



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

GABRIEL VICTOR LUCENA DA SILVA

**A interleucina 33 (IL-33) expressa por células mesenquimais é importante
para migração leucocitária durante degeneração walleriana do nervo
isquiático**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2021

GABRIEL VICTOR LUCENA DA SILVA

**A interleucina 33 (IL-33) expressa por células mesenquimais é importante
para migração leucocitária durante degeneração walleriana do nervo
isquiático**

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

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Ribeirão Preto – SP

2021

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD). Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRAFICA

Silva, Gabriel Victor Lucena

A Interleucina 33 (IL-33) expressa por células mesenquimais é importante para migração leucocitária durante a degeneração Walleriana do nervo isquiático. Ribeirão Preto, 2021. 69 p.

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Área de concentração: Imunologia. – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Cunha, Thiago Mattar.

1. Dor neuropática. 2. Células mesenquimais. 3. Neutrófilos. 4. Macrófagos. 5. Inflamação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, Gabriel Victor Lucena

Título: A interleucina 33 (IL-33) expressa por células mesenquimais é importante para migração leucocitária durante degeneração walleriana do nervo isquiático

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Sabrina Francesca de Souza Lisboa

Instituição: FCFRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias

Instituição: Unicamp

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, Rosalina Lucena, pelo amor, carinho, paciência mesmo à distância e pelo apoio em todas minhas trajetórias de vida pessoal e acadêmica. Por me incentivar sempre a buscar conhecimento, ser curioso e ter o pensamento crítico sobre tudo, sempre lembrarei de tudo que a senhora já me falou. Muito obrigado mãe.

“Nenhuma grande descoberta foi feita
jamais sem um palpite ousado.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Thiago Mattar Cunha muito obrigado pela oportunidade em compor seu grupo de pesquisa. Agradeço também por ter me recebido mesmo sem me conhecer e por aceitar me orientar e sou grato por todo aprendizado e as discussões que tivemos durante esses anos.

Aos professores Fernando Cunha e José Carlos Alves pelas importantes discussões científicas nas reuniões gerais e por serem profissionais dedicados ao desenvolvimento científico de maneira responsável e ética.

À minha namorada Timna Varela, que esteve comigo durante essa jornada do mestrado e sempre foi um pilar para mim nesses anos, obrigado por toda paciência, parceria e amor e obrigado pela ajuda em diversos ensinamentos ao longo dos anos.

A Elidiane Aníbal pela colaboração com os experimentos de citometria de fluxo, e diversas discussões e ensinamentos, sou muito agradecido pela sua paciência.

Ao Edson Oliveira pela colaboração com as análises de bioinformática, meu muito obrigado.

Agradeço aos meus amigos de pós-graduação e do Laboratório de Inflamação e Dor em especial: Jeimison Duarte, Ivaldo Filho, Ítalo Sousa, Julia Castro, Atlante Mendes, Isaac Fernandes, Rafaela Mano, Beatriz Adjafre.

A todos que compõem nosso grupo de pesquisa em dor, obrigado pelos ensinamentos e discussões semanais.

À Ieda Regina por sua competência, zelo em ensinar. Sem sua ajuda, metade desse projeto não seria executado da maneira mais correta.

Aos demais técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor Kátia, Serginho, Juliana, Marcela e Diva, obrigado por toda ajuda que nos dão. O trabalho de vocês é imprescindível.

A secretária do programa de imunologia básica e aplicada Ana Cristina, obrigado por estar à frente de todas as burocracias pertinentes ao seu trabalho e pelo seu suporte e atenção com os alunos.

Aos funcionários do biotério Orlando e Marquinhos, obrigado também pelos serviços prestados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo (FAPESP),
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo
financiamento da pesquisa científica realizada na Universidade de São Paulo e fora
dele.

Mais uma vez ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq) pelo suporte financeiro com a bolsa de estudos.

Aos funcionários responsáveis pela manutenção da FMRP, meu muito obrigado pelo
zelo e dedicação nos serviços diários prestados.

SILVA, G. V. L. **A interleucina 33 (IL-33) expressa por células mesenquimais é importante para migração leucocitária durante degeneração walleriana do nervo isquiático.** 2021. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

Lesões traumáticas ao sistema nervoso periférico levam a uma diminuição da função neuronal, devido a uma ruptura na bainha de mielina e danos aos axônios. Após a ruptura, os restos de mielina e axônios distais à lesão são degradados, processo chamado de degeneração Walleriana. A IL-33, uma citocina pertencente à família das IL-1, é liberada em resposta a lesões ou traumas, funcionando como um sinal de dano (alarmina), similar a citocina IL-1 α e grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), que são sinalizadoras de dano tecidual. Dessa forma, este estudo teve o objetivo de avaliar o papel da IL-33 na degeneração walleriana de nervo periférico. Foi realizada re-análise de sequenciamento de células únicas de nervo isquiático de camundongos não lesionados e lesionados nos dias 3 e 9 pelo modelo de transecção do nervo isquiático. A validação da presença de IL-33 no nervo isquiático foi averiguada por citometria de fluxo em camundongos IL-33^{Gfp/+} e IL-33^{Gfp/Gfp} submetidos em diferentes dias ao modelo de esmagamento do nervo (CNI). Realizamos a análise da expressão genica em diferentes dias por PCR-RT de IL-33 e do receptor IL1RL1 no nervo isquiático de camundongos submetidos em diferentes dias de CNI. Camundongos WT e com deleção total de IL-33 (IL-33^{Gfp/Gfp}) foram submetidos ao CNI e avaliados em testes comportamentais de alodinia mecânica, frequência de retirada de pata. A migração de leucócitos para o local da lesão foi observada por citometria de fluxo utilizando marcadores clássicos para diferentes células mieloides. Os resultados obtidos demonstraram que mais de 2300 genes foram diferencialmente expressos. A IL-33 está majoritariamente expressa em células mesenquimais e validamos essa presença por citometria de fluxo nos animais que expressam o fluoróforo na cor verde (GFP) na cadeia proteica da IL-33. A expressão de IL-33 foi a mesma em todos os dias avaliados de CNI, já o pico da expressão de IL1RL1 ocorreu apenas no terceiro dia ($p < 0,05$). As avaliações comportamentais demonstraram que, na ausência de IL-33, as respostas nociceptivas foram atenuadas em um contexto de dor neuropática induzida por CNI ($p < 0,05$). Durante a migração de células, na ausência de IL-33, ocorreu uma redução da migração no quinto dia após CNI, e uma diminuição no número de macrófagos maduros a partir da maturação de monócitos infiltrantes ($p < 0,05$). Em suma, a citocina IL-33 contribui para a migração de células e inflamação na degeneração Walleriana e consequentemente contribuindo para a dor neuropática induzida pela lesão.

Palavras chave: Dor neuropática, Células mesenquimais, Neutrófilos, Macrófagos, Inflamação.

SILVA, G. V. L. **Interleukin 33 (IL-33) expressed by mesenchymal cells is important for leukocyte migration during wallerian degeneration of the sciatic nerve.** 2021. Master 's Dissertation – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2021.

Traumatic injuries to the peripheral nervous system lead to a decrease in neuronal function, due to a rupture in the myelin sheath and damage to axons. After rupture, myelin debris and axons distal to the lesion are degraded, a process called Wallerian degeneration. IL-33, a cytokine belonging to the IL-1 family, is released in response to injury or trauma, functioning as a damage signal (alarmin), similar to IL-1 α cytokine and high mobility group 1 (HMGB1), which are signs of tissue damage. Thus, this study aimed to evaluate the role of IL-33 in peripheral nerve wallerian degeneration. Re-analysis of single cell sciatic nerve sequencing from uninjured and injured mice was performed on days 3 and 9 by sciatic nerve transection model. The validation of the presence of IL-33 in the sciatic nerve was verified by flow cytometry in IL-33^{Gfp/+} and IL-33^{Gfp/Gfp} mice on different days in the crush nerve injury (CNI) model. We performed an analysis of gene expression on different days by PCR-RT of IL-33 and IL1RL1 receptor in the sciatic nerve of mice on different days of the CNI. WT mice and mice with total IL-33 deletion (IL-33Gfp / Gfp) were discovered to the CNI and made in behavioral tests of mechanical allodynia, frequency of paw withdrawal. Leukocyte migration to the lesion site was observed by flow cytometry classical markers for different myeloid cells. The results obtained showed that more than 2300 genes were differentially expressed. IL-33 is mostly expressed in mesenchymal cells and we validated this presence by flow cytometry in animals that express the green fluorophore (GFP) in the IL-33 protein chain. IL-33 expression was the same in all days taken from the CNI, whereas the peak of IL1RL1 expression occurred only on the third day ($p < 0.05$). Behavioral assessments demonstrated that, in the absence of IL-33, such nociceptive responses were attenuated in a context of CNI-induced neuropathic pain ($p < 0.05$). During cell migration, in the absence of IL-33, there was a reduction in migration on the fifth day after CNI, and a decrease in the number of mature macrophages from the maturation of infiltrating monocytes ($p < 0.05$). In short, an IL-33 cytokine contributes to cell migration and inflammation in Wallerian degeneration and consequently contributes to injury-induced neuropathic pain.

Keywords: Neuropathic pain, Mesenchymal cells, Neutrophils, Macrophages, Inflammation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Lesões a nervos periféricos e degeneração Walleriana	16
1.2. Mecanismos envolvidos na degeneração Walleriana.....	17
1.3. Mecanismos envolvidos na recuperação funcional do tecido após degeneração Walleriana.....	19
1.4. Dor neuropática e degeneração Walleriana	20
1.5. Interleucina 33.....	22
1.6. Participação da IL-33 na dor e na regeneração do sistema nervoso central	24
2. OBJETIVO	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Animais.....	28
3.2. Re-análises de dados de sequenciamento de célula única	28
3.3. Modelo experimental de esmagamento do nervo isquiático	29
3.4. Avaliação nociceptiva	30
3.4.1. Avaliação nociceptiva mecânica – teste de von Frey filamentos.....	30
3.4.2. Avaliação nociceptiva mecânica – teste de von Frey eletrônico.....	31
3.4.3. Teste de Placa Quente (<i>Hot plate</i>)	31
3.4.4. Teste de locomoção induzida no rotarod.....	32
3.5. Coleta de amostras	32
3.6. Reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR).....	33
3.6.1. Avaliação da expressão gênica: Extração de RNAm e RT-PCR em tempo real.....	33
3.6.2. Coleta das amostras.....	33
3.6.3. Processamento das amostras e extração do RNAm	33
3.6.4. Síntese de DNAc e ensaio de qPCR em tempo real	34

3.7. Citometria de fluxo.....	35
3.8. Estatística.....	36
4. RESULTADOS	38
4.1. Análise da expressão gênica de IL33, Il1r1 e Il1Rap nos agrupamentos celulares presentes no nervo isquiático em diferentes dias de degeneração walleriana.....	38
4.2. Análise da presença de IL-33 em populações de origem mielóide e não mielóide utilizando animais transgênicos	46
4.3. Validação molecular da expressão gênica relativa em <i>time course</i> de marcadores celulares importantes e da expressão de IL-33 e IL1RL1 no nervo isquiático durante neuropatia induzida pelo CNI	48
4.4. A ausência da IL-33 não altera o comportamento nociceptivo fisiológico	50
4.5. A deleção de IL-33 atenua a dor neuropática induzida pelo CNI.....	51
4.6. Ausência de IL-33 reduz a migração leucocitária de macrófagos e neutrófilos para o local da lesão	53
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho representativo do modelo experimental de CNI.....	30
Figura 2. Análise de scRNA-seq demonstram as diferentes populações presentes no nervo ciático com lesão.....	42
Figura 3. Caracterização da IL-33, IL1RL1 e IL1Rap nas diferentes populações em diferentes dias de lesão do nervo isquiático.....	44
Figura 4. Esquema de gates para citometria de fluxo a fim de estudar as populações positivas para IL-33.....	46
Figura 5. Animais <i>Il33^{Gfp/Gfp}</i> e <i>Il33^{Gfp/+}</i> possuem a IL-33 em maior quantidade em células não mielóides no nervo isquiático e isto diminuiu durante a lesão por esmagamento CNI.....	47
Figura 6. Expressão gênica relativa em time course de IL-33, ST2 e marcadores celulares importantes para a degeneração Walleriana e regeneração axonal do nervo isquiático de animais wild type após lesão induzida por CNI..	49
Figura 7. Perfil de respostas nociceptivas fisiológicas de camundongos machos e fêmeas C57Bl/6 e com deleção total da citocina IL-33 (<i>Il33^{Gfp/Gfp}</i>).....	51
Figura 8. Perfil de respostas nociceptivas de camundongos C57Bl/6 wild type e com deleção total da citocina IL-33 durante a dor neuropática induzida pelo CNI.....	52
Figura 9. Esquema de gates para citometria de fluxo para avaliação da migração de células inflamatórias circulantes.....	54
Figura 10. A ausência de IL-33 altera a migração de leucócitos para o local da lesão no nervo isquiático de camundongos submetidos ao CNI.....	55
Figura 11. A ausência de IL-33 altera o número total de neutrófilos para o local da lesão no nervo isquiático de camundongos submetidos ao CNI.....	56
Figura 12. A ausência de IL-33 diminui a frequência e o número absoluto da maturação de monócitos em macrófagos no local da lesão no nervo isquiático de camundongos submetidos ao CNI.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados nas reações de qPCR em tempo real.....	35
Tabela 2 – Anticorpos conjugados utilizados para citometria de fluxo.....	36
Tabela 3 – Número total e porcentagem dos diferentes tipos de células presentes no nervo saudável.....	39
Tabela 4 – Número total e porcentagem dos diferentes tipos de células presentes no nervo d3 após transecção.....	40
Tabela 5 – Número total e porcentagem dos diferentes tipos de células presentes no nervo d9 após transecção.....	41
Tabela 6 – Expressão diferencial do gene da IL-33 presente nas células mesenquimais em relação as demais populações nos diferentes dias.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesões a nervos periféricos e degeneração Walleriana

As fibras nervosas no SNP são compostas principalmente de axônios, células de Schwann que envolvem esses axônios, levando posteriormente a formação de bainhas de mielina ao redor de muitos fibroblastos que estão espalhados entre as fibras nervosas e células mesenquimais presentes no perineuro, epineuro e endoneuro e a vasculatura que nutre o tecido nervoso.

Lesões traumáticas ao sistema nervoso periférico (SNP) levam a uma diminuição da função neuronal, ocasionando uma ruptura na bainha de mielina e danos aos axônios. Após a ruptura, o segmento neuronal distal do ponto de lesão começa a degenerar de forma progressiva. Este processo é chamado de degeneração Walleriana (DW) em homenagem ao pesquisador, Augustus Waller, que documentou esses achados pela primeira vez em 1850 (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

Waller com seus estudos, forneceu uma compreensão muito importante, embora incompleta, dos mecanismos que contribuem para a DW. Também forneceu bases de como influenciar a melhor recuperação funcional do tecido nervoso. Desde então, diversos esforços têm sido tomados na descoberta de mecanismos que envolvem esse processo e como melhorar a recuperação funcional do nervo isquiático após lesão (ROTSHENKER, 2011).

Quando ocorre uma lesão traumática, ela acarreta em dano tecidual no local onde ocorreu o impacto físico. Toda a região localizada distalmente à lesão sofre mudanças celulares que caracterizam a DW, embora não necessariamente essas células tenham sofrido algum dano direto (CHEN; PIAO; BONALDO, 2015; DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015).

Essas mudanças celulares ocorrem principalmente pela ruptura da bainha de mielina, e a ativação que a mielina causa nas células, sendo necessário limpar o tecido desses restos de mielina. Essa limpeza vai ocorrer juntamente com as células do sistema imunológico que irão para o sitio inflamatório.

1.2. Mecanismos envolvidos na degeneração Walleriana

A partir da lesão ao nervo periférico, ocorre a degradação dos axônios e quebra da bainha de mielina e isso leva a uma ativação de células de Schwann (CS) que passam a se desdiferenciar e a liberarem muitas moléculas, como quimiocinas, citocinas e outros fatores que culminam na infiltração de monócitos e neutrófilos (NAPOLI et al., 2012; TOFARIS et al., 2002). Dentre as quimiocinas temos a CCL2/MCP-1 (do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*) e as citocinas IL-1 α e IL-1 β , como as mais importantes e levam a migração de leucócitos circulantes para o nervo lesionado e sua ativação/manutenção através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) produzidos no local da lesão, conforme demonstrado em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* anteriores, que as CS produzem e liberam rapidamente essas moléculas em resposta a lesão do nervo, tendo a principal função atrair essas células imunes para o foco inflamação (PERRIN et al., 2005; SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002; VAN STEENWINCKEL et al., 2015).

Ao chegarem no local da lesão, neutrófilos e monócitos recrutados produzem e liberam alguns mediadores, como CXCL1/KC (do inglês *keratinocytes-derived chemokine*) e CCL2, que são importantes para o processo de retroalimentação positiva que mantém a migração leucocitária constante e ativação consequente de novas células recrutadas. Esse mecanismo garante a manutenção do estado inflamatório no local da lesão e contribui para os processos de regeneração que se seguem (KIGUCHI et al., 2013; LINDBORG; MACK; ZIGMOND, 2017). Diversos estudos já demonstraram que a depleção de CCR2 (do inglês *C-C chemokine receptor type 2*), o receptor expresso nos monócitos circulantes que chegam ao sítio inflamatório e é ativado pela CCL2, diminui consideravelmente o número de monócitos que infiltram para o nervo após lesão (SIEBERT et al., 2000). Além destes, outros fatores também são responsáveis por ativar essas células imunes, como a matriz extracelular (MEC) exposta durante a lesão (ROTSHENKER, 2011).

Além disso, esse processo de ativação observado no local da lesão pode ocorrer através de receptores do tipo Toll (TLR do inglês *Toll-like receptors*) presentes

em macrófagos, neutrófilos e em células não imunes, como as CS. Estes receptores respondem a ligantes endógenos, como alarminas, que são moléculas liberadas rapidamente em resposta a dano tecidual e responsáveis por alertar o sistema imune. Estudos anteriores relacionaram o papel de alarminas ligantes de cálcio S100a8/S100a9, presentes em CS no primeiro dia após lesão com a ativação de monócitos e macrófagos (CHERNOV et al., 2015).

Além de liberar diversas moléculas pró inflamatórias e ajudar no recrutamento de células imunes, as CS, após passarem pelo processo de desdiferenciação, são capazes de remover resíduos de mielina, esses resíduos inibem a sinalização para o crescimento axonal (HUANG et al., 2005). Além disso, estas células secretam um grande número de fatores tróficos e moléculas de MEC, como colágeno tipo IV, que promovem a regeneração dos axônios posteriormente (CHEN; YU; STRICKLAND, 2007).

Schwann e leucócitos infiltrantes (monócitos/neutrófilos) não são as únicas células que possuem função fagocítica durante a DW. Macrófagos residentes do nervo ciático compõem cerca de 7 a 9% das células desse tecido. Durante o processo de DW, os macrófagos residentes são capazes de induzir a inflamação por meio de sua expressão de TLRs e por produção de IL-13 e IL-1 β (DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015; SCHUH et al., 2014; YDENS et al., 2012), sugerindo um potencial papel dessas células no processo de degeneração. Além disso, já foi demonstrado que esses macrófagos residentes durante os dois dias iniciais após lesão por esmagamento do nervo isquiático, se ativam e começam a proliferar, antes mesmo do recrutamento de células imunes comentando anteriormente (KALINSKI et al., 2020). De maneira mais importante esses macrófagos residentes parecem estar envolvidos na fagocitose precoce da mielina após lesão do nervo isquiático (MUELLER et al., 2001; YDENS et al., 2020).

Um outro tipo de célula do nervo isquiático que também é responsiva à lesão tecidual, são as células mesenquimais, que podem se diferenciar em fibroblastos (WOLBERT et al., 2020). Durante a lesão, essas células liberam diversas quimiocinas e citocinas que recrutam células imunes (KALINSKI et al., 2020), além de

serem essenciais para o crescimento e regeneração axonal que irá ocorrer ao final da DW (CARR et al., 2019; TOMA et al., 2020).

Uma vez que todos os restos de mielina foram fagocitados, o ambiente se torna propício para o crescimento axonal, e então CS, células mesenquimais/fibroblastos, macrófagos residentes e monócitos maduros, agora macrófagos desempenham um papel importante para a regeneração tecidual.

1.3. Mecanismos envolvidos na recuperação funcional do tecido após degeneração Walleriana

A cascata de eventos celulares e moleculares que ocorre durante esses processos é um fator diferencial entre a regeneração do SNP em relação ao sistema nervoso central (SNC). Células do nervo periférico, adotam um perfil reparativo e uma programação de intensa proliferação depois da lesão, em contraste, os axônios no SNC permanecem envolvidos em funções sinápticas ou em um perfil de manutenção, sendo um atraso para a regeneração tecidual (MAHAR; CAVALLI, 2018).

O sucesso da regeneração no SNP é graças à contribuição de diversas células neuronais, como as CS e fibroblastos, e não neuronais, como as células do sistema imune. De fato, um grande número de evidências demonstra a participação de células imunes inatas (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e imunes adaptativas (linfócitos T e B), tendo um papel importante na degeneração e regeneração do SNP, sendo recrutadas de horas a dias após a lesão (BOISSONNAS et al., 2020; CARR et al., 2019; CLEMENTS et al., 2017; KALINSKI et al., 2020; STRATTON et al., 2018).

Após a limpeza dos restos de mielina durante a DW, ocorre o crescimento axonal. Nessa etapa, macrófagos desempenham um papel crucial: por meio da produção de fatores promotores de crescimento tecidual, e estimulam remodelação da MEC para promover a regeneração do nervo periférico (HIKAWA; TAKENAKA, 1996; PERRY; BROWN, 1992). A participação de monócitos e macrófagos durante a DW e a regeneração axonal, se dá pela sua plasticidade em responder ao microambiente e assim, alterando o seu perfil transcricional, iniciando um estado de

ativação distinto, liberando uma nova gama de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (ROTSHENKER, 2011; YDENS et al., 2020).

Macrófagos ao interagirem com células ou componentes nos nervos lesados, como CS, liberam citocinas e outros fatores de crescimento que ativam as CS para um perfil mielinizante, culminando na regeneração axonal (STRATTON et al., 2018). As CS exibem um papel crucial na regeneração de nervos periféricos por meio de outro mecanismo. Estudos recentes demonstraram que o microambiente no qual essas CS estão inseridas, a presença do fator de crescimento transformante β (TGF- β do inglês *transforming growth factor*) contribui para a ativação e invasão do local da lesão por essas células, que ao interagir com células mesenquimais, favorecem a recuperação do tecido. (CLEMENTS et al., 2017).

Células mesenquimais do nervo isquiático são importantes também na regeneração axonal após a DW. Estudos recentes demonstraram que essas células apresentam grande capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, de acordo com o estímulo apresentado *in vitro* (CARR et al., 2019). Na DW, essas células estão em grande capacidade replicativa e durante a regeneração axonal, liberam fatores de crescimento, quimiocinas que induzem o ambiente regenerativo propício para CS e macrófagos (TOMA et al., 2020). Por sua capacidade de diferenciação, podem resultar em fibroblastos e promover a reorganização tecidual após a lesão (WOLBERT et al., 2020).

1.4. Dor neuropática e degeneração Walleriana

A dor é uma experiência complexa e multidimensional que envolve aspectos sensorio-discriminativos, cognitivos, emocionais e motivacionais. Ela está associada a danos teciduais reais/potenciais ou ainda descrita em termos desse dano (HOBBS, 1995). Tal fenômeno tem grande importância biológica de defesa e alerta do organismo uma vez que a iminência de danos teciduais sinaliza para respostas motoras reflexas de escape ou respostas autonômicas frente ao estímulo potencialmente danoso (WILLIAMS; CRAIG, 2016).

De acordo com a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), a dor que persiste por três meses ou mais é classificada como crônica. A dor crônica é um problema de saúde pública crescente, que afeta cerca de 30% dos adultos em todo o mundo (JOHANNES et al., 2010) têm como característica principal a dificuldade de tratamento e alívio, por não responderem a maioria dos fármacos extensamente utilizados na clínica médica.

As dores crônicas são determinadas por lesão tecidual periférica e ativação persistente de nociceptores, resultando em plasticidade funcional do sistema nervoso (alterações na sensibilidade nociceptiva e expressão de receptores, canais iônicos, neurotransmissores e enzimas) contribuindo para a persistência do quadro doloroso, independentemente da resolução do processo inflamatório (COUTAUX et al., 2005).

A dor crônica pode ser dividida em diferentes subclasses de acordo com sua origem, como: inflamatória, a dor do câncer, a dor disfuncional e a neuropática (JI; XU; GAO, 2014). A dor neuropática, é definida pela IASP como uma dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial central ou periférico (LOESER; TREEDE, 2008). Essa patologia afeta em média de 3-17% da população mundial (BOUHASSIRA et al., 2008; COLLOCA et al., 2017). A dor neuropática periférica pode resultar de trauma mecânico, doenças metabólicas - como o diabetes, substâncias químicas neurotóxicas – como os quimioterápicos, neuralgia pós-herpética e invasão tumoral. Já a dor neuropática central pode ser consequência de acidente vascular cerebral, lesão na medula espinhal e esclerose múltipla (NISHIKAWA; NOMOTO, 2017; SCHOLZ; WOOLF, 2002).

A DW a partir de lesão mecânica também pode levar a dor neuropática. Uma vez que ambos processos possuem mecanismos imunes correlacionados, observou-se que camundongos que possuem o gene *WldS* (do inglês *slow Wallerian degeneration*), gene que atrasa a degeneração Walleriana depois de uma lesão, apresentaram menor limiar doloroso quando comparado a animais WT (MYERS; HECKMAN; RODRIGUEZ, 1996).

Citocinas que são produzidas durante a DW, já foram descritos como indutores de dor neuropática (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016). Por exemplo, IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α do inglês *Tumor necrosis factor α*) podem

sensibilizar axônios intactos a produzir disparos espontâneos ou amplificar a resposta à estímulos mecânicos e térmicos, aumento a sinalização dolorosa. De outro modo, IL-1 β e TNF- α induzem ainda a expressão de fator de crescimento nervoso (NGF do inglês *Nerve growth factor*), que, por sua vez, sensibiliza as terminações nervosas sensoriais, produzindo dor (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995; WOOLF et al., 1997). Isso é mais evidente após lesão parcial do nervo por esmagamento, onde alguns, mas não todos os axônios, encontram-se lesados (WU et al., 2002).

Dessa forma, a redução do limiar doloroso e atraso na neuropatia em camundongos Wlds pode ser explicada, pelo menos em parte, pela produção reduzida de componentes inflamatórios importantes que compõem a degeneração Walleriana, como as citocinas.

1.5. Interleucina 33

As citocinas da família da IL-1 são caracterizadas pelo seu papel na resposta inflamatória. Dentre elas, a IL-1 β e IL-18 são as mais conhecidas como potentes citocinas pró inflamatórias (FENINI; CONTASSOT; FRENCH, 2017). Em 2005, Schmitz et al. identificaram a IL-33, também chamada IL-1F11, como uma citocina com estruturas homólogas as da família da IL-1, em específico IL-18, e mostrou que a mesma se ligava a um receptor órfão chamado ST2 (do inglês *suppression of tumorigenicity 2*), este também conhecido como IL-1RL1, pertencente aos receptores da superfamília IL-1 (KAKKAR; LEE, 2008; O'NEILL, 2008).

A IL-1 β e IL-18 são sintetizadas em suas formas biologicamente inativas, pró-IL-1 β (33-kDa) e pró-IL-18 (33-kDa). No citosol, ambas são clivadas pela caspase-1 em suas formas ativas (17-kDa) e secretadas para o meio extracelular (CAYROL; GIRARD, 2018). Esse processo de maturação é característico das citocinas da família IL-1, e conseqüentemente, pensou-se que a IL-33 era maturada da mesma forma (SCHMITZ et al., 2005). Entretanto, outros estudos mostraram que a forma completa da IL-33 (33-kDa) tem atividade biológica, independente da ação de caspase-1 (OHNO et al., 2009; TALABOT-AYER et al., 2009) e caso ocorra sua clivagem, em um

ponto específico da cadeia da IL-33 (especificamente, no meio do domínio IL-1 *like*), leva a inibição da sua atividade biológica (CAYROL; GIRARD, 2018; LÜTHI et al., 2009).

Além da presença do domínio IL-1 *like*, a estrutura proteica da IL-33 é composta também do domínio central e do domínio nuclear, que ancora essa citocina ao núcleo (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que serino proteases produzidas por neutrófilos (LEFRANÇAIS et al., 2012a) e mastócitos (LEFRANÇAIS et al., 2014) clivam uma região específica do domínio central, anterior ao domínio IL-1 *like*, tornado a IL-33 em uma forma curta madura de 18-21 kDa. Adicionalmente, observou-se que essa cadeia curta teve um aumento significativo na atividade biológica em comparação à sua forma completa. Esses estudos foram cruciais para estabelecer que a maturação proteolítica era importante para a regulação bioativa da IL-33 (CAYROL; GIRARD, 2018), e que proteases liberadas por neutrófilos durante infecções e mastócitos durante alergias, respectivamente, eram críticas para a ativação de respostas de perfil tipo 1 (inflamatórias com neutrófilos) e 2 (alérgicas como mastócitos) da IL-33 (LEFRANÇAIS et al., 2012b; LEFRANÇAIS et al., 2014).

A IL-33 é expressa por células não hematopoiéticas como no núcleo de células endoteliais e epiteliais (CAYROL; GIRARD, 2014a) e também em células de tecidos expostos ao ambiente como a pele (ALLAKHVERDI et al., 2007; MOUSSION; ORTEGA; GIRARD, 2008). Além disso, a IL-33 é liberada por essas células em resposta a lesões ou traumas, funcionando como uma alarmina, similar a citocinas como IL-1 α e grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1 do inglês *High mobility group box 1*), ambas conhecidas por sua função como sinalizadoras de dano tecidual (CAYROL; GIRARD, 2014a; HARALDSEN et al., 2009; JI; XU; GAO, 2014).

Além disso, a IL-33 exerce suas funções pró inflamatórias via complexo IL-33/ST2L/IL-1RaP (ALI et al., 2007; HAN et al., 2016; PALMER et al., 2008), de forma que IL-33 se liga ao receptor ST2 e recruta a IL-1RaP, uma proteína acessória da IL-1R, formando assim o complexo (ABD RACHMAN ISNADI et al., 2018). Existem variações do receptor ST2. Além de ST2, que é acoplado a membrana, existe a

isoforma ST2 solúvel (sSt2), idêntica a ST2, que fica no meio extracelular e funciona como um regulador endógeno, por impedir a ligação da IL-33 ao receptor membranar (PALMER et al., 2008).

Após a formação do complexo, a sinalização é induzida através do adaptador MyD88 (do inglês *Myeloid differentiation primary response 88*), juntamente com as quinases IRAK1 (do inglês *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*), IRAK4 (do inglês *Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) e TRAF6 (*TNF receptor associated fator 6*), culminando na ativação da enzima Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAP do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*) e do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NFκB do inglês *factor nuclear kappa B*) (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016; SCHMITZ et al., 2005). Essa via de sinalização nas células é semelhante a IL-1β e IL-18 (ABD RACHMAN ISNADI et al., 2018).

1.6. Participação da IL-33 na dor e na regeneração do sistema nervoso central

A via da IL-33/ST2 e sua relação com a dor foi primeiramente descrita em 2008, em modelos murinos de hipernocicepção articular induzida por antígenos. Os autores elucidaram que o mecanismo de hipernocicepção da IL-33 se dava a partir da liberação de TNF-α, IL-1β e Interferão-gama (IFN-γ do inglês *Interferon-gama*), demonstrando o pleiotropismo da IL-33 no desencadeamento de respostas de perfil inflamatório (VERRI et al., 2008) e alérgico (SCHMITZ et al., 2005). Ademais, a expressão de IL-33 esta aumentada em modelos que apresentam a dor como condição clínica, como artrite induzida por antígeno (AIA) (ZARPELON et al., 2017), artrite induzida por colágeno (CIA) (XU et al., 2008) e injeção de carragenina (PINHO-RIBEIRO et al., 2016; ZARPELON et al., 2013).

Ademais, a IL-33 ativa neurônios no gânglio da raiz dorsal que expressam ST2, a partir da resposta desenvolvida contra alérgenos. Nesse estudo, porcentagens diferentes de neurônios eram ativados para os agonistas TRPV1 (do inglês *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) e TRPA1 (do inglês *Transient*

receptor potential cation channel, subfamily A member 1), demonstrando que a expressão neuronal de ST2 pode levar a um papel nociceptivo da IL-33 (CHIU et al., 2014; FATTORI et al., 2017; LIU et al., 2016). Ela também interage com células imunes que estão participando do processo doloroso, por exemplo, macrófagos e neutrófilos. O recrutamento de neutrófilos já é bem descrito tanto na dor aguda (CUNHA et al., 2008) quanto na dor crônica (FATTORI; AMARAL; VERRI, 2016). Os neutrófilos recrutados produzem e liberam vários mediadores pró inflamatórios e citocinas hiperalgésicas como IL-1 β , TNF- α , IL-6, espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *Reactive oxygen species*), Prostaglandina E₂ (PGE₂ do inglês *prostaglandin E₂*), e esses mediadores podem acabar ativando e sensibilizando nociceptores (FATTORI et al., 2017; FATTORI; AMARAL; VERRI, 2016). Em adição, existe uma interação específica da IL-33 com neutrófilos, visto que TNF- α induz a expressão de ST2 em células neutrofilicas de indivíduos saudáveis, estimulando positivamente a quimiotaxia em modelos de AIA em camundongos (VERRI et al., 2010).

Ainda em relação a dor, recentemente foi demonstrado a participação da IL-33 na dor neuropática, a partir de lesão no nervo ciático por CCI (do inglês *Chronic constriction injury*), a partir da induzir a produção de IL-33 por oligodendrócitos e ativação de astrócitos e micróglia a partir do receptor ST2 (ZARPELON et al., 2016).

As células gliais são importantes para o suporte do SNC, e possuem fundamental importância em diversas desordens inflamatórias. Além da dor neuropática, outros estudos demonstraram o papel da sinalização via IL-33 na regeneração tecidual, em células gliais no modelo de lesão na medula espinal (SCI do inglês *spinal cord injury*) (GADANI et al., 2015; LONGHI-BALBINOT et al., 2016; POMESHCHIK et al., 2015).

Em 2015, Gadani e colaboradores, por um modelo de SCI, observaram uma população específica de oligodendrócitos como sendo a principal fonte de IL-33 no sistema nervoso central. Essas células, ao sofrerem necrose, após lesão, liberam IL-33, levando a ativação de astrócitos e micróglia. Estes últimos liberando CCL2, e recrutam monócitos, que são ativados via IL-33 para perfil M2, reparando o tecido e protegendo da desmielinização (GADANI et al., 2015). O mesmo tipo de resposta

protetora foi visto em outro estudo, utilizando o mesmo modelo de SCI, no qual a injeção da recombinante de IL-33 (rIL-33) diminuiu o dano secundário promovendo diminuição da expressão de TNF- α e aumento da polarização de macrófagos para perfil M2, contribuindo para recuperação tecidual (POMESHCHIK et al., 2015).

Em 2020, Ydens e colaboradores, mostraram o perfil de expressão de macrófagos residentes do nervo isquiático, após o modelo de esmagamento do nervo (*Crush Nerve Injury*). Foi vista a dinâmica e perfil de expressão que esses macrófagos apresentaram e demonstraram que essas células tinham aumento da expressão do receptor IL1-RL1, único receptor conhecido para IL-33 (YDENS et al., 2020).

Além disso, Stratton, em 2018, realizou um scRNA-Seq em macrófagos residentes (CX3CR1+ - do inglês *CX3C chemokine receptor 1*) e monócitos (CCR2+) selecionados de nervo isquiático após modelo de esmagamento, e observou que essas células super expressavam diversos fatores de crescimento; citocinas inflamatórias (TNF- α , IL1- β) e anti inflamatórias (IL-10), além do aumento de expressão de IL-33 (STRATTON et al., 2018).

Contudo, ainda não foi descrito na literatura o papel da IL-33 nessa condição patológica, apesar dos crescentes trabalhos sobre sequenciamento do nervo ciático. Sabe-se que a DW leva a uma inflamação e migração de células imunes para o nervo inflamado, causando dor neuropática. Contudo, estudos são necessários para elucidar o possível papel da IL-33 nas neuropatias do nervo isquiático e podendo contribuir com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Assim, a hipótese deste trabalho é que a IL-33 é presente no sistema nervoso periférico, atuando como alarmina, promove recrutamento dos leucócitos circulantes; manutenção do estado inflamatório na DW, e contribuem para a dor neuropática.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar a participação da IL-33 na degeneração Walleriana no nervo isquiático de animais submetidos a lesão por modelo de esmagamento.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Caracterizar a expressão da (*Il33*, *il1rl1* e *il1rap*) por meio das re-análises de dados de sequenciamento de célula única no nervo isquiático;

2.2.2. Caracterizar o perfil da expressão gênica da IL-33 e IL1RL1 em diferentes dias de lesão por esmagamento do nervo isquiático;

2.2.3. Avaliar a participação da IL-33 na sensação nociceptiva de animais após lesão;

2.2.4. Avaliar a participação da IL-33 durante a migração de células para o local da lesão;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT do inglês *Wild Type*) como controle para os animais deficientes para a citocina IL-33 (*Il33^{Gfp/Gfp}*) (OBOKI et al., 2010). Camundongos foram criados no Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas éticas estabelecidas para experimentação com animais, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983). Além disso, todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA: 150/2020).

3.2. Re-análises de dados de sequenciamento de célula única

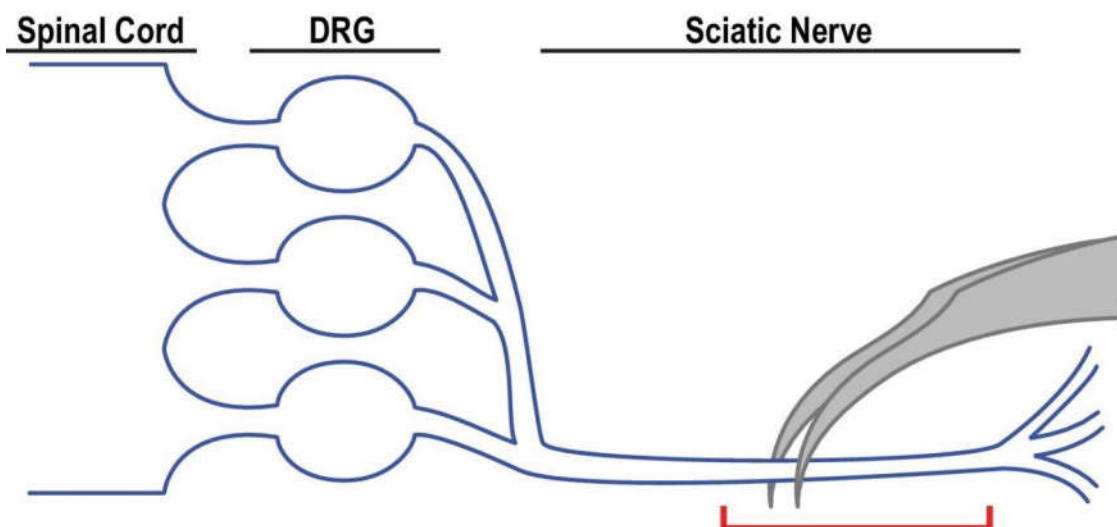
Os dados públicos de single cell RNA-seq de nervo isquiático de camundongo de grupos controle e lesionado em 3 e 9 dias (GSE147285 e GSE120678) foram reanalisados (TOMA et al., 2020). As tabelas de contagens de cada grupo foram carregadas e convertidas para matrizes esparsas. O pacote Seurat v3.1 (STUART et al., 2019) foi utilizado para importar as matrizes esparsas e uma etapa de pré-processamento foi realizada para filtrar células com baixa qualidade baseado em três parâmetros (nCounts <10000, número de genes expressos entre 200 e 5000, percentual de expressão mitocondrial <5%). As contagens remanescentes foram normalizadas e os 3000 genes mais variáveis foram identificados, posteriormente escalonados levando em consideração o percentual mitocondrial. A análise de componente principal foi realizada utilizando os genes variáveis e os 30 primeiros componentes principais foram utilizados para identificar os grupos celulares.

Os genes marcadores informados pelos autores foram utilizados para anotação de cada grupo celular. Os genes marcadores das células mesenquimais foram identificados utilizando os parâmetros padrão da função *FindMarkers*. Essa função foi utilizada para identificar os genes diferencialmente expressos, a partir desses parâmetros: *logfc.threshold* = 0,25 e *min.pct* = 0,1, quando comparadas as células mesenquimais contra os outros tipos celulares e quando comparadas as células mesenquimais entre elas próprias, nas três condições analisadas.

3.3. Modelo experimental de esmagamento do nervo isquiático

O modelo experimental de esmagamento do nervo isquiático (CNI do inglês *Crush nerve injury*), busca reproduzir as características clínicas de uma neuropatia causada por lesão mecânica do nervo. Sob anestesia com isoflurano a 2%, foi feita uma incisão e o músculo divulsionado até que fosse possível a visualização do nervo isquiático antes de sua ramificação em três segmentos, conforme pode ser visualizado no desenho representativo na Figura 1. O nervo foi então isolado com uma pinça de vidro, e esmagado 1 cm acima de sua trifurcação, por 30 segundos, com uma pinça de 2 mm de largura, conforme descrito anteriormente (BOBINSKI et al., 2011, 2015). A sutura foi realizada com fio de seda 4.0 (agulha de 1/2 17mm D2764 – Ethicon, Johnson & Johnson) e o controle negativo envolveu a exposição e o isolamento do nervo isquiático sem o esmagamento utilizado o lado contralateral (Contra) a lesão.

Figura 1. Desenho representativo do modelo experimental de CNI.



Fonte: (KALINSKI et al., 2020)

3.4. Avaliação nociceptiva

Para todos os testes de avaliação nociceptiva, os camundongos foram colocados em uma caixa de acrílico para ambientação por um período mínimo de 30 minutos.

3.4.1. Avaliação nociceptiva mecânica – teste de von Frey filamentos

A avaliação de hipersensibilidade nociceptiva em camundongos foi realizada como previamente descrito por Cunha e colaboradores (Cunha et al., 2004), utilizando filamentos de von Frey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA). Em síntese, os animais foram acondicionados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, para ambientação. Essa técnica utiliza uma série de monofilamentos de náilon para medir limiares de força dentro de um conjunto de 20 monofilamentos com aumento da rigidez (0,008g à 300g de força). Para avaliação em camundongos foram utilizados filamentos de 0,008 à 2g,

os quais foram aplicados perpendicularmente, sobre a região plantar da pata traseira operada dos animais, por um período aproximado de 3 segundos ou até que o animal demonstrasse comportamento nociceptivo, caracterização por flexão seguida de retirada da pata (*flinch*). O filamento de menor força capaz de induzir resposta foi determinado como sendo o limiar mecânico de retirada.

3.4.2. Avaliação nociceptiva mecânica – teste de von Frey eletrônico

Os experimentos foram realizados com anesthesiômetro eletrônico (modelo 1601 C, Life Science Instruments California, USA) que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g). A captação da pressão é feita pelo contato do transdutor de pressão à pata, que é realizado através de uma ponteira de polipropileno (utilizada para pipetas de volume máximo de 20 μ L) conectada ao transdutor. A avaliação da nocicepção na pata consiste na aplicação, por entre as malhas da rede, de uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo, até que o animal flexione a pata, produzindo uma resposta de retirada, a intensidade de hipernocicepção mecânica articular é quantificada através de valores absolutos de limiar mecânico (gramas).

3.4.3. Teste de Placa Quente (*Hot plate*)

O teste de placa quente (EDDY; LEIMBACH, 1953) consiste em introduzir o animal num espaço cilíndrico, com um pavimento constituído por uma placa metálica aquecida a uma temperatura constante. O animal é impedido de sair do espaço delimitado, o que induz uma resposta nocifensiva à placa quente. São 3 principais componentes comportamentais produzidos: o sacudir das patas traseiras – mediado por fibras táteis e não nociceptivas ($A\beta$) ou ainda a lambida das patas traseiras e o pulo - ambas consideradas respostas supraespinhais integradas (centrais), essencialmente nociceptivas. Os animais foram submetidos ao teste após dois treinamentos em dias prévios ao ensaio. Tanto os treinamentos quanto o teste

consistiram em colocar o animal sobre a superfície aquecida a 48°, 52° e 56°C e cronometrar o tempo até que exibisse as respostas de lambida ou pulo, com um *cut off* de 60 ou 30 segundos.

3.4.4. Teste de locomoção induzida no rotarod

O teste de locomoção induzida no rotarod é um teste de desempenho baseado na capacidade do animal em caminhar e se manter em uma haste giratória. No teste, o animal é colocado em um cilindro giratório horizontalmente orientado (haste) suspenso, que é baixo o suficiente para não ferir o animal, mas alto o suficiente para induzir aversão à queda. Roedores naturalmente tentam permanecer no cilindro rotativo, evitando cair, o que consideram potencialmente nocivo. O período de tempo que um dado animal fica nessa haste giratória é uma medida de equilíbrio, coordenação motora, condição física e planejamento motor. Os animais foram submetidos a dois treinamentos no dia anterior ao teste, a fim de reconhecer e aprender a caminhar sobre cilindro, reduzindo a possibilidade de queda inespecífica ao dia do teste. Tanto o treinamento como o teste consistiram em submeter os animais à caminhada no rotarod a uma velocidade de 22 rpm por 120 segundos (DUNHAM; MIYA, 1957).

3.5. Coleta de amostras

Os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p) e xilazina (10mg/kg, i.p) para a coleta de amostras para realização dos experimentos de biologia molecular e citometria de fluxo. Após anestesia completa, os animais foram perfundidos com solução tampão PBS (*phosphophate-buffered saline*, pH 7,2-7,4), em temperatura ambiente, por 2 minutos (5 mL/min). Em seguida foi feita uma incisão craniocaudal no dorso do animal, seguida de abertura por planos, até a exposição das

lâminas ósseas da coluna vertebral. Amostras do nervo isquiático ipsilateral à cirurgia (granuloma) e contralateral, medindo entre 3 a 5 mm, foram coletadas.

3.6. Reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR)

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

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

3.6.2. Coleta das amostras

Amostras do nervo isquiático foram coletadas de animais neuropáticos ou naive/sham previamente perfundidos intracardialmente e estocadas em 500 µL de solução de Trizol (Sigma-Aldrich) a -70°C.

3.6.3. Processamento das amostras e extração do RNAm

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

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

3.6.4. Síntese de DNAc e ensaio de qPCR em tempo real

A transcrição de RNAm para DNAc, foi feita por meio da atividade da enzima transcriptase reversa MultiScribe®, utilizando-se 300-500 ng de RNAm total, e os demais reagentes fornecidos pelo kit de transcrição reversa de RNAm em cDNA - High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Para essa reação foram utilizados tempos e temperaturas estabelecidos pelo fornecedor do Kit. A reação quantitativa do PCR-RT foi feita no aparelho stepOne Plus Real-Time PCR System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA). O PCR-RT foi executado com volume final de 6,25 µL usando SYBR-green (3,125µL SYBR-green® + 0,25 µL de *primer* sequência sense + 0,25 µL *primer* sequência antisense + 1,625 µL de água) e 1 µL de amostra de cDNA. A placa na qual esses reagentes e amostras foram pipetados foi mantida a 95 °C (10 min), e mais 40 ciclos de 94°C (1 min), 56° C (1 min) e 72° C (2 min). A curva de dissociação, para as amplificações com SYBR®, foram analisadas a 65-95°C, para verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “*cycle threshold*” (CT) (2-ΔΔct). Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram normalizados com

base na expressão de GAPDH como controle endógeno. As sequências dos pares de primers (camundongo) utilizados estão demonstradas na tabela abaixo.

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados nas reações de qPCR em tempo real.

ALVO	SEQUÊNCIA SENSE	SEQUÊNCIA ANTI-SENSE
<i>Gapdh</i>	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'
<i>I133</i>	5'-TCCTTGCTTGGCAGTATCCA-3'	5'-TGCTCAATGTGTCAACAGACG-3'
<i>I1r1</i>	5'-GCAATTCTGACACTTCCCATG-3'	5'-ACGATTTACTGCCCTCCGTA-3'
<i>Cxcl1</i>	5'-ACCCGCTCGCTTCTCTGT-3'	5'-AAGGGAGCTTCAGGGTCA-3'
<i>Iba1</i>	5'-TGAGGAGCCATGAGCCAA-3'	5'-GCTTCAAGTTTGGACGGC-3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7. Citometria de fluxo

Suspensões celulares provenientes do nervo isquiático de camundongos lesionados e seu respectivo controle (animais sham) foram analisadas por citometria de fluxo. Primeiramente, o tecido em questão foi coletado de animais previamente perfundidos transcardialmente com PBS 1x. Para o isolamento das células do nervo isquiático, o tecido coletado foi cortado em pequenos pedaços e, posteriormente, incubado em solução contendo 2% de colagenase do tipo II (Sigma-Co, St Louis, EUA) por 1 hora a 37°C. A reação da enzima foi bloqueada com PBS 1x contendo 10% de soro fetal bovino. Em seguida, os órgãos foram macerados em *cell strainer* de 40µm, centrifugado a 500 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensos em PBS 1x para a quantificação e análise de viabilidade celular em câmara de Neubauer. Uma vez obtidas as suspensões celulares do tecido em questão, as células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente e sob abrigo da luz, com anticorpos

monoclonais específicos para as moléculas de superfície a serem analisadas. Após incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e então adquiridas no aparelho BD FACSCanto II (BD Biosciences). Os anticorpos utilizados para as marcações extracelulares foram: anti-CD45 (clone), anti-Ly6C, anti-Ly6G (clone) e anti-F4/80 (clone). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo X (Tree Star, Ashland, OR). Todos os anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Anticorpos conjugados utilizados para citometria de fluxo.

ANTICORPOS CONJUGADOS	FATOR DE DILUIÇÃO	EMPRESA PRODUTORA	CÓDIGO CATÁLOGO
7-AAD Viability Staining	1:5000	Thermo Fisher	00-6993-50
Rat anti-mouse CD45 - BV421	1:300	BD Bioscience	Clone 30-F11
Rat anti-mouse F4/80 – BV500	1:250	BD Bioscience	Clone M1/70
Rat anti-mouse Ly6C - PerCP-Cy5.5	1:250	Thermo Fisher	45-5932-82
Rat anti-mouse Ly6G - APC	1:250	BD Bioscience	Clone RB6-8C5

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.8. Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) por grupo de cinco a oito animais. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) ou duas (*two-way*), seguido

do teste de Tukey, para comparação entre os diferentes grupos. Para comparar dois grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste t de student. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$. A realização das análises estatísticas citadas e confecção dos gráficos foi realizado utilizando o programa *GraphPad Prism 9.02*.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da expressão gênica de IL33, Il1r1 e Il1Rap nos agrupamentos celulares presentes no nervo isquiático em diferentes dias de degeneração walleriana

Uma vez que já foi demonstrado a presença da IL-33 na medula espinal, sendo importante para a biologia do tecido após a ocorrência de uma lesão direta. Nossa primeira pergunta foi: Qual a principal fonte celular da IL-33 e do complexo Il1r1/Il1rap no nervo isquiático?

A partir de dados públicos (GSE 147285 e GSE 120678) analisamos o sequenciamento de células únicas de nervo isquiático de camundongos não lesionados e lesionados nos dias 3 e 9 pelo modelo de transecção do nervo isquiático (CARR et al., 2019; TOMA et al., 2020). Este modelo é diferente do CNI, mas ambos levam aos mesmos mecanismos de degeneração walleriana e regeneração axonal. E assim, foi possível verificar o perfil de expressão dos genes *il33*, *il1r1* e *il1rap* dentre os diferentes tipos celulares, bem como entre os nervos não lesionados e lesionados nos dias três e nove.

As populações que compõe no nervo isquiático são bem heterogêneas (Figura 2) e com o curso da lesão, a proporção dessas células presentes no tecido vai sendo alterado.

No nervo saudável (não lesionado) observamos oito tipos de agrupamento celulares, dentre eles, células mesenquimais (epineural, perineural, endoneural), células endoteliais, perictos, células Schwann mielinizantes e não mielinizantes e um agrupamento de células imunes, que contém apenas células de origem mielóide, que acabaram sendo agrupadas, devido ao baixo número de células presentes (Figura 2a). O número total de cada tipo celular e a porcentagem das mesmas dentre todas as populações esta informado na Tabela 3.

Tabela 3 – Número total e porcentagem dos diferentes tipos de células presentes no nervo saudável.

Tipo de células	Número total	Porcentagem
Mesenchymal epineurial	385	20,94
Mesenchymal endoneurial	432	23,50
Mesenchymal perineurial	67	3,64
Endothelial	391	21,27
Pericytes	162	8,81
non-mielynating Schwann	265	14,4
Myelinating Schwann	83	4,51
Immune cells	53	2,88

Fonte: Elaborado pelo autor.

No nervo 3 dias após transecção foram identificados oito tipos de agrupamentos celulares, células mesenquimais (epi/perineural e endoneural), células endoteliais, a partir da lesão surge o agrupamento de macrófagos, células de Schwann, pericitos e as demais células de origem mielóide, mas em quantidade pequena, sendo assim, agrupadas em células imune (Figura 2b). O numero total de cada tipo celular e a porcentagem das mesmas dentre todas as populações esta informado na Tabela 4.

Tabela 4 – Número total e porcentagem dos diferentes tipos de células presentes no nervo d3 após transecção.

Tipo de célula	Número total	Porcentagem
Mesenchymal epi/perineurial	843	40,96
Mesenchymal endoneurial	255	12,39
Endothelial	223	10,83
Pericytes	81	3,93
Schwann	129	6,26
Macrophages	393	19,06
Undetermined leukocytes	43	2,08
Immune cells	91	4,41

Fonte: Elaborado pelo autor.

No nervo nove dias após transecção, no qual se apresentou como a análise mais heterogênea em relação aos agrupamentos identificados, foram descritos onze tipos, células mesenquimais (epineural, perineural, endoneural), pericitos, endotelial, células de Schwann, macrófagos e com um maior número de células o agrupamento de células imunes, dos dias anteriores se dividiu e deu origem aos grupos de linfócitos B, linfócitos T, células NK, mastócitos (Figura 2c). O número total de cada tipo celular e a porcentagem das mesmas dentre todas as populações está informado na Tabela 5.

Tabela 5 – Número total e porcentagem dos diferentes tipos de células presentes no nervo d9 após transecção.

Tipo de célula	Número total	Porcentagem
Mesenchymal epineurial	850	22,94
Mesenchymal endoneurial	333	8,98
Mesenchymal perineurial	81	2,18
Endothelial	497	13,41
Pericytes	262	7,07
Schwann	475	12,82
Macrophages	479	12,92
Undetermined leukocytes	122	3,29
B cells	373	10,06
T cells	160	4,31
NK cells	38	1,02
Mast cells	35	0,94

Fonte: Elaborado pelo autor.

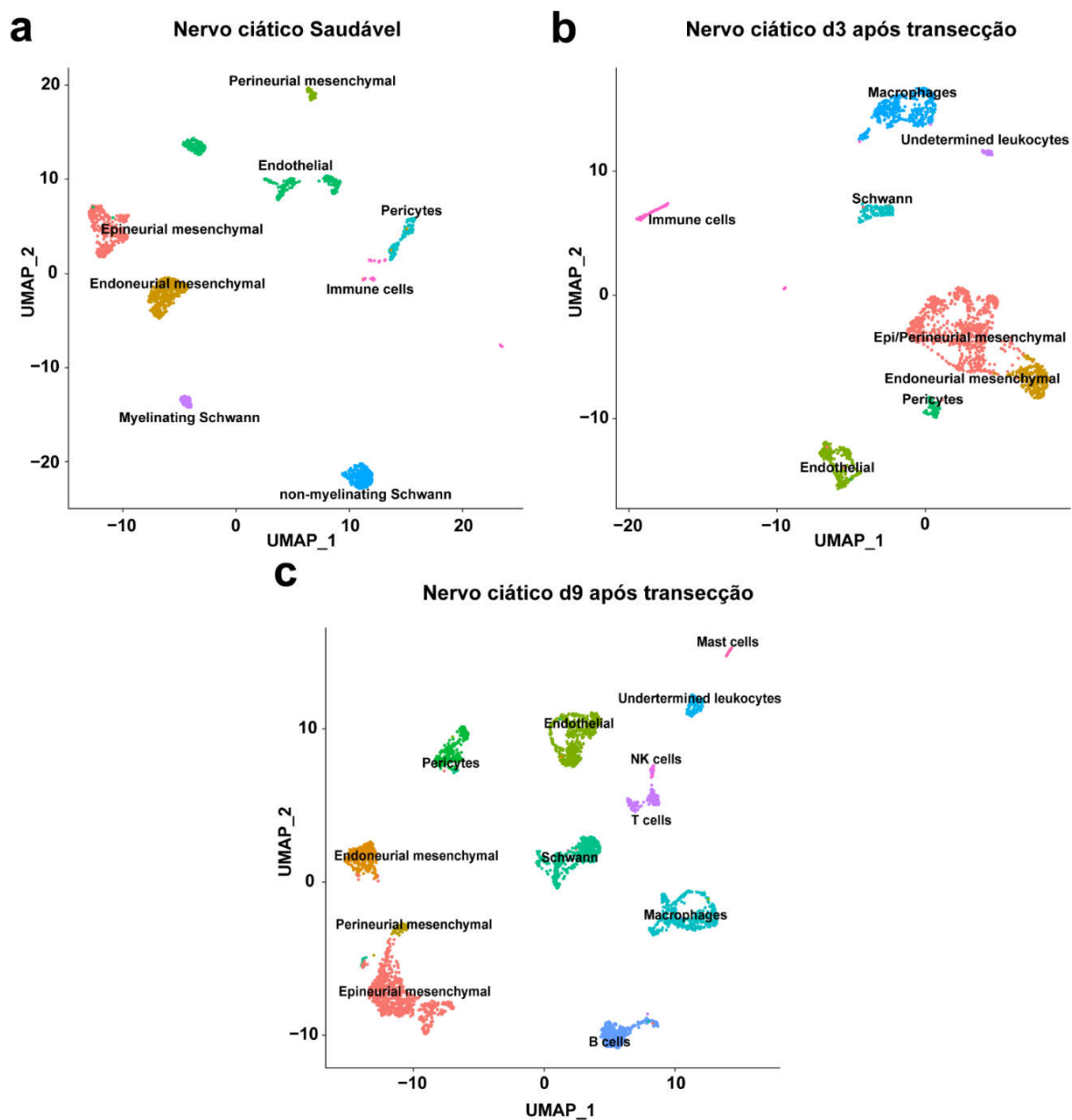


Figura 2. Análise de scRNA-seq demonstram as diferentes populações presentes no nervo ciático com lesão. Foram utilizados dados públicos (GSE 147285 e GSE 120678) contendo sequenciamento de células únicas do nervo isquiático de camundongos sem lesão e nervos lesionados por transecção coletados nos dias 3 e 9 após lesão. Visualização dos agrupamentos UMAP de transcritos de **(a)** células do nervo isquiático saudável, **(b)** de células do nervo isquiático lesionados no 3^a dia por transecção e **(c)** células do nervo isquiático lesionado no 9^a dia por transecção.

Quando analisado o perfil de expressão do gene *il33*, identificamos que este gene se expressa majoritariamente nas células mesenquimais, sendo em grande quantidade no nervo isquiático não lesionado no subtipo endo e perineural em torno de setenta e cinco por cento (Figura 3a) e no nervo 3 dias e 9 dias após transecção em todos os subtipos de mesenquimais, entretanto, a porcentagem de células expressando essa citocina diminuiu. (Figura 3b e c).

O receptor IL1RL1 está expresso no agrupamento de células imunes (Figura 3a-b) e isto se altera após o nono dia com a expressão variando entre 76 a 100% dos mastócitos e 0 a 24% de células T (Figura 3c).

O receptor acessório IL1RaP, embora expresso em um percentual menor (0 a 24%) de células Schwann mielinizantes e não mielinizantes em nervo saudável (Figura 3a), mesmo que com a lesão essas células passem por uma desdiferenciação e conseqüentemente expressem outros genes em relação as células de Schwann do nervo saudável, a expressão desse gene se manteve no cluster das células de Schwann (Figura 3b-c),

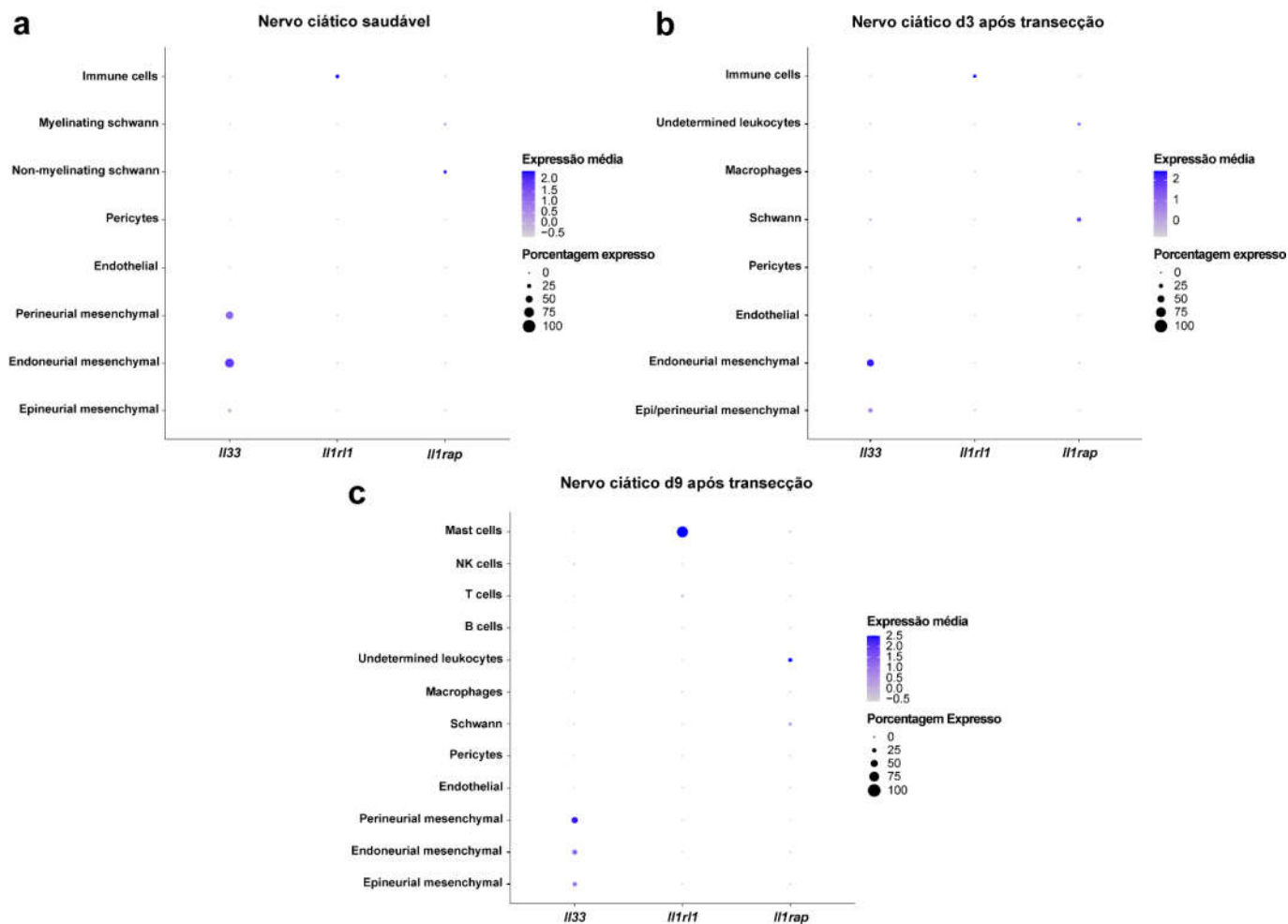


Figura 3. Caracterização da IL-33, IL1RL1 e IL1Rap nas diferentes populações em diferentes dias de lesão do nervo isquiático. Violin plots demonstrando a expressão relativa dos genes *il33*, *il1rl1* e *il1rap* nos diferentes agrupamentos de (a) células do nervo isquiático saudável referentes a figura 1a, (b) de células do nervo isquiático 3 dias após transecção referentes a figura 1b e (c) de células do nervo isquiático 9 dias após transecção referentes a figura 1c.

A fim de possuir um valor estatístico para essa diminuição da expressão de IL-33 com o curso da lesão, realizamos análise de expressão diferencial de todas as células mesenquimais em relação as outras populações nos transcritos do nervo saudável e nos diferentes dias de lesão. Observamos que a porcentagem de expressão de IL-33 está diminuindo com o curso da lesão nas células mesenquimais

(Pct.1 - Tabela 3), como já havíamos observado, entretanto, apenas o valor de PCT não é suficiente para concluir que ocorreu essa diminuição de expressão. Então, ao observamos que o *fold change* da expressão diminui com o curso da lesão (Avg-log2FC – Tabela 3), conseguimos concluir que a expressão da citocina diminuiu.

Tabela 6 – Expressão diferencial do gene da IL-33 presente nas células mesenquimais em relação as demais populações nos diferentes dias.

Alvo	p-value	Avg-log2FC	Pct.1	Pct.2	P_value adjust
Nervo saudável	8,48e-92	0.917	0.457	0.026	1,15e-87
Transecção d3	1,11e-50	0.670	0.333	0.035	1,66e-46
Transecção d9	2,64e-133	0.507	0.286	0.011	4,08e-129

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Avg-log2FC: Média da mudança de expressão em base de Log2, quantas vezes o gene aumentou (valores positivos) ou diminuiu (valores negativos) sua expressão. Pct.1: Percentual de células expressando o gene no grupo das células mesenquimais. Pct2: Percentual de células expressando o gene nos demais grupos, com exceção do grupo da Pct.1. P-Value adjust: $p < 0,05$.

Dessa forma, nossas análises de bioinformática sugerem que a IL-33 está presente no nervo isquiático durante degeneração walleriana e que pode estar sendo liberada pelas células mesenquimais uma vez que sua expressão diminui ao longo do tempo e assim, contribuindo diretamente para o processo degenerativo no nervo isquiático. Além disso, o receptor IL1RL1 parece está expresso em células imunes residentes e infiltrantes após a lesão, e a partir do nono dia, os mastócitos passam a ser majoritários na expressão desse receptor e o receptor acessório IL1Rap está expresso majoritariamente em células de Schwann.

4.2. Análise da presença de IL-33 em populações de origem mielóide e não mielóide utilizando animais transgênicos

Uma vez que a análise dos sequenciamentos nos mostrou que as células mesenquimais são as principais a expressarem IL-33 no nervo isquiático. Nossa próxima pergunta foi: Quais células expressam IL-33 após lesão por CNI

Assim, avaliamos por citometria de fluxo a presença de populações CD45⁺IL-33⁺ e CD45⁻IL33⁺ em ambos animais homozigotos (*Il33^{Gfp/Gfp}*) e heterozigóticos (*Il33^{Gfp/+}*), e coletamos o nervo isquiático cinco dias após o CNI. Como controle foi utilizado o nervo contralateral a lesão, utilizando a seguinte estratégia de *gates* (Figura 4).

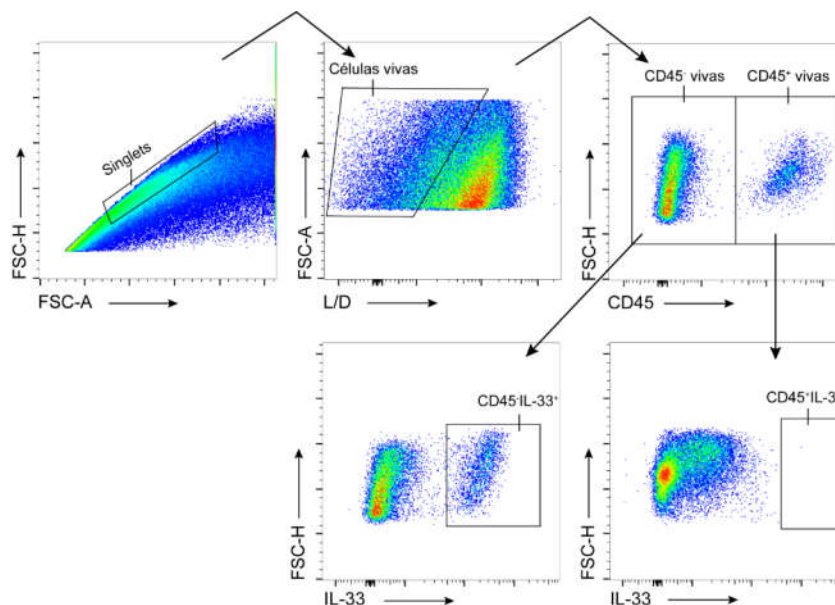


Figura 4. Esquema de gates para citometria de fluxo a fim de estudar as populações positivas para IL-33. As células foram então bloqueadas com altura de dispersão direta (FSC-H) e FSC-A para encontrar células únicas e excluir *duplets*. As células vivas foram isoladas por coloração negativa para corante de viabilidade (*Live and Dead*). Nos nervos, leucócitos foram analisados da seguinte forma: as células mielóides (CD45+) e de origem neuronal (CD45-) foram separadas. A seguir, cada grupo foi analisado para presença de IL-33 (CD45-IL33+) e (CD45+IL33+).

Os resultados obtidos da citometria de fluxo mostram que não há diferença nas células mielóides CD45⁺ que expressam IL-33 e isso é independente da lesão (Figura 4e-f). De forma contrária, a frequência de IL-33 em células CD45⁻ é bem maior que em células CD45⁺ (Figura 4g). Além disso, em nervos lesionados a frequência, mas não o número absoluto de células CD45⁻IL-33⁺ diminuem em relação aos nervos não lesionados (Figura 4g-h).

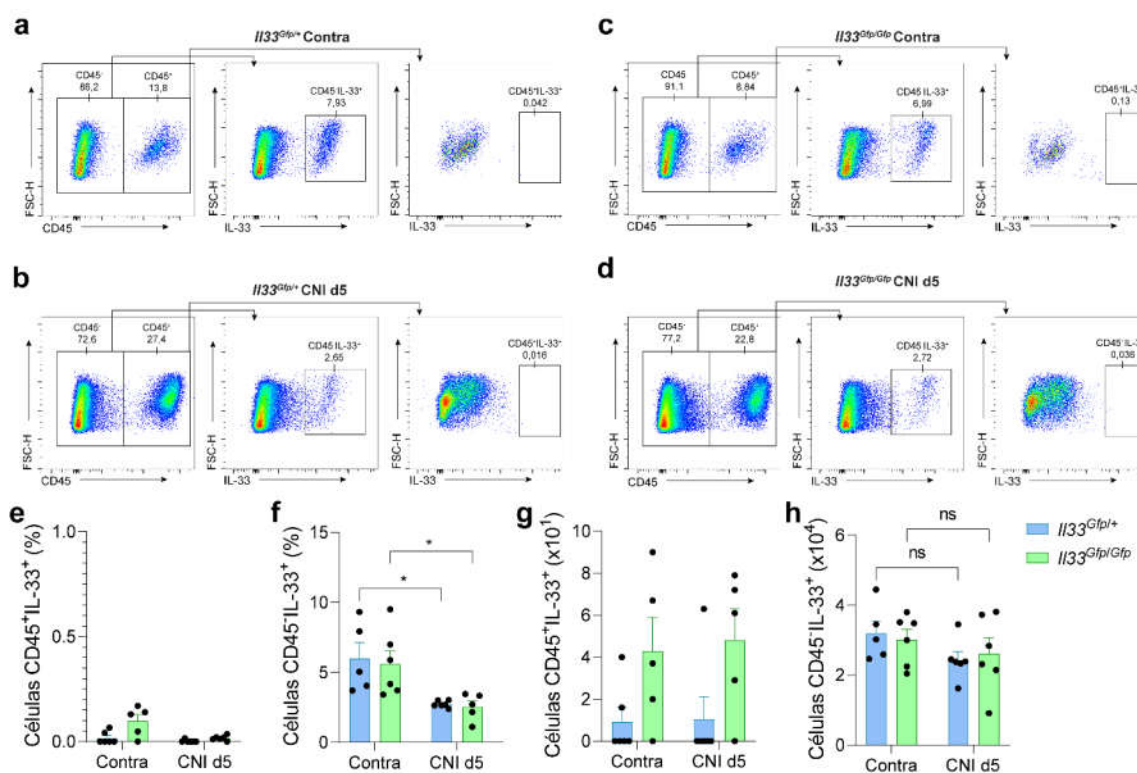


Figura 5. Animais *I133^{Gfp/Gfp}* e *I133^{Gfp/+}* possuem a IL-33 em maior quantidade em células não mielóides no nervo isquiático e isto diminuiu durante a lesão por esmagamento CNI. (a-d) Gates representativas dos diferentes grupos experimentais (e) Frequência de células de origem mielóides IL-33⁺ (CD45⁺IL-33⁺). (f) Frequência de células neuronais IL33⁺ (CD45⁻IL-33⁺). (g) Número absoluto de células de origem mielóides IL-33⁺ (CD45⁺IL-33⁺). (h) Número absoluto de células de origem mielóides IL-33⁺ (CD45⁺IL-33⁺). A pata contralateral a lesão foi utilizada como controle negativo. Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, *p<0,05. Resultados expressos em média ± E.P.M., n=5. Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.3. Validação molecular da expressão gênica relativa em *time course* de marcadores celulares importantes e da expressão de IL-33 e IL1RL1 no nervo isquiático durante neuropatia induzida pelo CNI

Uma vez que avaliamos nossa ferramenta animal e confirmamos a presença da IL-33 no nervo isquiático, procuramos validar também a expressão de IL-33 e IL1RL1 em diferentes dias após lesão por CNI, nossa próxima pergunta foi: Qual perfil de expressão genica da IL-33 e do receptor IL1RL1 após lesão?

Já que o receptor é expresso por células imunes, e as principais presentes durante a DW são neutrófilos e macrófagos, utilizamos marcadores para macrófagos e neutrófilos a fim de observar alguma relação na expressão desses marcadores com a expressão do receptor ST2/IL1RL1.

Induzimos CNI em animais C57BL/6 em diferentes tempos (d1 a d21), coletamos os nervos e processamos para adquirir o cDNA e então realizamos ensaios de qRT-PCR para *Aif1/Iba1* (do inglês *Allograft inflammatory factor 1/ionized calcium-binding adapter molecule 1*) e *CXCL1/KC*, específico de macrófagos/monócitos e neutrófilos, respectivamente. Ainda, mensuramos o decurso temporal da expressão gênica de IL-33 e do IL1RL1.

Os resultados obtidos mostram um aumento significativo na expressão gênica relativa de *Il1rl1*, principalmente no terceiro dia de lesão, já a *Il33* não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 6a). Tanto *Iba1* e *KC* tem seu aumento desde o início da lesão, mas *CXCL1* tem seu aumento mais expressivo apenas no primeiro dia (Figura 6d), já *Iba1* vai diminuindo ao longo do tempo, em decorrência da diminuição da inflamação e início do processo de reparo (Figura 6c).

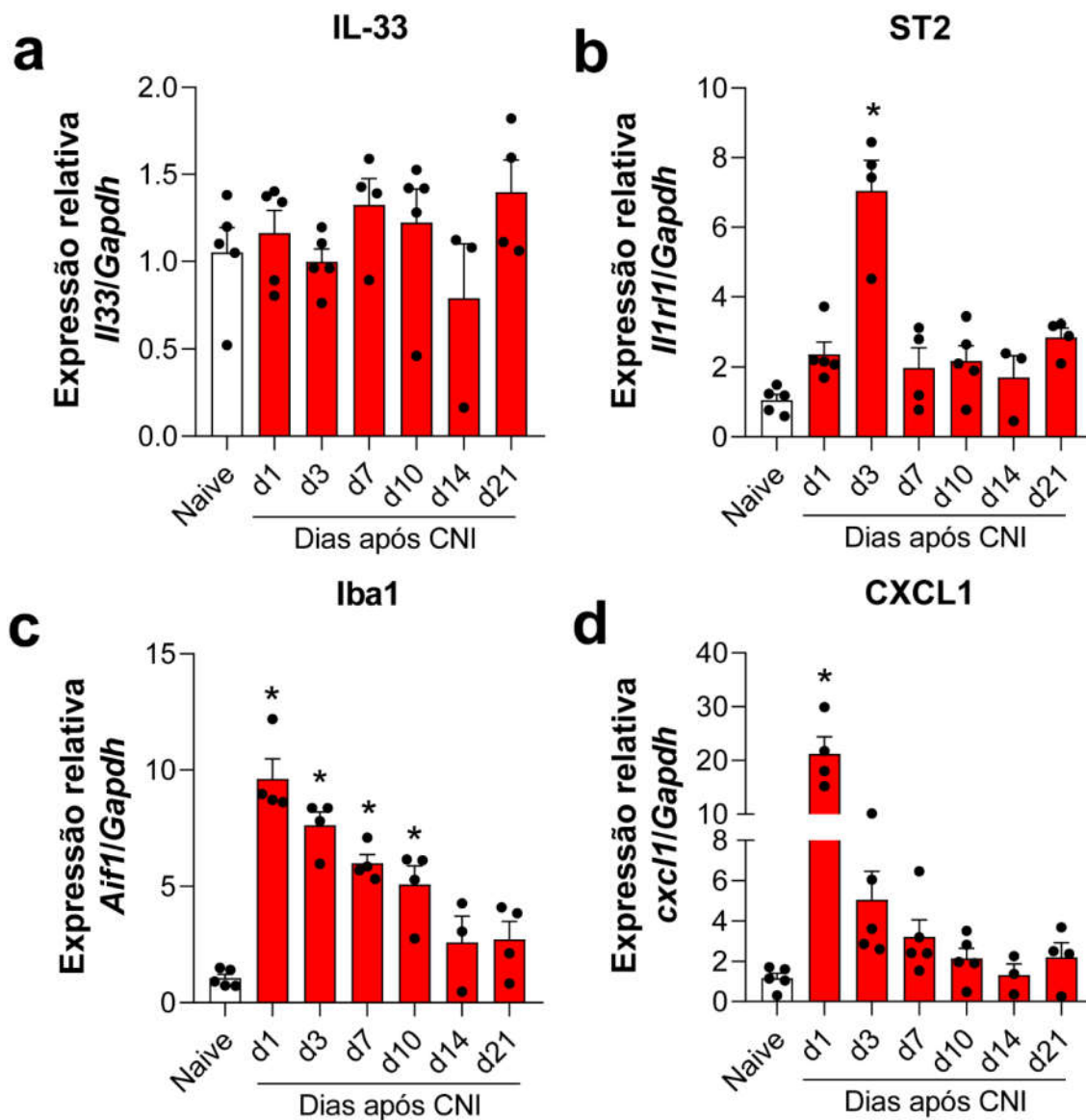


Figura 6. Expressão gênica relativa em time course de IL-33, ST2 e marcadores celulares importantes para a degeneração Walleriana e regeneração axonal do nervo isquiático de animais wild type após lesão induzida por CNI. (a) Expressão relativa de *Il33*. (b) Expressão relativa de *Il1rl1*. (c) Expressão relativa de *aif1*. (d) Expressão relativa de *cxcl1*. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. Resultados expressos em média \pm E.P.M., $n=5$. Dados representativos de um único experimento.

4.4. A ausência da IL-33 não altera o comportamento nociceptivo fisiológico

Avaliamos a resposta nociceptiva fisiológica de animais geneticamente deficientes para a IL-33, previamente à indução do modelo de CNI. Para isso, animais C57BL/6 (aqui referenciados como WT) e animais deficientes para a IL-33 (*Il33^{Gfp/Gfp}*) foram submetidos a diferentes testes comportamentais, a fim de confrontar os comportamentos fisiológicos nociceptivos na presença ou ausência de IL-33.

Os animais foram submetidos a testes para avaliação da alodinia mecânica - teste Von Frey filamentos, hiperalgesia mecânica - Von Frey eletrônico (Figura 7b e c, respectivamente). Em adição, avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor - teste da placa quente (Figura 7d). E por fim realizamos o teste Rotarod para avaliação de possíveis alterações motoras (Figura 7a). Notamos, portanto, que não houveram diferenças significativas entre os grupos de animais deficientes para a IL-33 e animais WT, em nenhum dos testes comportamentais empregados, tanto em machos quanto em fêmeas (Figura 7).

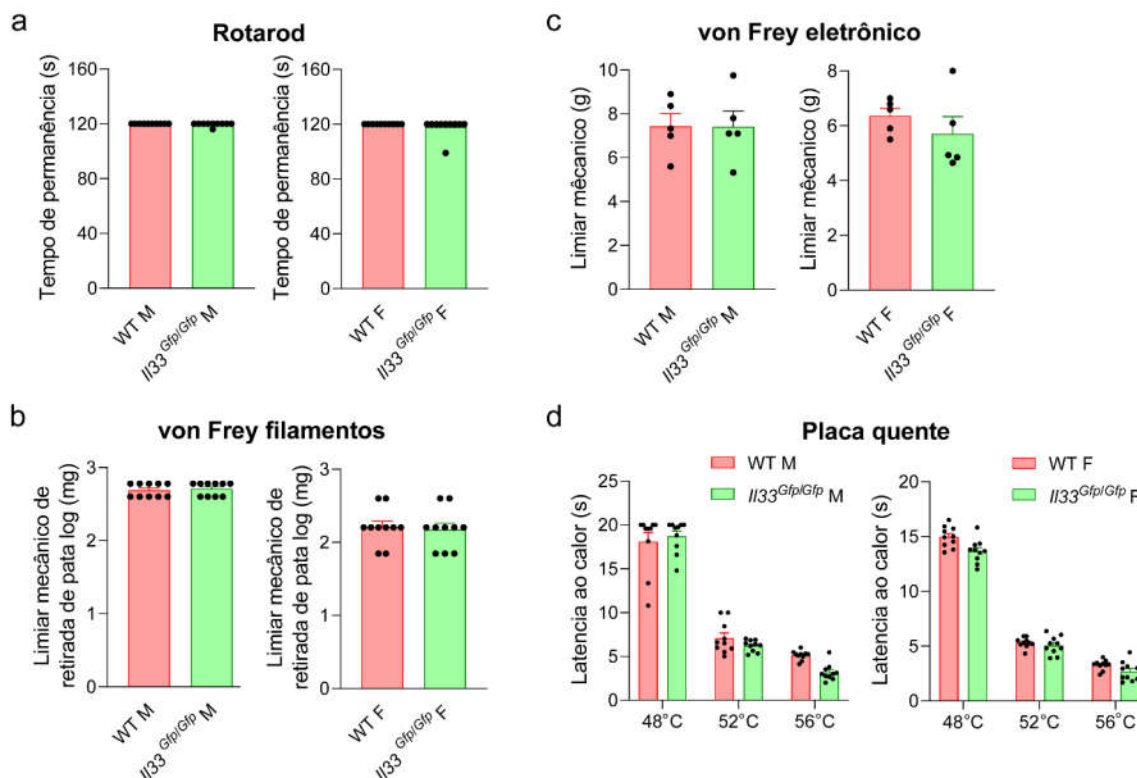


Figura 7. Perfil de respostas nociceptivas fisiológicas de camundongos machos e fêmeas C57Bl/6 e com deleção total da citocina IL-33 (*I133^{Gfp/Gfp}*). (a) teste de Rotarod. (b) teste von Frey filamentos. (c) teste von Frey eletrônico. (d) teste da placa quente. Resultados expressos em média \pm E.P.M., $n=10$. Análise estatística por teste T student não pareado. $p<0,05$ comparando-se os grupos WT e *I133^{Gfp/Gfp}*.

4.5. A deleção de IL-33 atenua a dor neuropática induzida pelo CNI

Nossa próxima pergunta foi: a ausência de IL-33 é importante para o processo doloroso em animais submetidos ao modelo de CNI? Assim, buscamos avaliar modelos comportamentais de nocicepção e observar se os animais deficientes, diferentes dos WT, apresentam menor alodinia e hiperalgesia.

Os resultados dos valores de limiar de retirada de pata (log₁₀ mg) mostraram que camundongos WT apresentaram estabelecimento da alodinia mecânica e isso é revertido totalmente a partir do vigésimo oitavo dia. Contrariamente, o grupo de animais *I133^{Gfp/Gfp}* que também foi induzido a lesão apresentou aumento do limiar de retirada da pata, a partir do sétimo dia, diferindo de maneira significativa em

relação à sua contraparte wild type (Figura 8a), mostrando um perfil de respostas nociceptivas atenuadas.

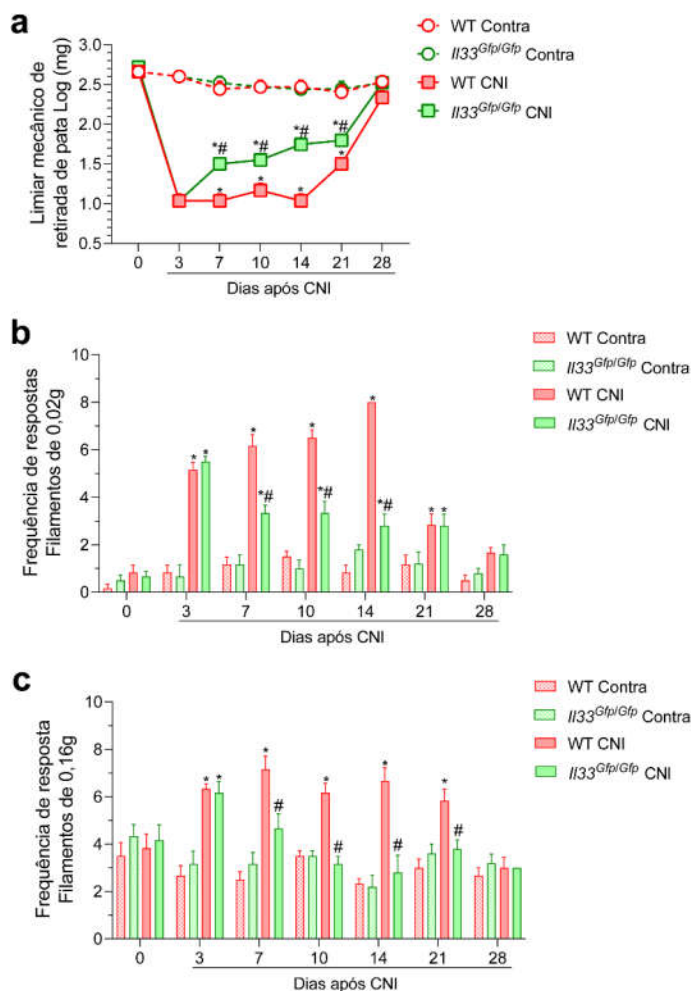


Figura 8. Perfil de respostas nociceptivas de camundongos C57Bl/6 wild type e com deleção total da citocina IL-33 durante a dor neuropática induzida pelo CNI. (a) Limiar mecânico de retirada de pata (log₁₀ limiar mg). (b) Frequência de retirada de pata a estímulos com filamento de von Frey 0,02g. (c) Frequência de retirada de pata a estímulos com filamento de von Frey 0,16g. A pata contralateral a lesão foi utilizada como controle negativo. Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo Contra vs. Crush, #p<0,05 em relação ao grupo WT CNI vs. *Il33^{Gfp/Gfp}* CNI. Resultados expressos em média ± E.P.M., n=6. Dados representativos de dois experimentos independentes.

A análise da frequência de retirada de pata após dez estímulos com filamentos Von Frey 0,02g e 0,16g, demonstrou também que animais com deleção total da citocina IL-33 apresentaram um perfil de respostas nociceptivas atenuado no decurso temporal de dor neuropática (Figuras 8b-c). Tal diferença comportamental diferiu estatisticamente de animais wild type a partir do sétimo dia após indução do CNI.

Portanto como conclusão parcial é que a falta da IL-33 atenua a dor neuropática causada pela lesão de CNI.

4.6. Ausência de IL-33 reduz a migração leucocitária de macrófagos e neutrófilos para o local da lesão

Nossa próxima pergunta foi: Animais deficientes para IL-33 apresentam comprometimento na migração de células para o local da lesão? Para observação da migração leucocitária para o local da lesão foi utilizado as seguintes estratégias de *gates* (Figura 9), animais C57BL/6, *Il33^{Gfp/+}* e *Il33^{Gfp/Gfp}*, foram submetidos a lesão por esmagamento e amostras do nervo isquiático foram coletados para citometria de fluxo cinco dias após a lesão.

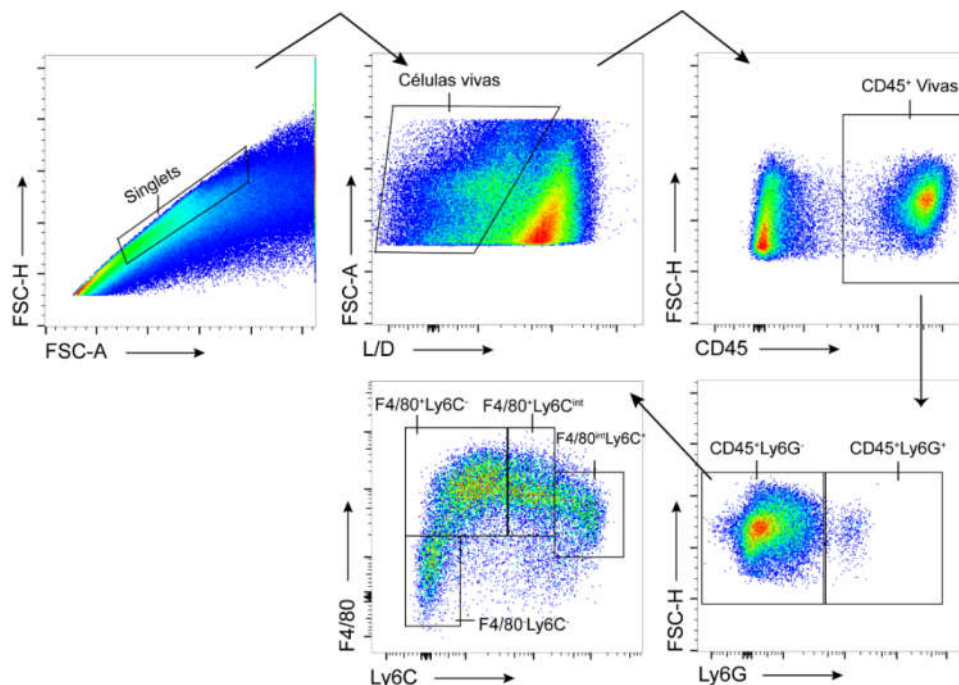


Figura 9. Esquema de gates para citometria de fluxo para avaliação da migração de células inflamatórias circulantes. As células foram então bloqueadas com altura de dispersão direta (FSC-H) e FSC-A para encontrar células únicas e excluir *duplets*. As células vivas foram isoladas por coloração negativa para corante de viabilidade (Live and Dead). Nos nervos, leucócitos foram analisados da seguinte forma: as células mielóides (CD45⁺) foram posteriormente separadas em granulócitos Ly6G⁺. As células restantes (CD45⁺Ly6G⁻) foram caracterizadas como Monócitos/Macrófagos (CD45⁺Ly6G⁻).

Interessantemente, ocorreu diminuição significativa de leucócitos (CD45⁺) tanto na frequência quanto número absoluto de nos animais deficientes, quando comparados aos animais WT e *I133^{Gfp/+}* (Figura 10).

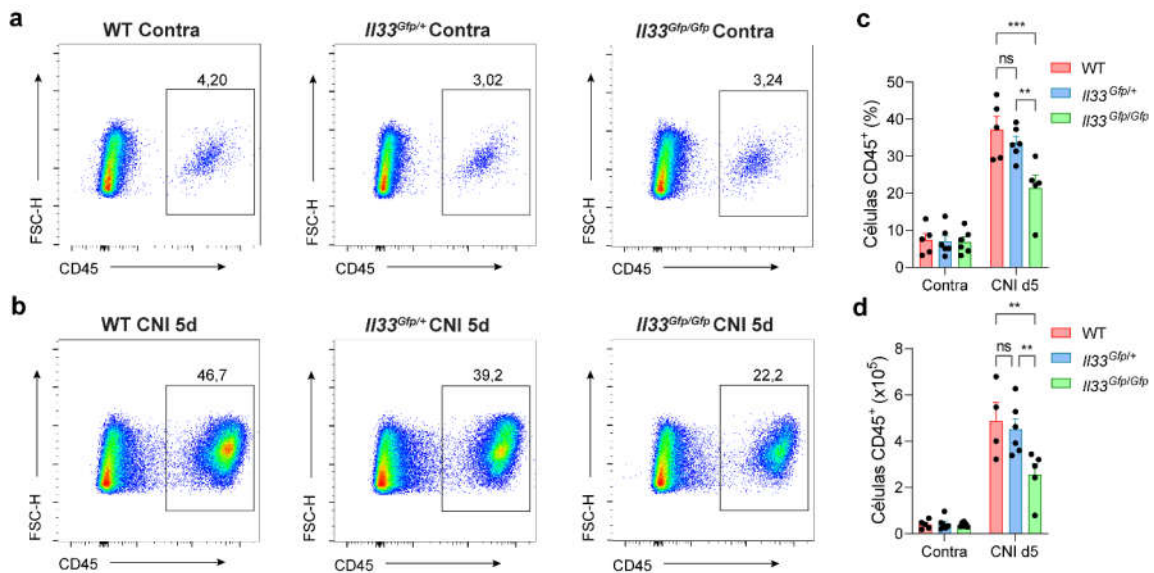


Figura 10. A ausência de IL-33 altera a migração de leucócitos para o local da lesão no nervo isquiático de camundongos submetidos ao CNI. (a-b) Gates representativas dos diferentes grupos experimentais. **(c)** Frequência de leucócitos totais (CD45⁺). **(d)** Número absoluto de leucócitos totais. A pata contralateral a lesão foi utilizada como controle negativo. Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm E.P.M., $n=5$. Dados representativos de um único experimento.

Observamos também uma diminuição significativa dos granulócitos CD45⁺Ly6G⁺ para o local da lesão em animais *Il33^{Gfp/Gfp}* em relação aos animais WT e *Il33^{Gfp/+}* (Figura 11c-d). Além disso, isolamos os macrófagos/monócitos (CD45⁺Ly6G⁻).

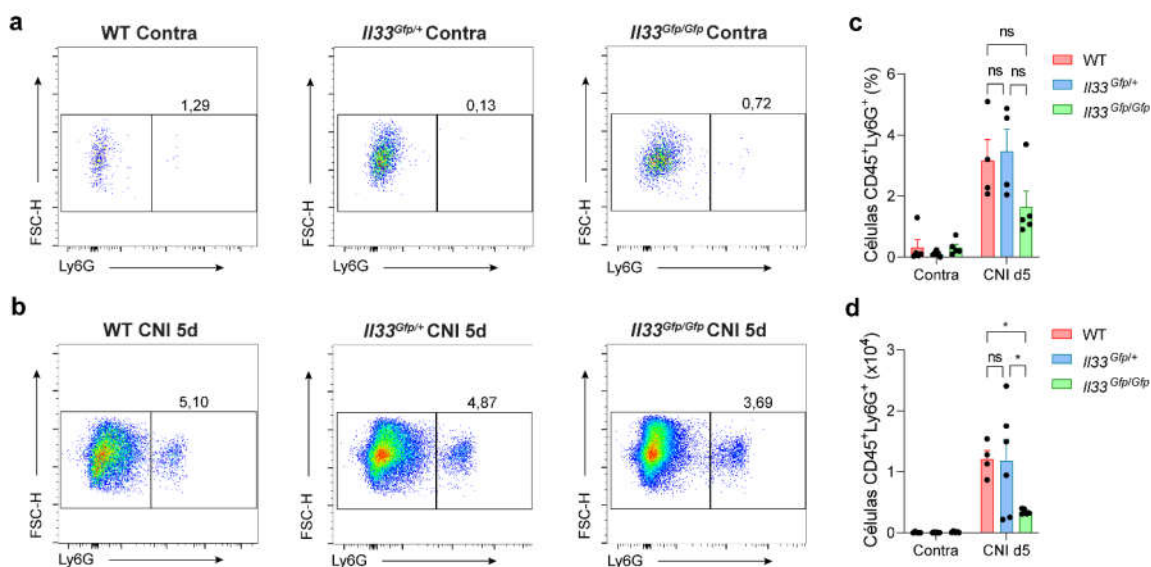


Figura 11. A ausência de IL-33 altera o número total de neutrófilos para o local da lesão no nervo isquiático de camundongos submetidos ao CNI. (a-b) Gates representativas dos diferentes grupos experimentais. (c) Frequência de neutrófilos (CD45⁺Ly6G⁺). (d) Número absoluto de neutrófilos. A pata contralateral a lesão foi utilizada como controle negativo. Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm E.P.M., $n = 5$. Dados representativos de um único experimento.

O receptor F4/80 é presente em macrófagos maduros, dessa forma é possível observar uma população positiva para F4/80 no nervo ciático contralateral a lesão em todos os grupos, esses macrófagos são os residentes do nervo ciático (Figura 12a). Em adição, durante a lesão observamos que os monócitos (Ly6C⁺) expressam de forma intermediária o receptor F4/80 (Figura 12b), e esta expressão aumenta com a perda da expressão de Ly6C por essas células (Figura 12b).

Animais deficientes para IL-33 apresentaram menor frequência e número absoluto de monócitos (F4/80^{int}Ly6C⁺) (Figura 12 f,j) e macrófagos/monócitos em maturação (F4/80⁺Ly6C^{int}) (Figura 12 e,i). Além disso, a falta de IL-33 também levou a um menor número absoluto de macrófagos (F4/80⁺Ly6C⁻) em relação aos animais *Il33^{Gfp/+}*, mas não aos animais WT. (Figura 12h).

Ainda encontramos uma população duplo negativa para Ly6C e F4/80, que deduzimos serem células dendríticas (DCs) e/ou células dendríticas derivadas de

monócitos (MoDC). Foi possível observar que essa população está em menor número absoluto nos animais *IL33^{Gfp/Gfp}* em comparação aos animais *IL33^{Gfp/+}*, mas não aos animais WT (Figura 12g).

Portanto, a conclusão parcial é que a falta da IL-33 diminuiu a migração das células imunes para o local da lesão, afetando também a maturação dos monócitos para macrófagos. Contudo, ainda não sabemos se está ocorrendo um atraso na maturação dessas células ou um menor infiltrado em dias anteriores que leva a de macrófagos maduros no quinto dia pós a lesão.

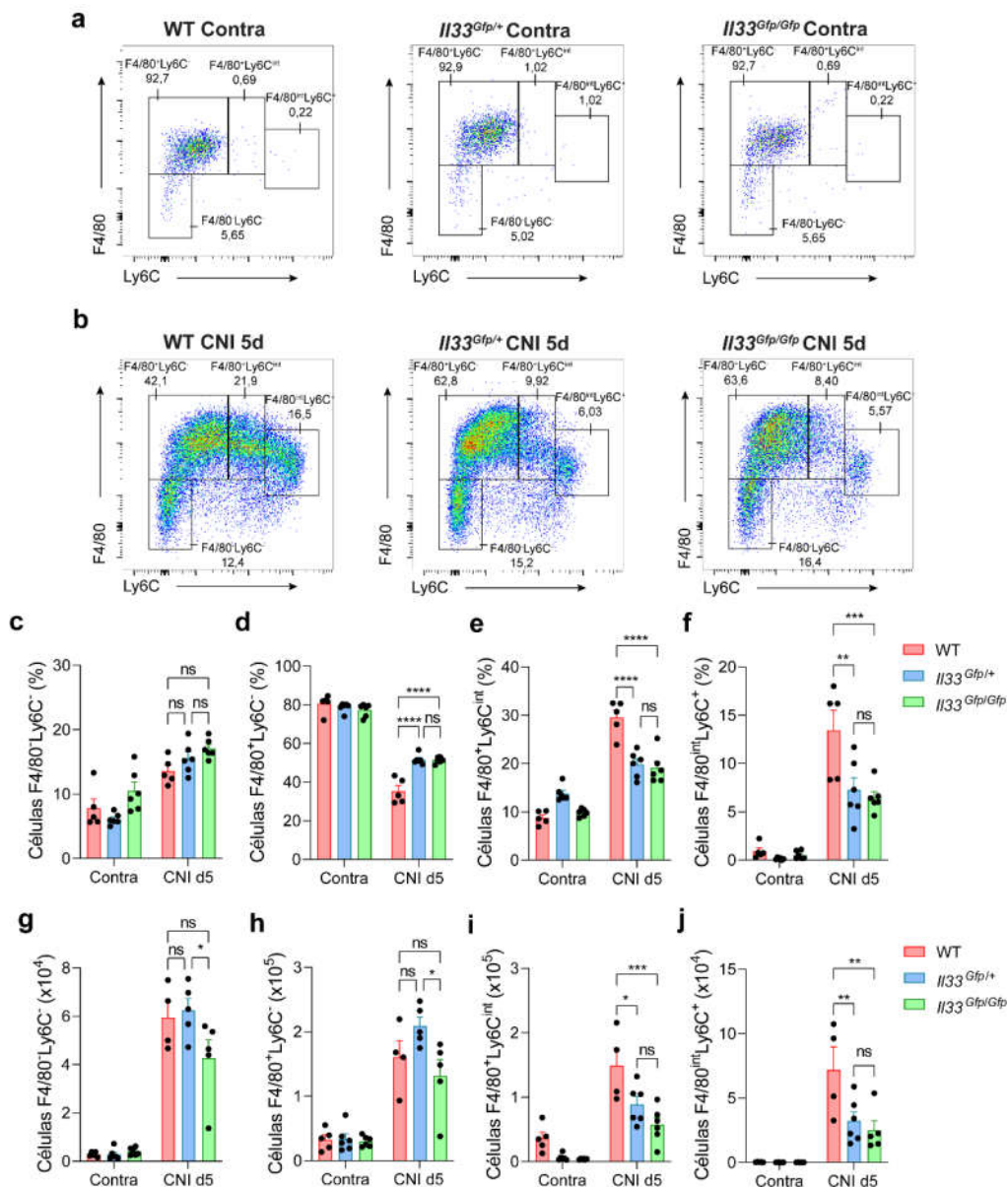


Figura 12. A ausência de IL-33 diminui a frequência e o número absoluto da maturação de monócitos em macrófagos no local da lesão no nervo isquiático de camundongos submetidos ao CNI. (a,b) Gates representativas dos diferentes grupos experimentais. **(c,g)** Frequência e número absoluto de macrófagos (CD45⁺Ly6G⁻F4/80⁺Ly6C⁻). **(d,h)** Frequência e número absoluto de células dendríticas e MoDC (CD45⁺Ly6G⁻F4/80⁺Ly6C^{int}). **(e,i)** Frequência e número absoluto de mo/mac (CD45⁺Ly6G⁻F4/80⁺Ly6C^{int}). **(f,j)** Frequência e número absoluto de monócitos (CD45⁺Ly6G⁻F4/80^{int}Ly6G⁺). A pata contralateral a lesão foi utilizada como controle negativo. Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, p<0,05. Resultados expressos em média ± E.P.M., n=5. Dados representativos de um único experimento.

5. DISCUSSÃO

Os achados deste estudo demonstram que a citocina IL-33 pode ser contribuidora para o desenvolvimento dessa condição patológica de DW. Assim, a dor neuropática causada por lesões no nervo isquiático afeta em média de 3-17% da população mundial (BOUHASSIRA et al., 2008; COLLOCA et al., 2017), e a maioria dos medicamentos empregados na clínica não conseguem amenizar a sensação dolorosa e trazer confortos aos pacientes, a busca por alvos moleculares responsáveis por este efeito adverso debilitante adicionaria novas perspectivas terapêuticas para o tratamento dessa condição.

Diferentes formas de lesão do SNC e/ou SNP (provocadas por traumas, agentes quimioterápicos, infecções ou doenças de caráter autoimune) resultam em alterações na função dos neurônios sensoriais primários e em suas vias de projeção central, também associadas a uma robusta resposta imune (CALVO; DAWES; BENNETT, 2012). O recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão tem sido reportado não apenas em modelos murinos de neuropatia, mas também em biópsias de nervos de pacientes diagnosticados com essas diversas patologias (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010; LINDENLAUB; SOMMER, 2003). Deste modo, o estudo das interações neuro imunes que ocorrem devido a lesão de nervos periféricos é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a recuperação mais rápida do tecido e também tratamento da dor neuropática causada por essa inflamação.

As alarminas são moléculas liberadas por células em resposta a dano tecidual, infecções e traumas. Suas principais funções são de ativação rápida de células imunes residentes do tecido e/ou ativação de células não mielóide do tecido, que interagem com essas moléculas via receptores específicos, e assim iniciam a liberação de quimiocinas para recrutamento de células imunes circulantes (CAYROL; GIRARD, 2014b; CHERNOV et al., 2015). A IL-33 já é descrita como uma alarina necessária para estabelecimento de respostas alérgicas em pulmões e no trato gastrointestinal (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016), e também já foi descrita sendo importante em respostas inflamatórias como dor (FATTORI; BORGHI; VERRI, 2017),

sepsis (ALVES-FILHO et al., 2010) e câncer (HATZIOANNOU et al., 2020; TANIGUCHI et al., 2020).

Uma vez já observado na literatura a presença de IL-33 no SNC, sendo importante para a recuperação do tecido após lesão na medula espinal (GADANI et al., 2015; POMESHCHIK et al., 2015), e, sabe-se que os mecanismos de regeneração no sistema nervoso central muitas vezes são mais lentos e até menos eficazes quando comparada aos mecanismos de regeneração do SNP (MAHAR; CAVALLI, 2018). Diante disso, se fazia necessário uma investigação da presença da IL-33 no SNP e sua função na regeneração do tecido.

Recentemente diversos trabalhos foram publicados na literatura com ensaios de *single cell* RNAseq, na tentativa de melhor entender as populações que compõem o nervo isquiático saudável e em diversas desordens como diabetes (WOLBERT et al., 2020) e DW (CARR et al., 2019; TOMA et al., 2020). Aproveitando-se desses bancos de dados públicos (TOMA et al., 2020), realizamos re-análises de bioinformática, e confirmamos que a IL-33 era expressa nas populações de células mesenquimais em condições saudáveis e de DW. De maneira interessante, células mesenquimais são responsáveis por iniciar o microambiente inflamatório durante a DW expressando e liberando moléculas pró inflamatórias e quimiotáticas (KALINSKI et al., 2020).

Além disso, a ocorrência de um grupo de células imunes que não conseguíamos dividi-las, pelo fato do número baixo de células, e que expressam o receptor IL1RL1 mesmo em condições saudáveis. A expressão do receptor, se manteve até nove dias após a transecção do nervo, a partir desse dia, 75 a 100% dos mastócitos estão expressando o receptor IL1RL1. Mastócitos são leucócitos circulantes e já foram descritos estarem presentes no SNP, especificamente em tecidos de conexão como perineuro, epineuro e endoneuro (JOHNSON, YASUI, SEELDRAYERS, 1991). De maneira interessante, já foi descrito que a histamina, um mediador liberado principalmente por mastócitos é importante durante a DW (MACDONALD, MEZEI, MEZEI, 1981), demonstrando que essas células são importantes para processos inflamatórios que ocorrem no nervo ciático. Se faz

necessário ainda, investigar qual célula esta sendo ativada pela liberação da IL-33 durante a DW no nervo isquiático.

Ao analisarmos a presença do receptor acessório (IL1Rap) tinha como objetivo observar se o mesmo estava expresso na mesma célula que o receptor ST2, uma vez que a interação de ambos já foi descrito na literatura (PALMER et al., 2008). Essa proteína acessória forma um complexo com o IL1R, o receptor para a IL-1 β , outra citocina da família das IL-1. Em nossas análises observamos a presença do receptor acessório principalmente nas CS, e já foi descrito na literatura que a citocina IL-1 β é importante para desdiferenciação de CS durante a degeneração walleriana (CHEN et al., 2019).

As primeiras células recrutadas durante a DW são os neutrófilos e monócitos, já foi descrito na literatura que ambos podem expressar o receptor para IL-33, o IL1RL1 em diferentes processos inflamatórios (VERRI et al., 2010; ZHANG et al., 2017). Averiguamos o perfil de expressão gênica de IL-33 e IL1RL1, e de neutrófilos pela expressão de CXCL1/KC e monócitos por *Aif1/Iba1* durante diferentes dias de lesão, e observamos que os picos de expressão dos genes para neutrófilos e monócitos foram no primeiro dia após lesão, e o único pico de expressão *Il1rl1/ST2* se deu a partir do terceiro dia, enquanto a expressão de IL-33 se manteve constante. Os dados de expressão gênica relativa conseguiram nos dar indícios de que IL1RL1 está regulada durante a DW e isso possivelmente pode estar relacionado com a presença de neutrófilos e monócitos durante a inflamação no nervo isquiático, mesmo que a bioinformática não tenha nos mostrado isso.

Dessa maneira, investigar se a falta da IL-33 em animais submetidos ao modelo de CNI, aumentaria o limiar nociceptivo dos mesmos, uma vez que a DW causa dor neuropática (ROTSHENKER, 2011) era necessária. Os nossos achados mostraram que os animais deficientes para IL-33 após indução do CNI tiveram aumento do limiar nociceptivo quando comparado aos WT em todos os testes empregados.

Essa diferença de resposta indica uma DW mais lenta ou até um ambiente menos inflamatório. Tal ideia seria possível de acordo com a literatura, visto que em animais com a *Wds* (*slow Wallerian degeneration*) tem aumento do limiar nociceptivo

(MYERS; HECKMAN; RODRIGUEZ, 1996). Além disso, a ativação via receptor ST2 de neutrófilos, macrófagos e até de mastócitos, já foram descritos como importantes células no desenvolvimento da dor neuropática (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; ZUO et al., 2003), dessa forma a não ativação dessas células pelos animais deficientes para IL-33, pode ter contribuído para a diminuição da alodinia que observamos. Ainda se faz necessário mais experimentos com outras metodologias de testes funcionais para os animais deficientes, como o Índice de Funcionalidade do Ciático, que mostra a funcionalidade do ciático a partir da análise da forma da pata dos animais que foram submetidos a degeneração walleriana, com esse teste poderemos, então, inferir que os animais tem uma recuperação mais rápida ou mais lenta do ciático. Justamente, os testes comportamentais não conseguiram nos responder se os animais deficientes estão se recuperando mais rápido.

Seguindo a ideia da correlação entre a diminuição da dor neuropática nos animais nocautes e um menor estado inflamatório no nervo isquiático. Uma vez que a IL-33 sendo uma alarmina e ative o receptor IL1RL1 em uma célula que é importante para liberação de mediadores inflamatórios e leva a ativação dos leucócitos no nervo isquiático e liberação de mais mediadores inflamatórios atraindo ainda mais células para o local da lesão, foi justamente o que observamos nos animais deficientes para IL-33, a diminuição no números de leucócitos totais, em específico granulócitos e monócitos/macrófagos.

Macrófagos são células plásticas, e ainda é um desafio utilizar marcadores que consigam diferenciar macrófagos residentes de monócitos que infiltraram e se tornaram macrófagos maduros. O marcador F4/80 é amplamente utilizado para macrófagos residentes em conjunto com CD68, outro marcador. No nosso estudo utilizamos a marcação para F4/80 a fim de diferenciar macrófagos em relação a monócitos foi possível observar que nas amostras de nervo ciático controle é possível observar a presença de células $F4/80^+Ly6C^-$, indicando os macrófagos residentes do nervo ciático (SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021).

Já foi descrito que esses macrófagos residentes são importantes no início da DW, mas com o passar do tempo essas células morrem e são repovoadas pelos monócitos que infiltram no tecido e se maturam (YDENS et al., 2020). Além disso,

essa maturação é característica do modelo de CNI, ao passo que em até dez dias após a lesão, a maioria dos macrófagos não expressam mais Ly6C (KALINSKI et al., 2020).

Evidentemente, no quinto dia é possível observar, ambos fenômenos, a população de granulócitos e a maturação de monócitos em macrófagos. Entretanto, ainda não sabemos se a redução da maturação nos animais deficientes para IL-33 é devido a um menor infiltrado que ocorre nos dias iniciais, visto que o pico de infiltrado de neutrófilos e monócitos já ocorreu anteriormente. A nossa escolha do quinto dia se deu pelo fato de que os animais tiveram respostas nos testes comportamentais a partir do sétimo dia, dessa forma buscamos um tempo onde poderíamos analisar a quantidade das células que estariam reduzidas nos animais deficientes em relação aos WT próximo ao sétimo dia.

Ainda em relação a população duplo negativa para F4/80 e Ly6C, acreditamos que elas sejam células dendríticas (DC) e/ou células dendríticas derivadas de monócitos (MoDC), pelo fato de não termos usado os marcadores CD11b e CD11c, importante para isolar essas células (DC - CD45⁺CD11b⁻CD11c⁺ e MoDC - CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺). Existe a presença de ambos tipos celulares na DW (KALINSKI et al., 2020), e elas são importantes para a resposta linfóide que ocorrerá nos dias posteriores.

Logo, se os animais deficientes estão possuindo menor quantidade dessas células, abre uma perspectiva de investigar como está o perfil linfóide que chegará no nervo ciático nos dias posteriores, e qual o fenótipo desses linfócitos. Um perfil mais inflamatório e reativo, como Th1, ou um perfil mais Th2, visto a presença de mastócitos pelos dados de bioinformática e até mesmo um perfil de células T reguladoras que serão importantes para o reparo tecidual que ocorrerá.

Dessa forma, embora a resposta biológica gerada pelo acoplamento da interleucina-33 ao seu receptor ainda necessite de mecanismos mais explicativos nesse modelo experimental, a hipótese mais plausível seja de que esta citocina está sendo liberada como alarmina e seja uma das principais sinalizadoras no recrutamento e ativação de leucócitos circulantes, propiciando um ambiente mais

inflamatório no nervo isquiático, o que acarreta na sensibilização de neurônios e amplifica então, os sinais nociceptivos.

6. CONCLUSÃO

Considerando-se que não existe descrição do papel da IL-33 na degeneração Walleriana, nosso estudo lança de maneira inédita um novo conceito no campo das interações neuro imunes, em que uma citocina nunca descrita no SNP, e já descrita sendo importante para a regeneração do sistema nervoso central, passa agora a ter um papel crucial de sinalização na degeneração walleriana. Portanto, o bloqueio desse eixo de sinalização despontaria como uma possível estratégia terapêutica.

Assim, concluímos que a citocina IL-33 contribui para o desenvolvimento da degeneração Walleriana, atuando como alarmina na sinalização do dano celular, conseqüentemente aumentando o estado inflamatório no nervo isquiático. Além disso, participa da infiltração de leucócitos circulantes contribuindo também para a dor neuropática.

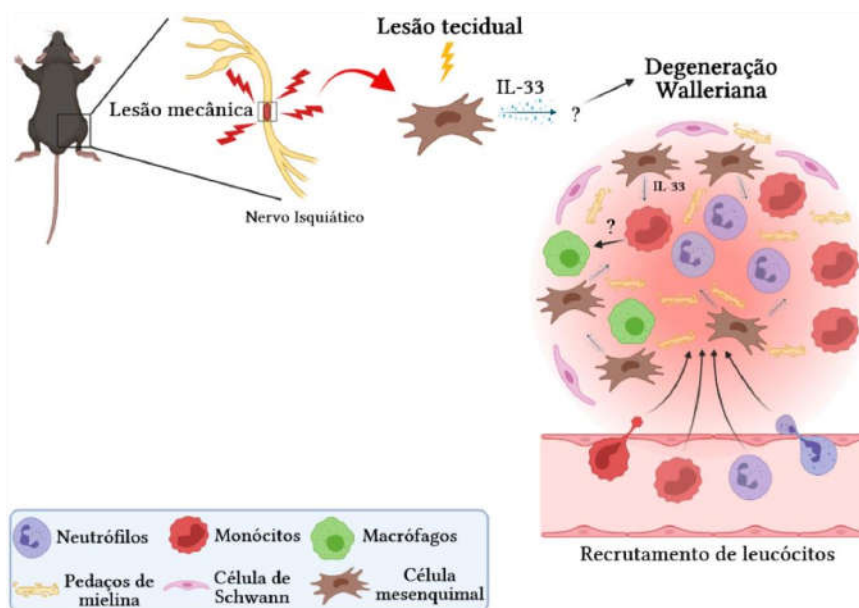


Figura 13. Desenho esquemático sobre o papel da IL-33 no mecanismo de degeneração Walleriana em modelo de lesão traumática. As células mesenquimais liberam a citocina IL-33 devido a lesão tecidual, ainda não se sabe qual célula(s) são ativadas com essa liberação. A IL-33 é importante para o recrutamento de leucócitos circulantes e uma vez, que os monócitos estão presentes no tecido, ela continua sendo liberada e ainda não se sabe se ela interage diretamente nessas células, sendo importante para a maturação em macrófagos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD RACHMAN ISNADI, M. F. et al. Critical Roles of IL-33/ST2 Pathway in Neurological Disorders. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.

ALI, S. et al. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 47, p. 18660–18665, 2007.

ALLAKHVERDI, Z. et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 253–258, 2007.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 708–712, 2010.

AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 229, n. 1–2, p. 26–50, 2010.

BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I. M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 7, p. 433–447, 2019.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337–348, 2011.

BOBINSKI, F. et al. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. **Pain**, v. 156, n. 12, p. 2595–2606, 2015.

BOISSONNAS, A. et al. Imaging resident and recruited macrophage contribution to Wallerian degeneration. **The Journal of experimental medicine**, v. 217, n. 11, 2020.

BOLANLE, F. et al. Downstream Toll-like receptor signaling mediates adaptor-specific cytokine expression following focal cerebral ischemia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.

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

CALVO, M.; DAWES, J. M.; BENNETT, D. L. H. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 7, p. 629–642, 2012.

CARR, M. J. et al. Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration. **Cell Stem Cell**, v. 24, n. 2, p. 240–256.e9, 2019.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. IL-33: An alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 31, p. 31–37, 2014a.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. IL-33: An alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 31, p. 31–37, 2014b.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 154–168, 2018.

CHEN, G. et al. Interleukin-1 β promotes schwann cells de-differentiation in wallerian degeneration via the c-JUN/AP-1 pathway. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. July, p. 1–10, 2019.

CHEN, P.; PIAO, X.; BONALDO, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 5, p. 605–618, 2015.

CHEN, Z. L.; YU, W. M.; STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, p. 209–233, 2007.

CHERNOV, A. V. et al. The calcium-binding proteins S100a8 and S100a9 initiate the early inflammatory program in injured peripheral nerves. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 18, p. 11771–11784, 2015.

CHIU, I. M. et al. Transcriptional profiling at whole population and single cell levels

reveals somatosensory neuron molecular diversity. **eLife**, v. 3, p. 1–32, 2014.

CLEMENTS, M. P. et al. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. **Neuron**, v. 96, n. 1, p. 98–114.e7, 2017.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain [Review]. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17002, 2017.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359–371, 2005.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824–832, 2008.

DEFRANCESCO-LISOWITZ, A. et al. The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **Neuroscience**, v. 302, p. 174–203, 2015.

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

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 385–393, 1953.

FATTORI, V. et al. Targeting IL-33/ST2 signaling: regulation of immune function and analgesia. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 12, p. 1141–1152, 2017.

FATTORI, V.; AMARAL, F. A.; VERRI, W. A. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 84–98, 2016.

FATTORI, V.; BORGHI, S. M.; VERRI, W. A. **IL-33/ST2 signaling boosts inflammation and pain** **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America National Academy of Sciences, , 21 nov. 2017.

FENINI, G.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L. E. Potential of IL-1, IL-18 and inflammasome inhibition for the treatment of inflammatory skin diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. MAY, p. 1–20, 2017.

GADANI, S. P. et al. The Glia-Derived Alarmin IL-33 Orchestrates the Immune Response and Promotes Recovery following CNS Injury. **Neuron**, v. 85, n. 4, p. 703–709, 2015.

HAN, P. et al. Spinal IL-33/ST2 Signaling Contributes to Neuropathic Pain. n. 5, p. 1154–1169, 2016.

HARALDSEN, G. et al. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? **Trends in Immunology**, v. 30, n. 5, p. 227–233, 2009.

HATZIOANNOU, A. et al. An intrinsic role of IL-33 in Treg cell-mediated tumor immunoevasion. **Nature Immunology**, v. 21, n. 1, p. 75–85, 2020.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Myelin-stimulated macrophages release neurotrophic factors for adult dorsal root ganglion neurons in culture. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 16, n. 4, p. 517–528, 1996.

HOBBS, A. **Book Review: Classification of Chronic Pain, Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. 2nd Edition.** [s.l: s.n.]. v. 23

HUANG, J. K. et al. Neuroscience: Glial membranes at the node of ranvier prevent neurite outgrowth. **Science**, v. 310, n. 5755, p. 1813–1817, 2005.

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

JI, R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. role in chronic pain maintenance (2). For example, fibromyalgia, a widespread chronic pain syn-. **Pain Research**, v. 354, n. 6312, p. 572–577, 2016.

JOHANNES, C. B. et al. The Prevalence of Chronic Pain in United States Adults:

Results of an Internet-Based Survey. **Journal of Pain**, v. 11, n. 11, p. 1230–1239, 2010.

JOHNSON, D. et al. An Analysis of Mast Cell Frequency in the Rodent Nervous System: Number Vary between Different Strains and Can Be Reconstituted in Mast Cell-Deficient Mice. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. v. 50, n. 3, p. 227-234, 1991

KAKKAR, R.; LEE, R. T. The IL-33/ST2 pathway: Therapeutic target and novel biomarker. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 827–840, 2008.

KALINSKI, A. L. et al. Analysis of the Immune Response to Sciatic Nerve Injury Identifies Efferocytosis as a Key Mechanism of Nerve Debridement. **eLife Science**, p. 1–41, 2020.

KIGUCHI, N. et al. Epigenetic upregulation of CCL2 and CCL3 via histone modifications in infiltrating macrophages after peripheral nerve injury. **Cytokine**, v. 64, n. 3, p. 666–672, 2013.

LEFRANÇAIS, E. et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 5, p. 1673–1678, 2012a.

LEFRANÇAIS, E. et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 5, p. 1673–1678, 2012b.

LEFRANÇAIS, E. et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 43, p. 15502–15507, 2014.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J. P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 11, p. 676–689, 2016.

LINDBORG, J. A.; MACK, M.; ZIGMOND, R. E. Neutrophils are critical for myelin removal in a peripheral nerve injury model of wallerian degeneration. **Journal of**

Neuroscience, v. 37, n. 43, p. 10258–10277, 2017.

LINDENLAUB, T.; SOMMER, C. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. **Acta Neuropathologica**, v. 105, n. 6, p. 593–602, 2003.

LIU, B. et al. IL-33/ST2 signaling excites sensory neurons and mediates itch response in a mouse model of Poison ivy contact allergy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 47, p. E7572–E7579, 2016.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

LÜTHI, A. U. et al. Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. **Immunity**, v. 31, n. 1, p. 84–98, 2009.

MACDONALD, S. M. et al. Effect of Wallerian Degeneration on Histamine Concentration of the Peripheral Nerve. **Journal of Neurochemistry**. v. 36, n. 1, p9–16, 1981.

MAHAR, M.; CAVALLI, V. Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 323–337, 2018.

MOUSSION, C.; ORTEGA, N.; GIRARD, J. P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel “Alarmin”? **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. 1–8, 2008.

MUELLER, M. et al. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 6, p. 2187–2197, 2001.

MYERS, R. R.; HECKMAN, H. M.; RODRIGUEZ, M. Reduced hyperalgesia in nerve-injured WLD mice: Relationship to nerve fiber phagocytosis, axonal degeneration, and regeneration in normal mice. **Experimental Neurology**, v. 141, n. 1, p. 94–101, 1996.

NAPOLI, I. et al. A Central Role for the ERK-Signaling Pathway in Controlling Schwann Cell Plasticity and Peripheral Nerve Regeneration In Vivo. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 729–

742, 2012.

NISHIKAWA, N.; NOMOTO, M. Management of neuropathic pain. **Journal of General and Family Medicine**, v. 18, n. 2, p. 56–60, 2017.

O'NEILL, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 Years of progress. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 10–18, 2008.

OBOKI, K. et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18581–18586, 2010.

OHNO, T. et al. Caspase-1, Caspase-8, and Calpain Are Dispensable for IL-33 Release by Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 7890–7897, 2009.

PALMER, G. et al. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. **Cytokine**, v. 42, n. 3, p. 358–364, 2008.

PERRIN, F. E. et al. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 α and interleukin-1 β Wallerian degeneration. **Brain**, v. 128, n. 4, p. 854–866, 2005.

PERRY, V. H.; BROWN, M. C. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. **BioEssays**, v. 14, n. 6, p. 401–406, 1992.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. **Neuropharmacology**, v. 105, p. 508–519, 2016.

POMESHCHIK, Y. et al. Interleukin-33 treatment reduces secondary injury and improves functional recovery after contusion spinal cord injury. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 44, p. 68–81, 2015.

ROTSHENKER, S. Wallerian degeneration: The innate-immune response to traumatic nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 1–14, 2011.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Contribution of interleukin-1 β to the inflammation-

induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 7, p. 1265–1275, 1995.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11s, p. 1062–1067, 2002.

SCHUH, C. D. et al. Prostacyclin mediates neuropathic pain through interleukin 1 β -expressing resident macrophages. **Pain**, v. 155, n. 3, p. 545–555, 2014.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of wallerian degeneration: Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3052–3060, 2002.

SIEBERT, H. et al. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, v. 110, n. 1–2, p. 177–185, 2000.

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

STRATTON, J. A. et al. Macrophages Regulate Schwann Cell Maturation after Nerve Injury. **Cell Reports**, v. 24, n. 10, p. 2561- 2572.e6, 2018.

STUART, T. et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1888- 1902.e21, 2019.

TAKTAK, Y. S. et al. Assay of Pyrogens by Interleukin-6 Release from Monocytic Cell Lines. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, n. 8, p. 578–582, 1991.

TALABOT-AYER, D. et al. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19420–19426, 2009.

TANIGUCHI, S. et al. Tumor-initiating cells establish an IL-33–TGF- β niche signaling loop to promote cancer progression. **Science**, v. 369, n. 6501, 2020.

TOFARIS, G. K. et al. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6696–6703, 2002.

TOMA, J. S. et al. Peripheral Nerve Single-Cell Analysis Identifies Mesenchymal Ligands that Promote Axonal Growth. **eNeuro**, v. 7, n. 3, p. 1–70, 2020.

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

VERRI, W. A. et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 9, p. 1697–1703, 2010.

VERRI, W. A. et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2723–2728, 2008.

WILLIAMS, A. C. D. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2420–2423, 2016.

WOLBERT, J. et al. Redefining the heterogeneity of peripheral nerve cells in health and autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 17, p. 9466–9476, 2020.

WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: The contribution of tumour necrosis factor α . **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 3, p. 417–424, 1997.

WU, G. et al. Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7746–7753, 2002.

- XU, D. et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 10913–10918, 2008.
- YDENS, E. et al. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.
- YDENS, E. et al. Profiling peripheral nerve macrophages reveals two macrophage subsets with distinct localization, transcriptome and response to injury. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 5, p. 676–689, 2020.
- ZARPELON, A. C. et al. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: Role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E 2. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 1, p. 90–101, 2013.
- ZARPELON, A. C. et al. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. **FASEB Journal**, v. 30, n. 1, p. 54–65, 2016.
- ZARPELON, A. C. et al. The Sesquiterpene Lactone, Budlein A, Inhibits Antigen-Induced Arthritis in Mice: Role of NF- κ B and Cytokines. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 2020–2032, 2017.
- ZHANG, H. F. et al. IL-33 promotes IL-10 production in macrophages: A role for IL-33 in macrophage foam cell formation. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 11, 2017.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.
- ZUO, Y. et al. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: A key role of mast cells. **Pain**, v. 105, n. 3, p. 467–479, 2003.

ANEXO I



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



AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: "*A ALARMINA IL-33 PARTICIPANDO DA DEGENERAÇÃO WALLERIANA E REGENERAÇÃO AXONAL DO NERVO APÓS LESÃO PERIFÉRICA*", registrado com o número do protocolo **150/2020**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 25 de janeiro de 2021.

Colaborador: Gabriel Victor Lucena da Silva

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

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			25/01/2021 a 16/11/2025	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	210	20g / 40 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / ST2 KO	144	20g / 40 dias	Macho	Centro de Criação de Camundongos Especiais
Camundongo / IL-33 GFP	144	20g / 40 dias	Macho	Centro de Criação de Camundongos Especiais

Ribeirão Preto, 25 de janeiro de 2021

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP