neurology*, **325**:1131-1141 (2020).

CANTA, A. et al. Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). *Toxic*, **3**(2):198-223 (2015).

CAROZZI, V. A. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neuroscience Letters*, **596**:90-107 (2015).

CAVALETTI, G. et al. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol. *Experimental Neurology*, **133**(1):64-72 (1995).

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, **5**;348:f7656 (2014).

COLLOCA L, LUDMAN T, BOUHASSIRA D, BARON R, et al. Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*, **3**:17002 (2017).

CONSTANTIN, C. E. et al. Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. *The Journal of Neuroscience*, **28**(19):5072-81 (2008).

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*, **32**:1-32 (2009).

COULL JÁ. et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, **438**(7070):1017-21 (2005).

DECOUT, A. et al. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature Reviews - Immunology*, **21**(9):548-569 (2021).

DEVOR, M. Neuropathic pain and injured nerve: peripheral mechanisms. *British Medical Bulletin*, **47**(3):619-30 (1991).

DONELLI, C.R. et al. STING controls nociception via type I interferon signalling in sensory neurons. *Nature*, **591**:275-280 (2021).

DOS SANTOS, N. A. G. et al. Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents. *Food and Chemical Toxicology*, **136**:111079 (2020).



DWORKIN, R. H. Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clinic Proceedings*, **85**(3 Suppl):S3-14 (2010).

DYSON, P. J.; SAVA, G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Transactions*, **28**;(16):1929-1933 (2006).

EBBINGHAUS, M. et al. The role of interleukin-1 $\beta$  in arthritic pain: main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **64**(12):3897-907 (2012).

FANG, D. et al. Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain*, **156**(6):1124-1144 (2015).

FELDMAN, E. L. et al. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, **93**(6):1296-1313 (2017).

FINNERUP, N. B. et al. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment. *Physiological Reviews*, **101**(1):259-301 (2021).

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, **88**:(102)9-25 (2019).

GUDES, S. et al. The role of slow and persistent TTX-resistant sodium currents in acute tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated increase in nociceptors excitability. *Journal of Neurophysiology*, **113**: 601–619 (2015).

GREGG, R.W. et al. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *Journal of Clinical Oncology*. **10**:95–803 (1992).

HAAG, S. M. et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. *Letter*, **559**:269-273 (2018).

HU, Z. et al. CNTF-STAT3-IL-6 Axis Mediates Neuroinflammatory Cascade across Schwann Cell-Neuron-Microglia. *Cell Reports*, **31**(7):107657, (2020).

HUNG, A. L. et al. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. *Scandinavian Journal of Pain*, **17**:287-293 (2017).

HUEHNCHEN, P. et al. Blockade of IL-6 signaling prevents paclitaxel-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Cell Death & Disease*, **11**(1):45 (2020).

ISHIKAWA H, BARBER GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, **455**:674–678, (2008).

ISHIKAWA H. et al. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, **461**:788–792, (2009).

JACOBS, S. et al. Extracellular fluid concentrations of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in brain, muscle, and blood measured using microdialysis in nonhuman primates. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **65**(5):817-24 (2010).

JAVED, U. A.; MALIK, R. A. Treating Diabetic Neuropathy: Present Strategies and Emerging Solutions. *The Review of Diabetic Studies*, **12**(1-2):63-83 (2015).

JI, R.; WEN, Y. Neural-glia interaction in the spinal cord for the development and maintenance of nerve injury-induced neuropathic pain. *Drug Development Research*, **67**:331–338 (2006).

JI, R. et al. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, **154** Suppl 1(0 1):S10-S28 (2013).

JI, R. et al. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science*, **354**(6312):572-577 (2016).

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**(6852):203-10 (2001).

KALPACHIDOU, T. Genetic and functional evidence for gp130/IL6ST-induced transient receptor potential ankyrin 1 upregulation in uninjured but not injured neurons in a mouse model of neuropathic pain. *Pain*, **163**(3):579-589 (2022).

KALSO, E. et al. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain*, **112**(3):372-380 (2004).

KRARUP-HANSEN, A. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. *Brain*, **130**(4):1076-88 (2007).

KUMAR, H. et al. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews in Immunology*, **30**(1):16-34 (2011).

LAM, E. et al. Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. *Journal of Virology*, **88**(2):974-81 (2014).

LAND, W. G. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, **15**(1):e9-e21 (2015).

LAUMET, G. et al. Cisplatin educates CD8<sup>+</sup> T cells to prevent and resolve chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice. *Pain*, **160**(6):1459-1468 (2019).

LEO, M. et al. Cisplatin-induced activation and functional modulation of satellite glial cells lead to cytokine-mediated modulation of sensory neuron excitability. *Experimental Neurology*, **341**:113695 (2021).

LI, D. et al. Preventive Effects of Bee Venom Derived Phospholipase A<sub>2</sub> on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice. *Toxins*, **8**(1):27 (2016).

LI, N. STING controls opioid-induced itch and chronic itch via spinal tank-binding kinase 1-dependent type I interferon response in mice. *Journal of Neuroinflammation*, **20**:101 (2023).

LIU D, YANG PS. Minocycline hydrochloride nanoliposomes inhibit the production of TNF-alpha in LPS-stimulated macrophages. *International Journal of Nanomedicine*, **7**:4769–75 (2012).

LIU, J. J. Contributions of rat Ctr1 to the uptake and toxicity of copper and platinum anticancer drugs in dorsal root ganglion neurons. *Biochemical Pharmacology*, **85**(2):207-215 (2013).

LOESER, J. D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, **137**(3):473-477 (2008).

LU, H. et al. Neuroinflammation in HIV-Related Neuropathic Pain. *Frontiers in Pharmacology*, **12**:653852 (2021).

LUO, X. et al., Macrophage Toll-like Receptor 9 Contributes to Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain in Male Mice. *The Journal of Neuroscience*, **39**(35):6848-6864 (2019).

MAEKAWA, H. et al. Mitochondrial Damage Causes Inflammation via cGAS-STING Signaling in Acute Kidney Injury. *Cell Reports*, **29**(5):1261-1273 (2019).

MAJ, M. A. Inhibition of Mitochondrial p53 Accumulation by PFT- $\mu$  Prevents Cisplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **10**: 108 (2017).

MALSCH, P. et al. Deletion of interleukin-6 signal transducer gp130 in small sensory neurons attenuates mechanonociception and down-regulates TRPA1 expression. *The Journal of Neuroscience*, **34**(30):9845-56 (2014).

- MELZACK, R. Pain and the neuromatrix in the brain. *Journal of Dental Education*, **65**(12):1378-82, (2001)
- MILLS, S. et al. Identification and Management of Chronic Pain in Primary Care: a Review. *Current Psychiatry Reports*, **18**(2):22 (2016).
- MITZEL, D. N. et al Age-enhanced endoplasmic reticulum stress contributes to increased Atg9A inhibition of STING-mediated IFN- $\beta$  production during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Journal of Immunology*, **192**(9):4273-83 (2014).
- MOTWANI M. et al. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nature Reviews Genetics*, **20**(11):657-674 (2019).
- NAZIROGLU, M. Thermo-Sensitive TRP Channels: Novel Targets for Treating Chemotherapy-Induced Peripheral. *Pain*, **8**:1040 (2017).
- NAZMI A. et al. Chronic neurodegeneration induces type I interferon synthesis via STING, shaping microglial phenotype and accelerating disease progression. *Glia*, **67**(7):1254-1276 (2019).
- OU, L. et al. The cGAS-STING Pathway: A Promising Immunotherapy Target. *Frontiers in Immunology*, **12**:795048 (2021).
- PARK, H. K. et al. Toll-like receptor signaling regulates cisplatin-induced mechanical allodynia in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **73**(1):25-34 (2014).
- PÉREZ, J. E. The effect of locally delivered cisplatin is dependent on an intact immune function in an experimental glioma model. *Scientific Reports*, **9**(1):5632 (2019).
- PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology*, **38**(1):5-19 (2016).
- RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, **161**(9):1976-1982 (2020).
- RENTHAL, W. et al. Transcriptional Reprogramming of Distinct Peripheral Sensory Neuron Subtypes after Axonal Injury. *Neuron*, **108**(1):128-144.e9 (2020).
- ROBINSON, C. R. et al. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*, **274**:308-17 (2014).
- RUIZ-MEDINA, J. Paclitaxel-induced neuropathic pain is age dependent and devolves on glial response. *European Journal of Pain*, **17**(1):75-85 (2013).

SALAT, K. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1-current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy. *Pharmacological Reports*, **72**(3):486-507 (2020).

SAUER, J. et al. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infection and Immunity*, **79**(2):688-94 (2011).

SHIN, Y. et al. STING mediates experimental osteoarthritis and mechanical allodynia in mouse. *Arthritis Research & Therapy*, **25**(1):90 (2023).

SIEGAL, T. HAIM, N. Cisplatin-induced peripheral neuropathy. Frequent off-therapy deterioration, demyelinating syndromes, and muscle cramps. *Cancer*, **66**(6):1117-1123 (1990).

SUN, C. et al. Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D Regulates Neuropathic Pain After Nerve Injury via the STING-IFN-I Pathway. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **15**:859166 (2022).

STAFF, N. P. et al. Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *Journal of Peripheral Nervous System*, **2**:26-39 (2019)

STARABOVA, H.; VETTER, I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in molecular neuroscience*, **31**:10:174 (2017).

TA, E. L. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Molecular Pain*, **6**:15 (2010).

TA, L. E. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Molecular Pain*, **26**:5:9 (2009).

VÉNÉREAU, E. et al. DAMPs from Cell Death to New Life. *Frontiers in Immunology*, **6**:422 (2015).

WANG, Y. et al. Sting is a critical regulator of spinal cord injury by regulating microglial inflammation via interacting with TBK1 in mice. *Biochemical and Biophysical research Communications*, **517**(4):741-748 (2019).

WANG, K. et al. STING suppresses bone cancer pain via immune and neuronal modulation. *Nature Communications*, **12**(1):4558 (2021).

WARWICK, R. A.; HANANI, M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *European Journal of Pain*, **17**(4):571-80 (2013).

WASEM, M. et al. Role of Mitochondrial Mechanism in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Current Drug Metabolism*, **19**(1):47-54 (2018).

WEST, A. P. et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Letters*, **520**:553–557 (2015).

WOODWARD, J. et al. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*, **328**(5986):1703-5 (2010).

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **288**(5472):1765-9 (2000).

WOOLF, C. J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, **353**(9168):1959-64 (1999).

WU, W. Pharmacological inhibition of the cGAS-STING signaling pathway suppresses microglial M1-polarization in the spinal cord and attenuates neuropathic pain. *Neuropharmacology*, **217**:109206 (2022).

ZHENG, Y. et al. Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties. *Neuron*, **103**(4):598-616 (2019).

ZHOU, H. et al. Co-expression gene modules involved in cisplatin-induced peripheral neuropathy according to sensitivity, status, and severity. *Journal of the peripheral nervous system*, **25** (4):366-376 (2020).

ZHOU, Y. et al. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *Journal of Neuroinflammation*, **13**:141 (2016).

ZHU, Q. et al. Cutting edge: STING mediates protection against colorectal tumorigenesis by governing the magnitude of intestinal inflammation. *Journal of Immunology*, **193**(10):4779-82 (2014).