

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ALLAN PRADELLI ROLDÃO

**Vias de sinalização desencadeadas pela ativação da
TrkA de *Heterocephalus glaber* pelo fator de
crescimento neural**

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

19/06/2020

ALLAN PRADELLI ROLDÃO

**Vias de sinalização desencadeadas pela ativação da
TrkA de *Heterocephalus glaber* pelo fator de
crescimento neural**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Schechtman

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Roldão, Allan Pradelli

R744v Vias de sinalização desencadeadas pela ativação da TrkA de *Heterocephalus glaber* pelo fator de crescimento neural / Allan Pradelli Roldão. - São Paulo, 2020.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Schechtman, Deborah

1. Dor. 2. Sinalização. 3. Mutantes. 4. TrkA. 5. *Heterocephalus glaber*. I. T. II. Schechtman, Deborah, orientador.

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço por todo apoio e ajuda a todos que estiveram sempre ao meu lado, tanto na vida pessoal quanto no decorrer da minha carreira. Agradeço a minha orientadora por confiar no meu trabalho e me ajudar nesse percurso que foi de muito aprendizado e crescimento. Agradeço ao apoio financeiro da minha bolsa CAPES, órgão fundamental na minha vida desde o programa Ciência sem Fronteiras. Devemos sempre defender o que ajuda no crescimento do nosso país! À FAPESP pelo auxílio no início da minha vida acadêmica (IC) e durante todo o período do mestrado em que pude usufruir dos recursos do laboratório pelo fomento desse órgão através de projetos da minha orientadora. A todos os colaboradores, laboratórios e facilities, graças aos quais eu pude ter grande liberdade durante o meu trabalho de desenvolver qualquer experimento, podendo contar com esse apoio.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

ROLDÃO, A. P. **Vias de sinalização desencadeadas pela ativação da TrkA de *Heterocephalus glaber* pelo fator de crescimento neural**. 2020. 95p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A nocicepção é caracterizada pela sensação de dor aguda captada por neurônios periféricos (nociceptores) perante um estímulo nocivo (térmico ou mecânico). Nociceptores são neurônios capazes de sensibilizar a dor em indivíduos através de cascatas de sinalização desencadeadas por diversos fatores, incluindo-se o fator de crescimento neural (NGF - *nerve growth factor*) frente um contexto de injúria ou inflamação. O NGF é um fator neurotrófico que auxilia na manutenção de neurônios, ligando-se ao seu receptor de alta afinidade, *tropomyosin-related kinase A* (TrkA), um receptor acoplado a uma tirosina quinase. Essa interação ativa vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e prevenção da apoptose, concomitantemente à sensibilização de vias de dor através da ativação de um canal de cátions (*transient receptor potential vanilloid 1* - TRPV1), relacionado à percepção de dor causada por calor ou por capsaicina (composto ativo de pimentas). Finalmente, ocorre a sensibilização dos nociceptores a partir de um potencial de ação gerado pela ativação de TRPV1, que permite o influxo de cátions e despolariza o nociceptor. O rato toupeira pelado - *naked mole rat* (NMR) é um roedor africano que possui características fisiológicas a serem estudadas que o levam a condições intrigantes, como extrema longevidade, resistência a câncer e insensibilidade à dor. Estudos recentes indicam uma menor atividade da TrkA de NMR. Essa baixa eficiência afeta diretamente a via da dor, à medida que a fosforilação de proteínas da via da TrkA fica comprometida pela baixa taxa de ativação pela auto-fosforilação do receptor e disposição reduzida de sítios de ancoragem de proteínas substratos (que surgem devido a essa ativação). É fundamental compreender que mutações presentes na TrkA do NMR afetaria as diferentes vias de sinalização da dor que contribuiriam para a insensibilidade à dor desse organismo. No total apenas quatro resíduos presentes no domínio quinase da TrkA de NMR são diferentes da TrkA de rato ou humana sendo que dois desses resíduos estão presentes apenas na TrkA do NMR. No presente trabalho, através de mutagênese sítio dirigida substituindo resíduos da TrkA de rato por resíduos da TrkA do NMR e avaliando a ativação das principais vias de sinalização ativadas pela TrkA, pudemos simular o efeito dos resíduos de aminoácidos presentes no NMR inseridos na TrkA de rato (totalmente funcional). Analisando a fosforilação de diferentes tirosinas auto-fosforiladas pela TrkA pudemos concluir que as mutações analisadas isoladamente (Leu775Cys e Lys728Gln) não tiveram a sua fosforilação diminuída de forma significativa o que nos levou a analisar a ativação de uma das proteínas alvo da TrkA – PLC γ , que teve a sua fosforilação diminuída. Essa investigação poderá servir de base para avaliar as vias essenciais mediadas pela TrkA que levam à dor auxiliando a identificação de novos alvos e o desenvolvimento de *drug leads* num contexto de busca para novos terapêuticos que substituam fármacos analgésicos não opioides.

Palavras-chave: dor, sinalização, TrkA, rato toupeira pelado, mutantes, NGF

ABSTRACT

ROLDÃO, A. P. **Signalling pathways triggered by the activation of *Heterocephalus glaber* TrkA with nerve growth factor**. 2020. 95p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nociception is characterized by the sensation of acute pain captured by peripheral neurons (nociceptors) upon a noxious stimulus (thermal or mechanical). Nociceptors are neurons capable of sensitizing pain in individuals through signaling cascades unleashed by several factors, including the nerve growth factor (NGF) in a context of injury or inflammation. NGF is a neurotrophic factor that helps in neurons maintenance, binding to its high-affinity receptor, tropomyosin-related kinase A (TrkA), a tyrosine kinase coupled receptor. Such interaction activates signaling pathways related to survival and prevention of apoptosis, simultaneously to pain-related pathways through the activation of a cation ion channel (transient receptor potential vanilloid 1 – TRPV1), related to pain perception caused by heat or capsaicin (active compound of peppers). Finally, the sensitization of nociceptors occurs after an action potential generated by the activation of TRPV1, which allows cations influx, depolarizing the nociceptor. The naked mole rat (NMR) is an African rodent whose physiological characteristics still under investigation leads to intriguing conditions, such as extreme longevity, cancer resistance and pain insensitivity. Recent studies indicate that NMR TrkA is hipoactive. This low efficiency directly affects the pain pathway, considering the disruption in the activation of downstream proteins by the low phosphorylation rate for auto-activation of the receptor and reduced disposition of anchoring sites of substrates (which arise due to this activation and autophosphorylation). It is of great importance to understand which mutations in the NMR's TrkA would affect different signaling pain pathways that would contribute to pain insensitivity of this organism. In total, in the kinase domain only four residues of NMR TrkA kinase domain are different from rat's or human's, of which two are exclusive of NMR. In the present study, using site-directed mutagenesis exchanging rat TrkA residues for NMR residues, and evaluating the activation of the main signaling pathways activated by TrkA, we could simulate the effect of the amino acid residues present on NMR inserted in rat TrkA (fully functional). Analyzing the phosphorylation of different tyrosines auto-phosphorylated by TrkA we could conclude that the analyzed point mutations isolated (Leu775Cys and Lys728Gln) did not lead to a significantly diminished phosphorylation. This led us to analyze the activation of one of the TrkA's target proteins (phospholipase gamma – PLC γ), which showed a reduced phosphorylation. This investigation could be useful to evaluate essential pathways mediated by TrkA that leads to pain aiding the identification of new targets and the development of drug leads on a context of searching for new therapeutic targets that replace non-opioid analgesics.

Keywords: pain, signalling, TrkA, naked mole rat, mutants, NGF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. O limiar na percepção da dor diminui em um quadro onde ocorre resposta inflamatória prévia.....	16
Figura 1.2. Os fatores neurotróficos são sintetizados como precursores que sofrem clivagem para obter-se a forma madura.....	19
Figura 1.3. Esquematização da TrkA.....	21
Figura 1.4. Expressão da proteína TrkA em diversos tecidos.....	22
Figura 1.5. NGF liga-se com maior afinidade a TrkA, inibindo-se a via de apoptose desencadeada por p75NTR através da ativação da via de PI3K.....	24
Figura 1.6. As vias de sinalização desencadeadas pela ativação da TrkA pelo NGF e os destinos celulares nos nociceptores.....	26
Figura 1.7. NMR possui características intrigantes acerca de longevidade.....	30
Figura 1.8. Esquema dos estudos de Omberbasic e colaboradores quanto as mudanças nas vias de sinalização da TrkA de NMR.....	32
Figura 1.9. Mortes por overdose de opioides nos Estados Unidos.....	34
Figura 3.1. Esquema das construções que expressão TrkA de rato e quimérica.....	38
Figura 4.1. Alinhamento do domínio quinase de TrkA de NMR e outros 26 mamíferos.....	49
Figura 4.2. A construção quimérica e de rato com mutação L775C não influencia na dimerização da TrkA.....	51
Figura 4.3. As construções de TrkA localizam-se na membrana das células transfectadas que as expressam.....	53
Figura 4.4. PKC β transloca-se para a membrana após ativação com PMA.....	54
Figura 4.5. A ativação por NGF de células que expressam TrkA leva à translocação de PKC β -GFP de maneira diferente entre as construções rato e quimera.....	56
Figura 4.6. As mutações L775C e K728Q não alteram a auto ativação da TrkA.....	59
Figura 4.7. Variação da ativação de TrkA em linhagens celulares e de super expressão utilizando-se construções rato, quimera e rato L775C.....	63
Figura 4.8. A localização das mutações na TrkA de NMR e a importância do resíduo de lisina que substitui a glutamina do NMR.....	65
Figura 4.9. A mutação de lisina para glutamina na TrkA de rato reduz a ativação de PLC γ e a reversão da mutação – troca por lisina em NMR aumenta a ativação do mesmo substrato.....	67
Figura 4.10. A mutação de lisina para glutamina em rato diminui a ativação de PLC γ e ERK e a reversão em quimera não ocorre com ERK.....	69
Figura 4.11. A mutação Q727K em NMR não impacta diretamente na auto-ativação da TrkA via Y674/675, nem no binding com PLC γ via Y783.....	71
Figura 5.1. Alguns resíduos conservados em rato, humano e camundongo possuem mutação em NMR na região transmembranar.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Oligonucleotídeos desenhados para realização de PCR para mutagênese sítio dirigida.	40
Tabela 3.2. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para PCR de sequenciamento.	41
Tabela 5.1. Destaque da natureza das mutações estudadas no trabalho.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AITC	Isotiocianato de alila (do inglês <i>allyl isothiocyanate</i>)
ASIC	Canal iônico sensível a ácidos (do inglês <i>acid sensing ion channel</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês <i>Brain derived neurotrophic factor</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>bovine serum albumine</i>)
C774L	Mutação de cisteína na posição 774 para leucina
CaMK II	Proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina
Cdk5	Quinase dependente de ciclina 5 (do inglês <i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CFA	Adjuvante completo de Freund (do inglês <i>Complete Freund's Adjuvant</i>)
CIPA	Insensibilidade Congênita à Dor com Anidrose (do inglês <i>Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis</i>)
Cys	Cisteína
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4', 6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
dNTP	Trifosfato de desoxinucleotídeos
DpnI	Enzima de restrição que reconhece sítios metilados
DRG	Gânglio da raiz dorsal (do inglês <i>dorsal root ganglion</i>)
Erk	Quinase reguladora de sinal extracelular (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico (do inglês <i>fibroblastic growth factor</i>)

GDP	Difosfato de guanosina (do inglês <i>guanosine diphosphate</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês <i>green fluorescent protein</i>)
Gln	Glutamina
Grb2	(do inglês <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>)
GTP	Trifosfato de guanosina (do inglês <i>guanosine triphosphate</i>)
HEK	Células de rim embrionário humano (do inglês <i>human embryonic kidney</i>)
IASP	Associação internacional para o estudo da dor (do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>)
IP3	Inositol trifosfato
K728Q	Mutação de lisina na posição 728 para glutamina
L775C	Mutação de leucina na posição 775 para cisteína
LB	Meio de cultura Luria Bertani
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógeno (do inglês <i>mitogen activated protein kinases</i>)
MEK	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno (do inglês <i>mitogen activated protein kinase kinase</i>)
mRNA	RNA mensageiro (do inglês <i>Messenger RNA</i>)
NALCN	Canal de escoamento de sódio não seletivo (do inglês <i>sodium leak channel, non-selective</i>)
NEM	N-etilmaleimida
NGF	Fator de crescimento neural (do inglês <i>nerve growth factor</i>)
NMR	Rato toupeira pelado (do inglês <i>naked mole rat</i>)

NSAID	Drogas anti-inflamatórias não esteroides (do inglês <i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>)
NT3	Fator neurotrófico 3 (do inglês <i>neurotrophic factor 3</i>)
NT4/5	Fator neurotrófico 4/5 (do inglês <i>neurotrophic factor 4/5</i>)
NTRK1	Gene que codifica a proteína TrkA
p75 ^{NTR}	Proteína de peso 75kDa receptora de neurotrofinas (do inglês <i>neurotrophin receptor</i>)
p85	Subunidade regulatória da PI3K
PBS	Tampão salino de fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês <i>protein databank</i>)
PEI	Polietilenoimina
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase (do inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinase A (do inglês <i>protein kinase A</i>)
PKC	Proteína quinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PKD	Proteína quinase d (do inglês <i>protein kinase D</i>)
PLC γ	Fosfolipase C gama (do inglês <i>phospholipase C gamma</i>)
PMA	12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (do inglês <i>Phorbol Myristate Acetate</i>)
Q727K	Mutação de glutamina na posição 727 para lisina

RAF	Fibrossarcoma rapidamente acelerado (do inglês <i>rapidly accelerated fibrosarcome</i>)
RAS	Oncogene viral de sarcoma murino (do inglês <i>rat sarcoma viral oncogene</i>)
SBED	Sociedade Brasileira para Estudo da Dor
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamina com dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Shc	Proteína transformadora SHC (do inglês <i>SHC-transforming protein</i>)
SOS	Fator de troca de guanina de Ras (do inglês <i>son of sevenless</i>)
TIRF	Microscopia de fluorescência de total reflexão interna (do inglês <i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>)
TrkA	Receptor de tropomiosina quinase A (do inglês <i>Tropomyosin-receptor kinase A</i>)
TrkB	Receptor de tropomiosina quinase B (do inglês <i>Tropomyosin-receptor kinase B</i>)
TrkC	Receptor de tropomiosina quinase C (do inglês <i>Tropomyosin-receptor kinase C</i>)
TRPA1	Receptor anquirim de potencial transiente 1 (do inglês <i>transiente receptor potential ankyrin</i>)
TRPV1	Receptor vaniloide de potencial transiente 1 (do inglês <i>transient receptor potential vanilloid 1</i>)
VR1	Receptor vaniloide 1 (do inglês <i>vanilloid receptor 1</i>)

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. Dor e nocicepção	15
1.2. Elementos Moleculares da Dor (Vias de NGF e TrkA).....	18
1.3. <i>Naked Mole Rat</i>	30
1.4. Crise de Opioides.....	32
2. Objetivos.....	36
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. Material e Métodos	37
3.1. Cultura de células.....	37
3.2. Expansão e manutenção de plasmídeos	37
3.3. Mutagênese sítio-dirigida.....	38
3.4. Transfecção de células eucarióticas.....	42
3.4.1. Para superexpressão ou transfecção transiente	42
3.4.2. Para geração de linhagens	42
3.5. Extração de proteínas e <i>Western blotting</i>	43
3.6. Imuno-ensaio <i>in-cell</i>	44
3.7. Ensaio de imunofluorescência.....	45
3.8. Microscopias de Fluorescência.....	45
3.9. Modelagens.....	46
4. Resultados.....	48
4.1. A TrkA de NMR possui mutações no domínio quinase em resíduos conservados em mamíferos	48
4.2. A TrkA de NMR não apresenta diferença na dimerização do receptor.....	50
4.3. As construções de TrkA localizam-se na membrana de células HEK293 transfectadas	52
4.4. A mutação do resíduo de cisteína não interfere na ativação da TrkA	57
4.5. Modelagem da interação com substratos indica a importância da Lisina 728 da TrkA de rato na ligação à PLC γ	64
4.6. A ativação de PLC γ é alterada ao realizar mutação na Lisina 728 por Glutamina	66
5. Discussão	73
6. Conclusões.....	84
7. Bibliografia	86

1. Introdução

1.1. Dor e nocicepção

Dor é uma sensação somática relacionada a um tipo de desconforto causado por um fator nocivo, que por sua vez pode ser decorrente de uma lesão tecidual, ou em presença de espécies tóxicas ou fatores inflamatórios (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). A Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP – *International Association for the Study of Pain*) classifica a dor como “Uma experiência desagradável sensorial e emocional associada com um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos” (IASP, [s.d.]). A região ou tecido com inflamação torna-se mais sensível a estímulos nocivos térmicos e mecânicos, classificando-se o quadro de hiperalgesia (LEWIN; LECHNER; SMITH, 2014). Outro fenômeno comum relacionado a dor inflamatória é a alodinia, em que estímulos normalmente não dolorosos causam a percepção de dor (IASP, [s.d.]) (Figura 1.1).

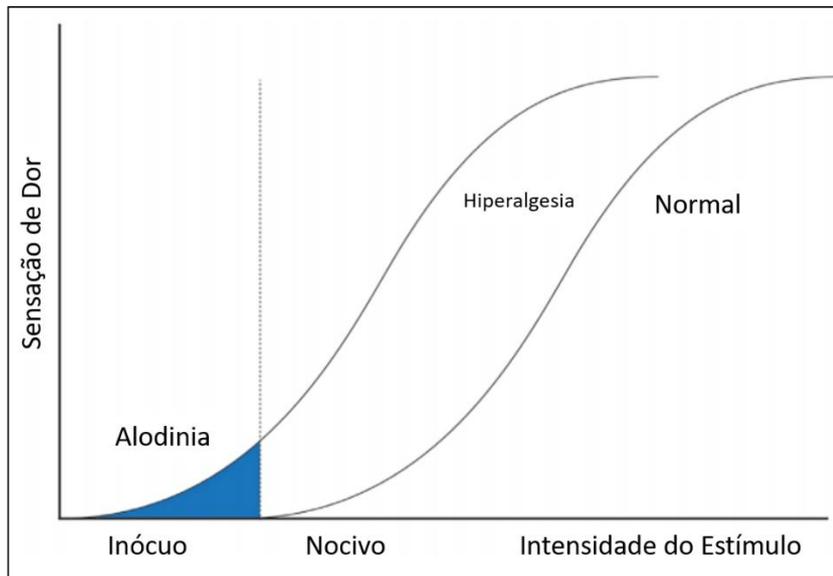


Figura 1.1. O limiar na percepção da dor diminui em um quadro onde ocorre resposta inflamatória prévia. Observa-se inicialmente o caráter exponencial na sensação de dor de acordo com o aumento na intensidade do estímulo. Em um contexto de hiperalgisia a curva desloca-se para a esquerda, de modo a diminuir a intensidade do estímulo necessária para gerar uma intensidade de dor antes menor. O intervalo que compreende sensação de dor em estímulos que pertencem a uma intensidade inócua em estado normal caracteriza o quadro de alodinia. Adaptado (LOUW; NIJS; PUENTEDURA, 2017)

A dor pode ser considerada um mecanismo de defesa porque os indivíduos podem evitar a exposição a injúrias que causam essa sensação, protegendo-se de fatores nocivos do ambiente. Em alguns casos de neuropatias hereditárias por exemplo, indivíduos que não sentem dor comumente relatam casos de automutilação, infecções despercebidas e fraturas ósseas indolores (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

A percepção da dor sensorial (nociceptiva) acontece pelo processamento dos estímulos nocivos, como pressão e temperatura elevados, por neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico (nociceptores), e sua transmissão para o sistema nervoso central através do gânglio dorsal, *dorsal root ganglion* (DRG) (DUBIN;

PATAPOUTIAN, 2010). Os nociceptores são neurônios sensoriais periféricos capazes de transmitir o estímulo nocivo da região onde ocorre a injúria até o sistema nervoso central, cuja primeira sinapse ocorre no corno posterior da medula. Os corpos celulares dos nociceptores encontram-se na raiz do gânglio dorsal (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

As fibras nervosas que compõem os nociceptores diferem-se quanto ao calibre da fibra e à presença ou não do revestimento de mielina. Essas características interferem diretamente na velocidade de propagação do sinal, sendo maior nas fibras mielinizadas e nas de maior calibre ($A\delta/A\beta$), e menor nas não mielinizadas e de menor calibre (fibras C) (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Além disso, diferentes fibras são responsáveis por processar diferentes tipos de estímulos nocivos, como mecânicos ou de extremos de temperatura (quente ou fria). O que permite essa variabilidade no processamento de sinal é o repertório molecular presente nos nociceptores, em que diferentes moléculas transdutoras são responsáveis por ativação de vias específicas a determinado estímulo (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). A nocicepção, “processo neurológico de codificar e processar estímulos nocivos” (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010) é desencadeada pelos estímulos nos nociceptores, normalmente ativada por um potencial de ação mínimo da transmissão dos sinais (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

A inflamação causada em resposta ao tecido lesionado leva a um aumento de neurotransmissores e fatores de crescimento nessa região, dentre eles o *nerve growth factor* – fator de crescimento neural (NGF) (HEFTI et al., 2006). Estudos clínicos realizados em pacientes com estados de dor crônica e aguda em diversas condições dolorosas como artrite, cistite ou dores de cabeça crônicas revelam um nível elevado

de NGF (ALOE et al., 1992; HALLIDAY et al., 1998; HEFTI et al., 2006; LOWE et al., 1997; ODDIAH et al., 1998; SARCHIELLI et al., 2001).

A administração de NGF em roedores e em humanos levou ao desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica, e à alodinia. Em humanos, encontrou-se um desconforto ao pressionar-se a área próxima à aplicação de NGF (DELLA SETA et al., 1994; DYCK et al., 1997; HEFTI et al., 2006; LEWIN; RUEFF; MENDELL, 1994). Estudos animais que dosaram a concentração de NGF em situações de dor e cuja administração de NGF causava quadros de hiperalgesia confirmaram a importância do papel desse fator neurotrófico em vias de dor, assim como sua inibição reduzindo essa sensibilização (HEFTI et al., 2006).

1.2. Elementos Moleculares da Dor (Vias de NGF e TrkA)

A descoberta do NGF se deu por estudos liderados por Rita Levi-Montalcini, prêmio Nobel de medicina em 1986. Ao observar o desenvolvimento de embriões de galinha, descobriu-se que havia promoção de crescimento neuronal a partir de uma substância difusível até então desconhecida, tratando-se assim do NGF, o primeiro fator neurotrófico descrito (LEVI-MONTALCINI; HAMBURGER, 1953). Stanley Cohen, em 1960, ao observar o mesmo efeito de desenvolvimento neuronal a partir de extrato de veneno de cobra, pôde isolar o peptídeo agora conhecido e ao utilizar-se um antissoro em mamíferos saudáveis observou inibição desse efeito fisiológico, provando a importância vital para o sistema nervoso desse fator neurotrófico (COHEN, 1960).

Estudos posteriores levaram à descoberta dos demais fatores neurotróficos descritos até hoje, que consistem de uma família de proteínas ou peptídeos: *brain-derived neurotrophic factor* – fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e

neurotrofinas 3 e 4/5 (NT-3 e NT- 4/5), que ligam-se a dois tipos de receptores, um receptor que liga-se com afinidade igual a quaisquer desses fatores - $p75^{\text{NTR}}$ - e os receptores de uma família de tirosina quinases, *tropomyosin-receptor kinases (Trk)*, - TrkA, TrkB e TrkC, sendo que cada um desses receptores possui afinidade a um fator específico (HEFTI et al., 2006). Dentre eles, o receptor que possui maior afinidade por NGF é a TrkA (HUANG; REICHARDT, 2003).

Os fatores neurotróficos são sintetizados como precursores glicosilados que passam por clivagens por convertases para obter suas formas maduras (Figura 1.2), sendo que os precursores possuem maior afinidade por $p75^{\text{NTR}}$, e os maduros pelas respectivas Trks (ROUX; BARKER, 2002; TENG et al., 2010).

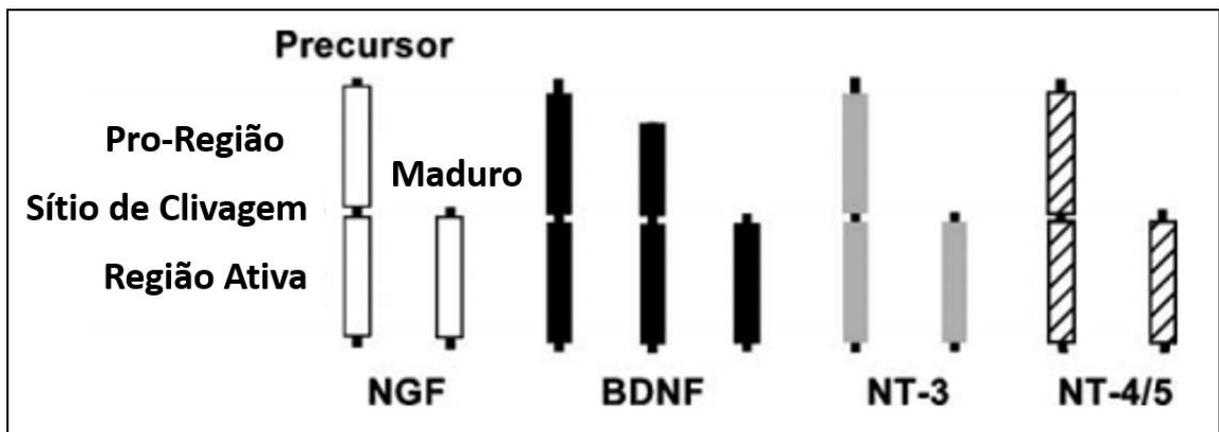


Figura 1.2. Os fatores neurotróficos são sintetizados como precursores que sofrem clivagem para obter-se a forma madura. Os fatores neurotróficos são secretados de maneira imatura, podendo interagir com o receptor $p75^{\text{NTR}}$. NGF, NT-3 e NT-4/5 são clivados em uma única forma madura, e BDNF, possuindo dois sítios de clivagem, possui uma forma madura totalmente clivada e outra parcialmente clivada. As formas processadas são as que possuem maior afinidade pelos receptores de Trk. Adaptado (ROUX; BARKER, 2002).

A continuidade dos estudos levou a um consenso de que os fatores estão relacionados à sobrevivência de neurônios em desenvolvimento no sistema nervoso e que além disso o NGF exerce também um papel importante na percepção de dor,

em vias de sinalização desencadeadas pela ativação da tirosina quinase, TrkA (HEFTI et al., 2006).

Os membros da família de *tropomyosin-receptor kinase* (Trk) foram primeiramente identificados ao investigar-se um oncogene composto por uma sequência de tirosina quinase desconhecida na época, que estava associada à uma sequência truncada de tropomiosina (MARTIN-ZANCA et al., 1989; MARTIN-ZANCA; HUGHES; BARBACID, 1986). Análises moleculares e bioquímicas iniciais puderam caracterizar as Trks como proteínas tirosina quinases, acopladas a um receptor extracelular, que possui sequências consenso de N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr), que provaram ser necessárias para a produção da forma madura da proteína, sendo apenas essa forma direcionada à membrana plasmática (MARTIN-ZANCA et al., 1989). A proteína na sua forma imatura possui uma massa aproximada de 80 kDa, e após seu processamento e glicosilação durante a tradução ou transporte no retículo endoplasmático ou para a membrana plasmática, as formas maduras atingem 110 kDa e 140 kDa (MARTIN-ZANCA et al., 1989). Essas características fornecem um padrão de bandas frequente nesse trabalho, ao efetuar a eletroforese dessa proteína. Descobriu-se também que a porção extracelular tem afinidade por fatores neurotróficos, sendo o NGF o de maior afinidade, e que os padrões de expressão estão relacionados a funções e desenvolvimento de neurônios (HUANG; REICHARDT, 2003).

Com relação a estrutura das Trks, essas quinases são constituídas de um domínio extracelular composto por uma região rica em leucina flanqueada por dois domínios ricos em cisteína, além de dois domínios semelhantes a imunoglobulina (ULTSCH et al., 1999). Esses últimos sendo necessários para a ligação dos fatores neurotróficos (PÉREZ et al., 1995). Além da porção extracelular responsável pela

interação com o agonista, estão presentes os domínios transmembranar e intracelular, que por sua vez contém o domínio tirosina quinase. Em comparação entre os membros (TrkA, B e C), os domínios catalíticos de tirosina quinase apresentam 75% de identidade, e os domínios extracelulares 50% de homologia (IVANISEVIC; SARAGOVI, 2013). Na Figura 1.3 encontra-se esquematizado as porções descritas da TrkA.

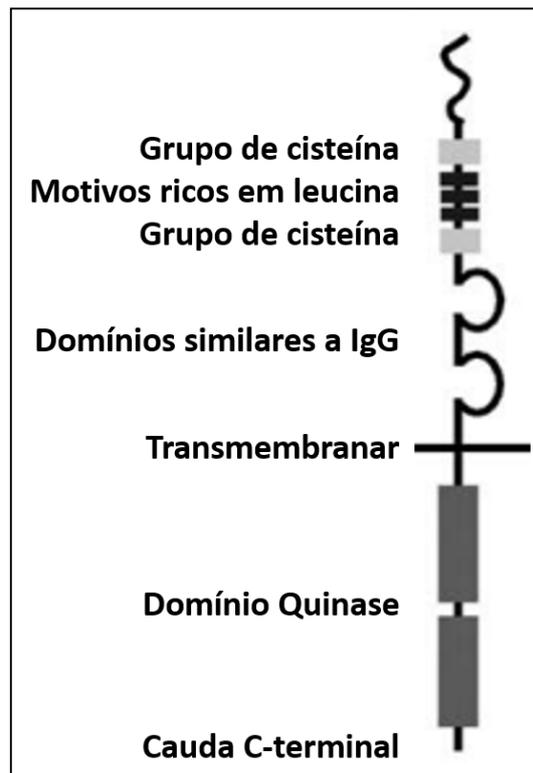


Figura 1.3. Esquematização da TrkA. A porção extracelular, que é composta pelo receptor de alta afinidade do NGF, possui dois grupos de cisteína que flanqueiam um motivo rico de leucina, e domínios semelhantes a IgG. Essas características auxiliam na interação com o ligante. Na parte intracelular está presente o domínio quinase, que se estende até o final da região carboxiterminal. Adaptado (ROUX; BARKER, 2002).

A expressão de TrkA é restrita a neurônios do sistema nervoso central, sensoriais da pele e simpáticos presentes no sistema gastrointestinal, renal etc (Figura 1.4) (LOMEN-HOERTH; SHOOTER, 1995; SHIBAYAMA; KOIZUMI, 1996).

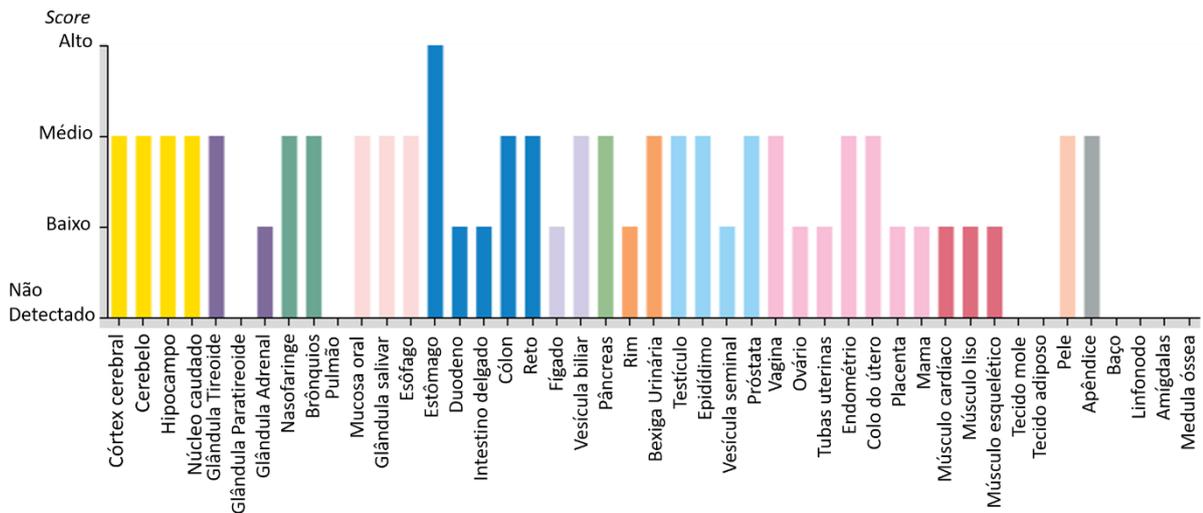


Figura 1.4. Expressão da proteína TrkA em diversos tecidos. Resultados obtidos do banco de dados “*The Human Protein Atlas*”, baseado na análise de 44 tecidos através de imuno-histoquímica. Barras com cores em comum representam órgãos que compõem um sistema específico do corpo. Adaptado (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, [s.d.]).

A presença do receptor nos variados sistemas pode indicar que haja um papel ainda desconhecido dos fatores neurotróficos em demais fenômenos fisiológicos além dos amplamente descritos no sistema nervoso. Recentemente foi sugerida a correlação da alta incidência de TrkA e NGF na mucosa gástrica de pacientes com dispepsia com a percepção dos sintomas dolorosos (SHI et al., 2019). Também foi descrita a importância crítica de TrkA e NGF na angiogênese de células endoteliais da mucosa gástrica, onde foi reportada alta expressão dessas proteínas (AHLUWALIA et al., 2016).

Além de possuírem receptores de alta afinidade para cada fator neurotrófico específico, todos eles possuem afinidade pelo receptor $p75^{NTR}$, que tem um papel regulatório do destino celular dependendo da neurotrofina associada a ele (ROUX; BARKER, 2002). $P75^{NTR}$ pode ser ativado pelos fatores neurotróficos na ausência ou em pequena quantidade de Trks, ou pelas neurotrofinas imaturas que possuem uma

maior afinidade por esse receptor do que as neurotrofinas maduras (processadas). A ativação do p75^{NTR} por vezes tem atividades contrárias à ativação da Trk. Por exemplo p75^{NTR} associado ao NGF imaturo ativa a via de apoptose, enquanto a ativação da TrkA bloqueia esse efeito (Figura 1.5).

Nos sistemas em que os dois tipos de receptores, p75^{NTR} e TrkA, são expressos, predomina-se as vias desencadeadas pelo receptor de alta afinidade (TrkA), inibindo-se apoptose (desencadeado por p75^{NTR}), e promovendo-se sobrevivência neural, dada a maior afinidade da TrkA pelo NGF (maduro) comparada à afinidade da p75^{NTR} (Figura 1.5) (KUMAR; MAHAL, 2012).

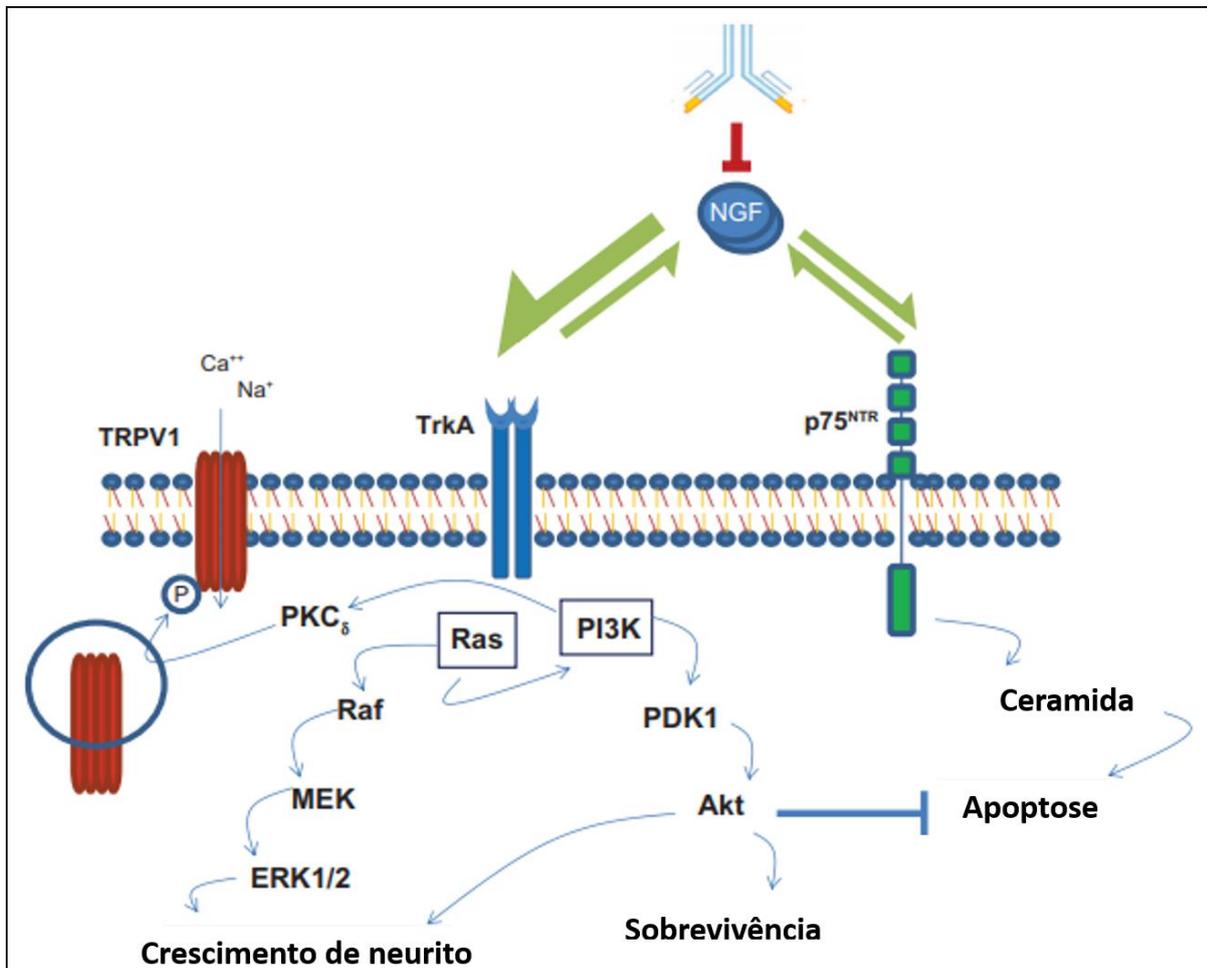


Figura 1.5. NGF liga-se com maior afinidade a TrkA, inibindo-se a via de apoptose desencadeada por p75^{NTR} através da ativação da via de PI3K. A ativação das vias de PI3K e Ras também estão relacionadas ao desenvolvimento e sobrevivência de células neurais. Nessa imagem pode-se antecipar a importância também da ativação de TRPV1, relacionada à nocicepção, que será abordada neste texto. Nota-se também a inibição de NGF mediada por anticorpos, inibindo-se assim a via de dor sensibilizada por esses mecanismos. Adaptado (KUMAR; MAHAL, 2012).

Analisando-se as vias desencadeadas para a sensibilização da dor através do sistema NGF - TrkA, pode-se perceber a relação próxima da via de sobrevivência neural por inibição da apoptose e dos processos que levam a sensibilização da dor em nociceptores, causada por TRPV1 (que será discutido adiante) (Figura 1.5) (KUMAR; MAHAL, 2012).

Após um estímulo nocivo e uma reação inflamatória ocorre a liberação do NGF por células inflamatórias (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003). A interação do NGF com a TrkA leva a uma dimerização da quinase que se auto fosforila na região do *loop* de ativação (Y674/675). Tal fosforilação é essencial para a atividade de tirosina quinase da TrkA, que fosforila vários desses resíduos, dentre eles Y490, Y751 e Y785, criando sítios de ancoragem para as demais proteínas sinalizadoras ativadas pela TrkA (Figura 1.6) (FRIEDMAN; GREENE, 1999).

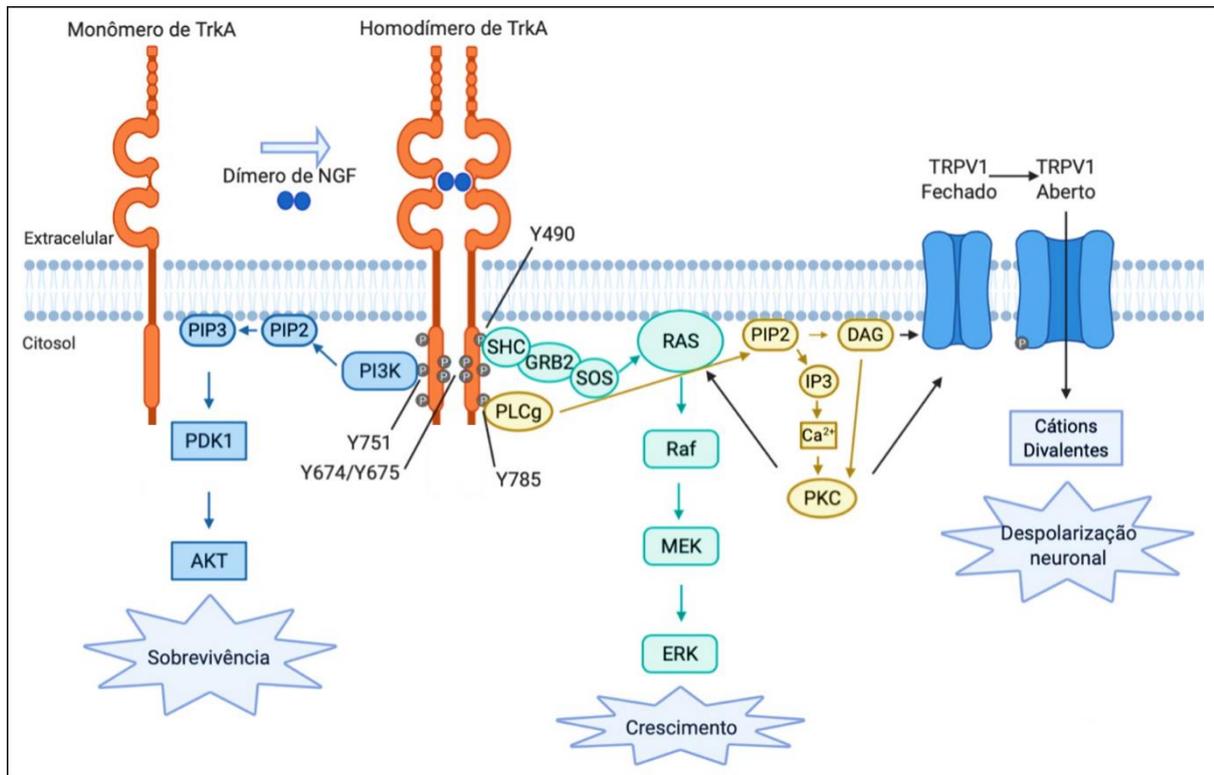


Figura 1.6. As vias de sinalização desencadeadas pela ativação da TrkA pelo NGF e os destinos celulares nos nociceptores. Representação da dimerização da TrkA após ligação do dímero maduro de NGF e ancoragem de proteínas adaptadoras nos sítios de tirosina fosforilados. Foi representado por uma cor em comum as espécies relacionadas a uma mesma via: em bege, a ativação da via PLCγ/PKC; em verde, MAPK e em azul, PI3K/AKT. Nota-se a combinação que pode ocorrer das vias de PLCγ e MAPK, pela ativação de Ras por PKC. Além disso, a ativação de TRPV1 por PKC e mudança lipídica da membrana pela atividade lipase da PLCγ.

As principais vias ativadas a partir da ativação da TrkA, no contexto de dor nociceptiva causada pela presença de NGF em tecido inflamado (hiperalgesia), são descritas a seguir.

As fosforilações mencionadas deflagram a ativação de proteínas a jusante através da criação de domínios de ancoragem de substratos e proteínas adaptadoras, como fosfolipase Cγ (PLC-γ), p85 (domínio regulatório da fosfatidilinositol 3-quinase - PI3K) e Shc (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003; OBERMEIER et al., 1993). PLCγ

é ativada após fosforilação ao ligar-se a TrkA fosforilada em Y785, e sua ativação permite a clivagem de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que levam a ativação de proteínas quinases C (PKCs) (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003; OBERMEIER et al., 1993; VETTER et al., 1991). A subunidade regulatória (p85) de PI3K liga-se a uma tirosina fosforilada da TrkA (Y751) ativando-se PDK1 e Akt (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003; OBERMEIER et al., 1993; RAFFIONI; BRADSHAW, 1992). SHC é uma proteína adaptadora que liga-se à TrkA fosforilada na posição Y490 e cuja ligação ativa a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos - *mitogen activated protein kinases* (MAPK), à medida que liga-se a *growth factor receptor - bound protein 2* (Grb2) e a *son of sevenless* (SOS), um fator de troca de difosfato de guanidina (GDP) por trifosfato de guanidina (GTP) da proteína GTPásica Ras. Ras ativada liga-se a RAF quinase que permite a ativação de ERK pela ativação de MEK (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003; DIKIC et al., 1995; OBERMEIER et al., 1993).

Uma das vias desencadeadas pela ativação da TrkA pelo NGF envolvidas no processo de dor é a via que ativa o *Transient receptor potential vanilloid receptor 1* (TRPV1), inicialmente denominado receptor vaniloide 1 (VR1), ou receptor de capsaicina. O TRPV1 além de ser ativado pela capsaicina e baixo pH (presença de prótons), funciona como um mediador de nocicepção térmica, sendo ativado em temperaturas próximas ao que seres humanos relatam como doloroso (acima de 43°C) (CHUNG; JUNG; OH, 2011). Estudos com ratos que possuíam nocaute de TRPV1 e não manifestaram resposta nociceptiva corroboraram a importância da sensibilização térmica desse canal mesmo em contexto de hiperalgesia causada por aplicação de *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) e carragenina (típicos desencadeadores inflamatórios) (CATERINA et al., 2000; CHUNG; JUNG; OH, 2011;

DAVIS et al., 2000; LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007). Seu papel molecular consiste na admissão do influxo de cátions mono e bivalentes, causando a despolarização da membrana, que leva a geração de potenciais de ação, ativando-se assim os nociceptores (HEFTI et al., 2006).

O papel do TRPV1 como a última espécie a jusante na via é fundamental para obter-se a resposta fisiológica da nocicepção, porém ainda não está claro qual das vias a montante atuam com maior influência nesse canal, sendo que ele possui potenciais sítios de fosforilação por diferentes serina/treonina quinases como PKC, proteína quinase A (PKA) e proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMK II) (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003). Estudos sugeriram que o TRPV1 possui uma condição inibitória quando associada ao PIP2 na membrana, e que a ativação da via da PLC γ e consequente clivagem desse fosfolípido ativaria o canal (CHUANG et al., 2001). Posteriormente observou-se que TRPV1 pode ser fosforilado por PKA, PKC, PKD, Cdk5, PI3K e MAPK, e que as fosforilações auxiliam na ativação do canal por aumentar sua afinidade por capsaicina e diminuir o limiar de temperatura de ativação (AMADESI et al., 2006, 2009; CHUNG; JUNG; OH, 2011; PAREEK et al., 2007; ZHU; OXFORD, 2007; ZHUANG et al., 2004). É importante destacar a regulação de TRPV1 também por NGF, em que pela ativação da via de TrkA leva ao aumento da síntese de TRPV1, mas não de seu mRNA (JI et al., 2002).

Existem diversos mecanismos que levam ao desenvolvimento da dor via TrkA que ainda não são compreendidos. Como citado no início do trabalho, existe uma síndrome genética denominada *Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis* (CIPA) em que indivíduos acometidos não manifestam dor. Essa condição está associada à presença de diversas mutações no gene NTRK1 (INDO, 2001). Além disso, recentemente um outro organismo, o *Naked Mole Rat* (Rato topeira pelado), também

demonstrou insensibilidade à dor. Estudos demonstraram que assim como ocorre em pacientes com CIPA, esse organismo possui mutações no mesmo gene (OMERBASIC et al., 2016), que será discutido com mais detalhe a seguir.

1.3. Naked Mole Rat

Heterocephalus glaber, rato toupeira pelado (do inglês *Naked mole rat* - NMR) é um roedor africano que possui características fisiológicas muito interessantes (Figura 1.7), como longevidade e resistência a câncer. É um organismo endêmico da região do chifre da África muito utilizado em estudos de envelhecimento por ser o roedor de vida mais longa e maior tempo de vida útil, de pelo menos 35 anos (BUFFENSTEIN, 2005, 2008; LEWIS et al., 2016; LEWIS; RUBINSTEIN; BUFFENSTEIN, 2018).

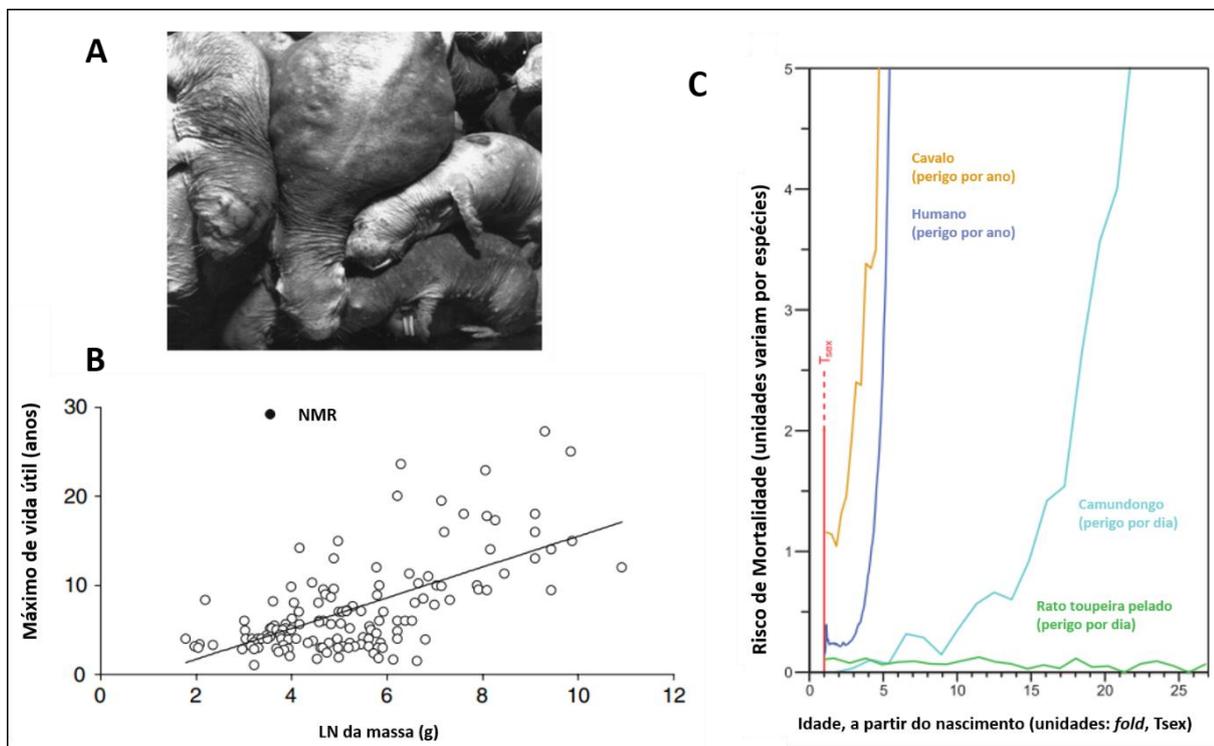


Figura 1.7. NMR possui características intrigantes acerca de longevidade. (A) Uma fêmea procriadora grávida na sua terceira década de vida (LEWIS et al., 2013). (B) Em destaque NMR encontra-se mais de dois desvios padrões na correlação massa/máximo de vida útil dentre roedores; adaptado (BUFFENSTEIN, 2008). (C) Curvas de perigo de quatro organismos relacionando o risco de mortalidade com a idade relativa ao tempo que cada espécie atinge a idade sexual; adaptado (RUBY; SMITH; BUFFENSTEIN, 2018).

Dentre os mamíferos, apenas NMR e o rato toupeira Damaraland (que também demonstra significativa longevidade) são considerados eussociais (característica muito comum em insetos), procriando apenas uma fêmea e organizando a colônia baseando-se em hierarquias (LEWIS et al., 2016).

Com relação a ocorrência de neoplasias, chama a atenção a escassez de documentação de ocorrência desse fenômeno nessa espécie, sendo registrado uma única ocorrência em uma fêmea de 21 anos em 2000 necrópsias realizadas (LEWIS et al., 2016). Eles possuem grande resistência a manifestar a doença espontaneamente e suas células são resistentes a tumorigênese induzida em comparação com células de camundongos (LIANG et al., 2010; SELUANOV et al., 2009). No entanto a característica pertinente a se tratar nesse trabalho é sua insensibilidade à dor, recentemente relacionada também à hipofuncionalidade de sua TrkA (OMERBAŠIĆ et al., 2016).

Estudos iniciais demonstraram a insensibilidade comportamental do NMR a alógenos químicos, como ácido e capsaicina, depois de indução de inflamação despertando-se um interesse em estudar os canais iônicos atuantes no processo de hiperalgesia térmica ou mecânica – *Acid sensing ion channel* (ASIC) e TRPV1 (PARK et al., 2008; SCHUHMACHER; SMITH, 2016). Foi demonstrado que ocorre a expressão de TRPV1 nos seus nociceptores, e que eles são sensíveis a capsaicina, porém a falta de demonstração de dor levou a análise de outra espécie bioquímica presente nessa via (OMERBAŠIĆ et al., 2016; PARK et al., 2008). Além disso, demais roedores relacionados ao NMR com o mesmo fenótipo de insensibilidade apresentaram variações em proteínas chave na sinalização da nocicepção como *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* (TRPA1) que possui baixa sensibilidade pelo

respectivo agonista algógeno isotiocianato de alila (AITC), e mudança na expressão de *Sodium Leak Channel Non Selective* (NALCN) (EIGENBROD et al., 2019).

Estudos de Omerbasic e colaboradores (2016) sugeriram que a ineficiência na sensibilização de TRPV1 e consequente ausência de dor no NMR deve-se a uma perda de função de TrkA, devido a mutações pontuais presentes no domínio quinase desse animal em resíduos de aminoácidos muito conservados em demais espécies. Essas mutações podem comprometer a função quinase ou interação com substratos de TrkA, tornando-se muito menos eficiente a transdução do sinal iniciada pela ligação do NGF e não ocorrendo a ativação das proteínas e vias intermediárias citadas anteriormente, cruciais para a ativação de TRPV1 e a percepção da dor (Figura 1.8). Entretanto, os mecanismos específicos hipofuncionais da TrkA do NMR bem como as vias que estão mais afetadas pelas mutações na quinase desse organismo ainda não são compreendidos.

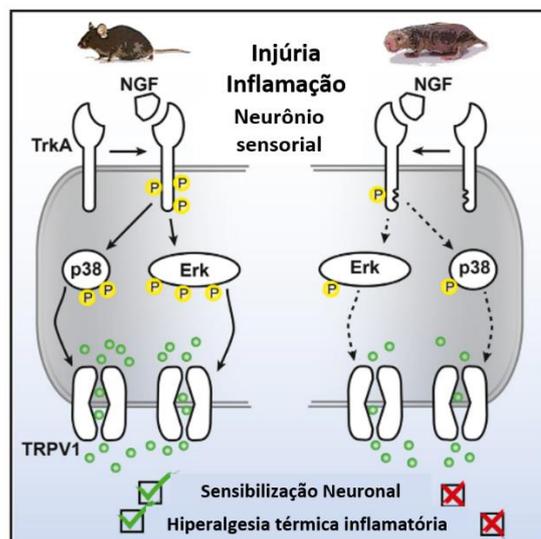


Figura 1.8. Esquema dos estudos de Omerbasic e colaboradores quanto as mudanças nas vias de sinalização da TrkA de NMR. Adaptado (OMERBASIC et al., 2016).

1.4. Crise de Opioides

A crise de opioides tem se tornado grande motivo de preocupação, principalmente nos Estados Unidos, onde o uso indiscriminado tem levado a grande ocorrência de overdose e tolerância (DEWEERDT, 2019). Existem evidências que indivíduos tratados com opioides para dores crônicas não relacionadas a câncer sofrem um risco maior de overdose em doses aumentadas dessas drogas (DUNN et al., 2010).

Hoje considerada uma epidemia, começou na década de 1980 quando o conceito de dor passou a ser considerado um problema a requerer tratamento correto e estados norte americanos começaram a aprovar leis que facilitam o acesso a drogas para dores consideradas intratáveis para evitar processo aos médicos (DEWEERDT, 2019). O problema tomou proporções notáveis quando os usuários conseguiam acumular prescrições e vender o excesso de remédios, iniciando-se uma cadeia de fornecimento. Isso levou ao endurecimento das leis sobre os medicamentos prescritos, dificultando seu acesso, e levando a procura por opioides ilícitos, como a heroína, que no período de 2010 a 2016 aumentou em cinco vezes o número de mortes por overdose (Figura 1.9) (DEWEERDT, 2019). A partir de então, essas estatísticas somam-se ao uso de opioides lícitos e ilícitos, mesmo entre pacientes ou usuários recreativos.

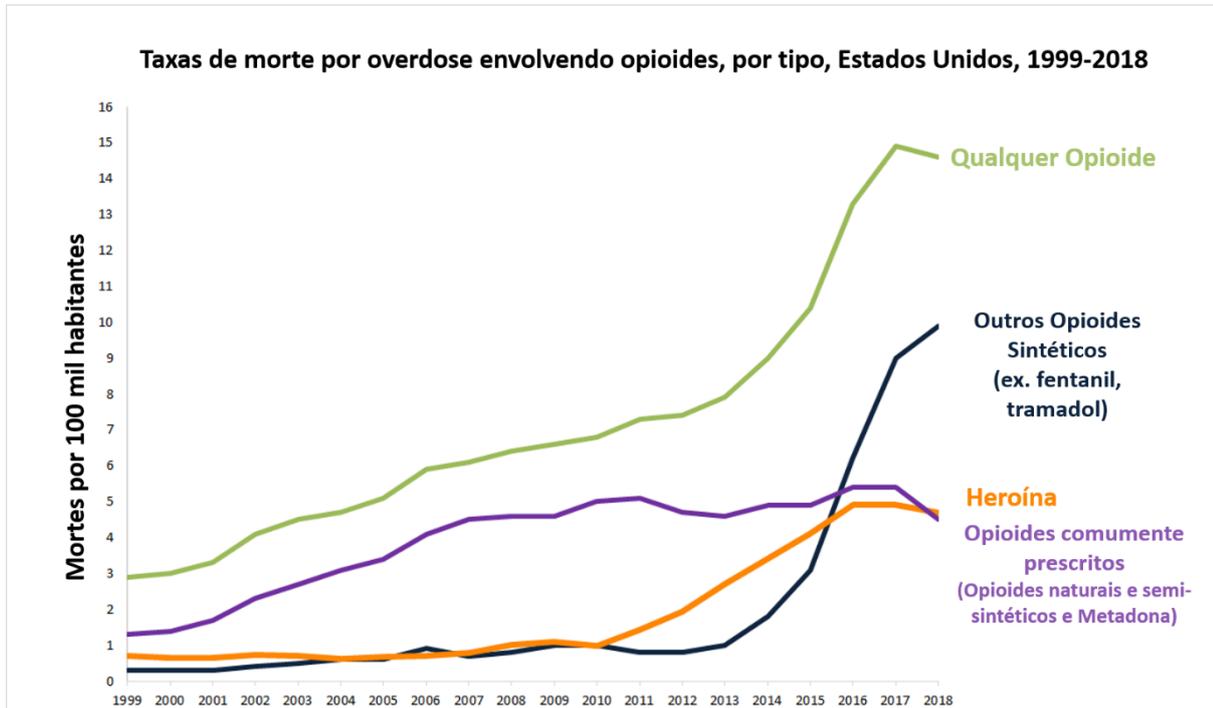


Figura 1.9. Mortes por overdose de opioides nos Estados Unidos. A soma de mortes por overdose de quaisquer opioides cresceu cinco vezes nas duas últimas décadas, sendo que num período entre 2013 e 2018 vale destacar o aumento em dez vezes de opioides sintéticos muito utilizados na prática médica (ex. fentanil e tramadol). Adaptado (CDC, 2018).

Ao considerar-se a TrkA como um novo alvo terapêutico para tratamento da dor, pode-se considerar uma nova alternativa ao uso de opioides. Além disso, espera-se ter um maior controle da especificidade de uma nova droga, que garanta um melhor resultado terapêutico com número reduzido de efeitos adversos.

Este estudo pretende, ao investigar-se os parâmetros relacionados a essa via (estudo das vias de transdução de sinais desencadeadas pela TrkA em nociceptores), dispor de fontes de informação que servirão de ferramenta para o desenvolvimento de uma nova classe de drogas anti-inflamatórias. É importante elucidar o comportamento de cada elemento chave na via da dor mediada pelo sistema NGF/TrkA para desenvolvimento de novas drogas, como novas alternativas ao uso de

anti-inflamatórios não esteroides (NSAID) e opioides, para tanto utilizaremos o modelo do NMR que tem uma TrkA hipofuncional.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar quais mutações presentes no domínio quinase da TrkA de NMR contribui para sua hipofuncionalidade.

2.2. Objetivos específicos

Construir TrkAs mutantes de rato que possuam resíduos presentes em NMR (L775C e K728Q) e de NMR mutantes que possuam os resíduos correspondentes em rato (C774L e Q727K);

Avaliar a auto-ativação da TrkA por fosforilação de tirosinas-chave em seu domínio quinase;

Avaliar a ativação de substratos, principalmente PLC γ através de fosforilação dessa proteína ou translocação membranar de proteínas a jusante (PKC).

3. Material e Métodos

3.1. Cultura de células

As células utilizadas no projeto são as *Human embryonic kidney* (HEK) – células de rim embrionário. Essa célula foi escolhida por sua facilidade na manutenção e transfecção. As células, salvo experimentos específicos, são mantidas em cultura utilizando-se o meio DMEM (DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco® by Life Technologies™), NaHCO₃ 3,7 g/L, piruvato de sódio 1 mM, penicilina 100 U/mL, streptomycina 100 µg/mL, suplementadas com 10% de soro fetal bovino. As células são mantidas em estufa de atmosfera úmida, a 37°C e 5% CO₂. Para manutenção das células, elas são mantidas em garrafas médias ou placas P100, sendo repicadas a cada confluência de 90% utilizando-se 1X PBS para remoção de soro e tripsina 0,05%. Após 2 minutos de incubação na estufa com tripsina, adiciona-se meio de cultura completo para homogeneizar as células agora em suspensão e para obtenção da diluição desejada de células.

3.2. Expansão e manutenção de plasmídeos

Os plasmídeos utilizados são mantidos a -20°C, utilizando-se bactérias *E. coli* DH5α para expansão. Essa cepa de bactéria termocompetente é utilizada para ser transformada com o plasmídeo através de choque térmico (0°C 30 minutos; 42°C, 30 segundos; 0°C 5 minutos) e posterior recuperação com meio LB (Luria Bertani – triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L pH 7,0) por 1h 37°C. Após plaqueamento e crescimento *overnight* em meio sólido (LB com agar 15 g/L) contendo antibiótico de seleção, uma colônia isolada é escolhida para crescimento em meio líquido *overnight* para posterior extração de DNA utilizando-se *kit miniprep* ou *midiprep*

(QIAprep Spin Miniprep Kit – Qiagen e ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit – Zymo Research, respectivamente). Além dos estoques de DNA em -20°C, as bactérias transformadas são estocadas em -80°C em uma solução 25% de glicerol.

3.3. Mutagênese sítio-dirigida

Utilizou-se como molde os DNAs referentes à TrkA de rato e quimérica (porção extracelular de rato e transmembranar e quinase de NMR) (Figura 3. 1) (OMERBAŠIĆ et al., 2016), cordialmente cedidos pelo professor Gary Lewin (*Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlim, Alemanha*).

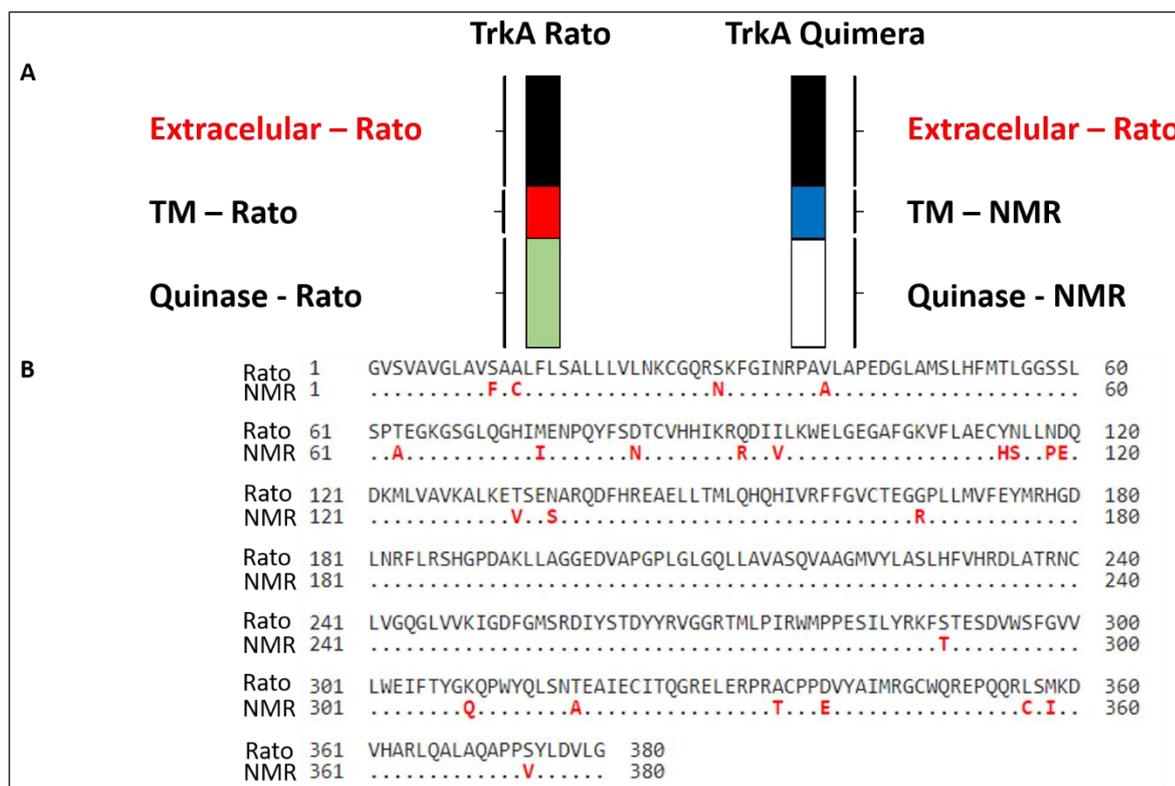


Figura 3.1. Esquema das construções que expressão TrkA de rato e quimérica. (A). Representação esquemática da TrkA de ambos os casos. (B) Alinhamento da porção transmembranar e intracelular de rato e NMR, os pontos representando identidade e os resíduos em vermelho o que é exclusivo de NMR. Dentre as construções, apenas o que está representado em (B) é diferente nas duas construções.

Utilizou-se os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3.1, utilizou-se 60 ng de DNA, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*), 0,2 mM dNTP e Q5 *high fidelity DNA polymerase* (New England Biolabs) 20 U/mL em um volume de 50 μ L. Seguiu-se o protocolo de PCR (*polymerase chain reaction*) 98°C 30 segundos; 98°C 10 segundos, 72°C 30 segundos e 70°C 8 minutos por 30 ciclos; 72°C 8 minutos por amostra. Após término da PCR, tratou-se por 2h 37°C com a enzima de restrição DpnI, 200 U/mL as amostras que passaram pelo termociclador, em seguida utilizou-se essa mistura para transformação das bactérias. As colônias obtidas foram submetidas a protocolo de sequenciamento para confirmação da mutagênese, em que os oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento estão na Tabela 3.2. As amostras e os oligonucleotídeos são enviados para sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências da USP.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
Rato L775C F	CCGCAACAGCGCTGCAGCATGAAGGATGTG
Rato L775C R	CACATCCTTCATGCTGCAGCGCTGTTGCGG
Quimera Q727K F	TCTTCACCTACGGCAAGCAGCCCTGGTAC
Quimera Q727K R	GTACCAGGGCTGCTTGCCGTAGGTGAAGA

Tabela 3.1. Oligonucleotídeos desenhados para realização de PCR para mutagênese sítio dirigida.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
Rato 1F	AACCTGACGGAGCTC
Rato 1R	CAGTCAGCCTGCTGTAG
Rato 2F	CAGTGCCAGGTGGAG
Rato 2R	CAGGGTTGAACTCAAAAG
Rato 3F	CATGGCTGCCTTTATG
Rato 3R	CATGGCGCATGTACTC
Rato 4F	GAGTCTGCACGGAGG
Rato 4R	CGTGATGCACTCGATC
Rato 4,5F	GGTCAAGATTGGAGAC
Rato 5F	GCAACCCTGGTACCAG
Quimera 1R	GGCAAAGACAGCCAG
Quimera 2F	CTGCTCCTCGTGCTTAAC
Quimera 2R	GGAGGAAGCGATTGAG
Quimera 3F	GCTGCTGATGGTCTTTG
Quimera 3R	GTGCACGTCCTTGATG
Quimera 4F	CGAGTGCATCACACAG

Tabela 3.2. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para PCR de sequenciamento. Esses oligonucleotídeos foram utilizados para conferência de sucesso da mutagênese sítio dirigida e garantia da sequência dos genes trabalhados. Foram desenhados utilizando-se a sequência depositada de genes NTRK1 de *Rattus norvegicus* e *Heterocephallus glaber*, NM021589.1 e XM004871248.2, respectivamente.

As demais construções mutantes (Quimera C774L e Rato K728Q) foram encomendadas pela *facility Epoch Life Science Inc* (Estados Unidos).

3.4. Transfecção de células eucarióticas

Transfecção das células HEK foi realizada de acordo com o objetivo do projeto. Para superexpressão ou transfecção transiente seguiu-se o protocolo de transfecção com PEI (polietilenoimina), e para geração de linhagens a *Lipofectamine® 3000 Reagent – Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific*.

3.4.1. Para superexpressão ou transfecção transiente

As células foram plaqueadas em P100 até atingirem confluência de 90%. Por placa P100 foi utilizado 4 µg de DNA de interesse e 3,2 µg/mL de PEI, que são misturados em OptiMEM™ (*Gibco by Life Technologies™*), incubados por 15 minutos e adicionados às células em OptiMEM, previamente lavadas com 1X PBS para remoção de soro. Após seis horas de incubação na estufa de cultura de células o meio foi trocado para meio completo DMEM, já descrito. As células ficam prontas para utilização em ensaios com pico de superexpressão após 48 horas.

3.4.2. Para geração de linhagens

As linhagens foram geradas utilizando-se Lipofectamina, em que são utilizados 2,5 µg de DNA, seguindo-se o protocolo do fabricante do kit *Lipofectamine® 3000 Reagent – Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific*. As células são transfectadas em meio sem soro, preferencialmente OptiMEM, e após 6 horas o meio é trocado para meio DMEM completo. Após 24 horas de transfecção é necessário iniciar o processo de seleção das células transfectadas. Os plasmídeo utilizado para transfecção de todas as construções possuem o mesmo *backbone* - pEXPR-IBA105 (OMERBAŠIĆ et al., 2016), que possui gene de resistência para neomicina. Foi feito no laboratório uma curva de morte das células HEK para determinar-se a concentração mínima

necessária para morte dessas e obteve-se para Geneticina (Thermo) a concentração de 750 µg/mL. Desse modo, após o período de 24 horas de transfecção adiciona-se essa concentração de G418 nas células. Essa concentração deve ser mantida o mais próximo possível de um valor constante, sendo necessária a troca de meio com nova diluição de antibiótico diariamente. As células que não expressam o DNA exógeno morrem e após um período de confluência das células resistentes pode-se concluir o procedimento, armazenando as linhagens em -80°C ou em nitrogênio líquido.

3.5. Extração de proteínas e *Western blotting*

Um dos ensaios utilizados para medir a ativação da TrkA foi realizar o tratamento das células transfectadas com o DNA de interesse (TrkA de rato, quimérica ou mutantes) com NGF (*Recombinant Human β NGF - PeproTech®*) (70 ou 100 ng/mL, 5 e/ou 10 minutos). Após a ativação das células, com a presença de uma amostra controle negativo que não foi ativada com NGF, procedeu-se para o protocolo de lise celular para obtenção de proteínas. Preparou-se com 1X Inibidor de protease (*Sigmafast Protease Inhibitor Cocktail – Sigma Aldrich*) e 1X Inibidor de fosfatase (*PhosStop™ - Roche*) um tampão de lise utilizando-se RIPA (50 mM Tris pH 7,4, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, deoxicolato de sódio 0,5%, EDTA 1 mM, IGEPAL 1%), Após a ativação das placas lavou-se com 1X PBS gelado e adicionou-se às placas P100 200 µL de tampão de lise, seguindo-se de uma remoção mecânica das células aderidas. Após, realizou-se 30 pulsos de 1 segundo em sonicador nas amostras e centrifugou-se por 15 min 14000 rpm 4°C. O sobrenadante foi recuperado e realizou-se o protocolo de ensaio de Bradford, fazendo-se como curva padrão concentrações variadas de BSA (albumina sérica bovina). Após quantificação preparou-se as amostras para SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polacrylamide gel electrophoresis - eletroferese*

em gel de poliacrilamida com SDS), utilizando-se 10% de β -mercaptoetanol, 1X tampão de amostra (Tris 240 mM, pH 6,8, glicerol 40%, SDS 80 g/L, azul de bromofenol 400 mg/L) e 70 μ g de proteínas totais.

3.6. Imuno-ensaio *in-cell*

O imuno-ensaio *in-cell*, que será referido como *In-cell*, possui um protocolo de tratamento das células é semelhante ao de *Western blot*, sendo que as linhagens celulares são plaqueadas em placas multiposos de P96, e deixadas em meio DMEM sem soro *overnight*. No dia da ativação as células são tratadas ou não com NGF e fixadas com PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS 1X, as células são deixadas em PBS/Triton X-100 (1X/0,1%) para permeabilização por 20 minutos e em seguida são deixadas em solução de bloqueio PBS 1X 1%BSA por 2 horas em temperatura ambiente. Antes de adicionar os anticorpos é realizada uma lavagem com PBS/Triton X-100 (1X/0,1%). Os anticorpos primários são diluídos na mesma solução utilizada para bloqueio e sua incubação é feita *overnight* em 4°C. Os anticorpos secundários são diluídos na mesma solução de bloqueio e, após lavagem com mesmo tampão descrito anteriormente, é deixada para incubação por 2h temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Os anticorpos secundários utilizados tanto para *western blot* quanto para *in-cell* são IRDye® 800CW Donkey Anti Rabbit (anti coelho produzido em burro) e IRDye® 680RD Donkey Anti Mouse (anti camundongo produzido em burro), ambos produtos Li-Cor®. A membrana é finalmente revelada utilizando-se o Li-Cor® Odyssey nos canais 700 e 800 para obtenção dos sinais de ambos os anticorpos secundários e a imagem é quantificada utilizando-se o *software Image Studio*.

3.7. Ensaio de imunofluorescência

Células de interesse foram cultivadas em placas multipoços em que lamínulas estéreis foram adicionadas para posteriores tratamentos. As células HEK293 (expressando linhagens de interesse) foram plaqueadas em mesmo número até atingirem confluência de 90%. O protocolo inicia-se com fixação das células, previamente lavadas com PBS gelado, com PFA 1X (paraformaldeído) por 10 minutos. Em seguida, após 2 lavagens com PBS/Glicina (1X/0,1M) por 5 minutos e 2 lavagens com PBS 1X por 5 minutos, as células são permeabilizadas com PBS/Triton 0,2% por 10 minutos. Em seguida, prepara-se uma solução de bloqueio PBS 1X, 5% BSA, e deixa-se incubar por 1h temperatura ambiente. O anticorpo primário é preparado à concentração 1:500 em solução PBS 1X, 1% BSA e adicionado às células para incubação *overnight* em 4°C. No dia seguinte o anticorpo secundário, preparado em mesma solução utilizada para diluição do anticorpo primário, é adicionado às células para incubação de 45 minutos a temperatura ambiente. Essa etapa sucede 3 lavagens de 5 minutos com PBS e precede 5 lavagens antes da incubação com 4', 6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, 0,5 µg/mL), por 10 minutos. Após 3 lavagens com PBS por 5 minutos, retira-se as lamínulas do fundo dos poços e coloca-se a face contendo as células aderidas em contato com uma lâmina para microscópio, utilizando-se *Prolong Diamond* como um anti-desbotamento. As lâminas foram visualizadas no microscópio de fluorescência (DMi8 Leica) do laboratório do Professor Alexandre Bruni (Instituto de Química, USP, São Paulo) utilizando-se os canais DAPI e *Rhodamine* (555) e as imagens foram montadas utilizando-se o *software* LASX (Leica).

3.8. Microscopias de Fluorescência

Foram utilizados dois métodos de microscopia para obtenção de imagens em tempo real de ativação de vias a jusante da TrkA. Um deles foi o microscópio de fluorescência e contraste de fase invertido *Nikon Eclipse TE300* (laboratório Prof. Bettina Malnic, IQ USP), e o outro de fluorescência por reflexão total interna (TIRF) - *Axio Observer.Z1* (Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa, Instituto de Ciências Biomédicas, USP – São Paulo). Linhagens que expressam as construções desejadas são plaqueadas em placas multipoços com fundo de vidro para o microscópio de fluorescência e contraste de fase, ou com fundo de lamínula (*CELLview™ Greiner Bio-One*) de 35mm de diâmetro para o microscópio TIRF. As células HEK293 que expressam as construções de TrkA (linhagens estáveis) são transfectadas seguindo-se o protocolo de transfecção transiente com DNA de PKC β -GFP. Após 48h (período de superexpressão), as células, que foram carenciadas de soro *overnight*, são ativadas com NGF (ou éster de forbol – PMA - como controle) para observação de translocação de PKC β para a membrana.

3.9. Modelagens

Os ensaios de modelagem foram feitos em colaboração com o Dr Helder Veras Ribeiro Filho (LNBio/CNPEM). A estrutura da TrkA ativa do NMR foi obtida por modelagem por homologia utilizando o *software* YASARA (KRIEGER; VRIEND, 2014). Para a modelagem, a estrutura do domínio quinase do receptor FGF-2 (PDB ID: 5EG3) foi utilizada como *molde*, uma vez que não existe estrutura disponível da TrkA ativa.

Para determinar o impacto das diferenças de resíduos da TrkA de NMR em relação a humana, estimamos a alteração da energia livre de ligação ($\Delta\Delta G$) com a troca dos resíduos usando o *software* FoldX 5 (DELGADO et al., 2019). O FoldX 5 foi usado como um *plugin* do *software* YASARA e utiliza um potencial empírico que

combina múltiplos termos energéticos baseados em conceitos físicos. De forma prévia aos cálculos de energia, as estruturas passaram por uma otimização dos rotâmeros das cadeias laterais de seus resíduos usando a função *RepairPDB* do FoldX.

4. Resultados

4.1. A TrkA de NMR possui mutações no domínio quinase em resíduos conservados em mamíferos

Como descrito na introdução, o domínio quinase da TrkA é muito conservada em mamíferos. No estudo em que constatou-se a baixa sensibilização de dor no NMR foi construído um alinhamento do domínio quinase com outros 26 mamíferos, constatando-se alguns resíduos de aminoácido exclusivos no NMR (Figura 4.1A) (OMERBAŠIĆ et al., 2016). Os resíduos mutantes foram localizados estruturalmente.

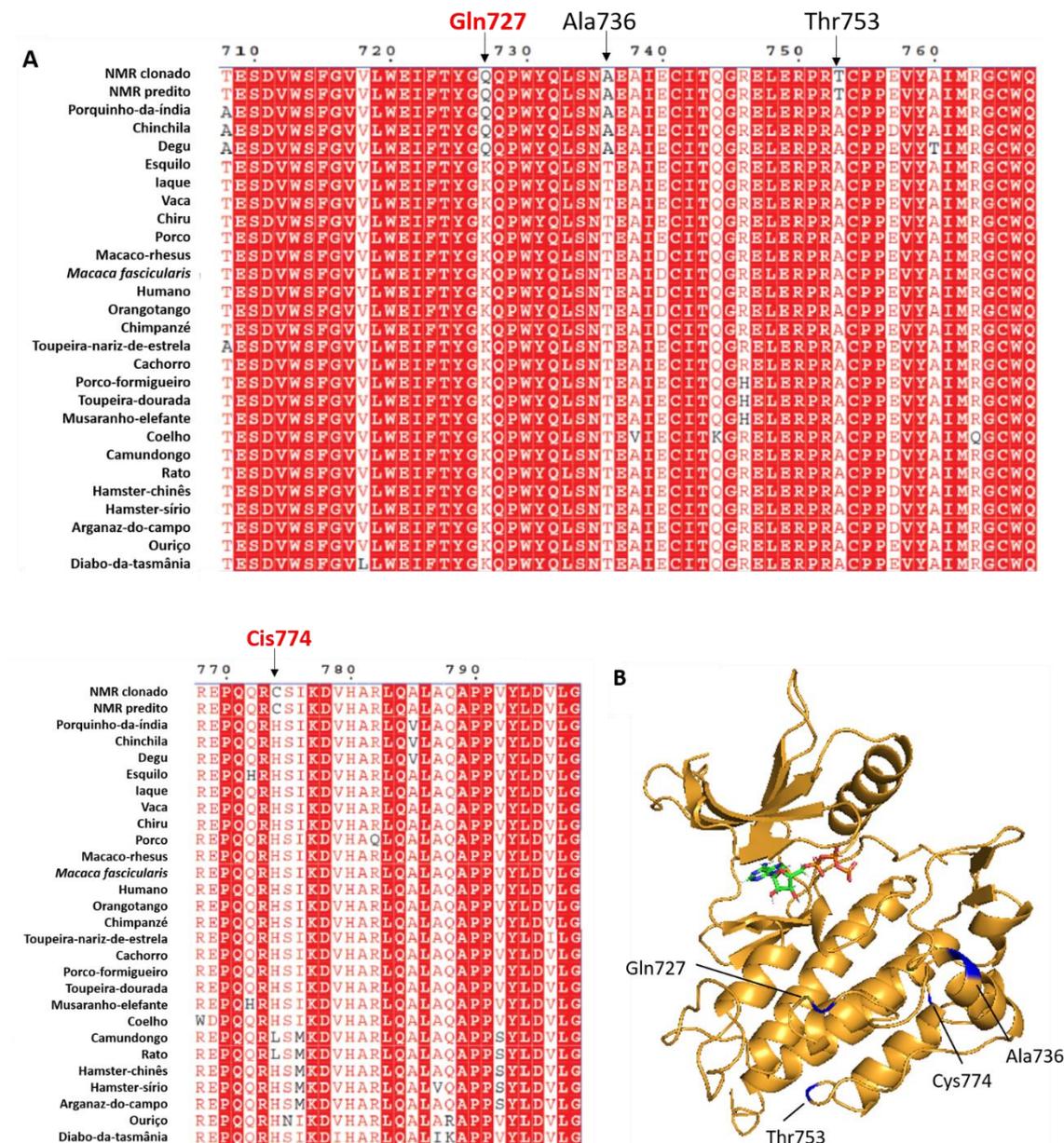


Figura 4.1. Alinhamento do domínio quinase de TrkA de NMR e outros 26 mamíferos. (A) O domínio quinase é muito conservado, porém alguns resíduos são exclusivos de NMR, destacando-se os que foram utilizados nesse estudo a glutamina 727 e a cisteína 774. A glutamina também é encontrada em porquinho-da-índia, chinchila e degu, e o resíduo correspondente a cisteína em rato e camundongo trata-se de uma leucina. Os números representam a posição dos resíduos de aminoácidos de NMR. Adaptado (OMERBAŠIĆ et al., 2016). (B) A partir de modelagem por homologia com o domínio quinase de FGF (PDB ID: 5EG3) utilizando-se o *software* YASARA, tem-se a estrutura do domínio quinase ativo da TrkA de NMR. Em destaque em azul encontram-se os resíduos mencionados.

O resíduo de cisteína na posição 774 da TrkA de NMR chamou a atenção porque ele ocorre exclusivamente nesse animal. Contudo, apesar da ampla conservação de histidina nos demais organismos, em rato e camundongo o correspondente a esse resíduo é uma leucina. A partir daí surgiu o interesse em estudar essa mutação, devido ao potencial de interações que esse tipo de cadeia lateral pode introduzir na estrutura da proteína nesse organismo.

Além dessa mutação, o resíduo de glutamina na posição 727, que também ocorre no porquinho-da-índia, chinchila e degu, é amplamente conservado como uma lisina nos demais organismos, inclusive rato e camundongo. Essa troca de aminoácido também fornece uma diferença importante no caráter bioquímico da cadeia lateral na estrutura proteica, podendo fornecer novas interações com a própria TrkA, ou mesmo com seus substratos, que estariam inibidas na TrkA do NMR.

Esses resíduos forneceram um norte inicial na busca da construção de mutantes para se avaliar a ativação da TrkA e seus substratos ao mimetizar o contexto bioquímico da quinase de NMR.

4.2. A TrkA de NMR não apresenta diferença na dimerização do receptor

Seguindo-se o protocolo de eletroforese em gel não redutor, que tem como principal característica a ausência de agentes redutores (β -mercaptoetanol ou ditioneitol) no preparo das amostras, pode-se analisar a importância de resíduos de cisteína oxidados na dimerização da TrkA. Os agentes redutores desempenhariam um papel no rompimento das pontes dissulfeto separando possíveis dímeros estabilizados por tal interação.

No caso da TrkA de NMR foi identificada uma cisteína que está presente apenas nesse organismo ao comparar-se com demais mamíferos (Figura 4.1) (OMERBAŠIĆ et al., 2016). Nossa hipótese inicial foi de que essa cisteína pudesse desempenhar algum papel na dimerização do receptor de NMR, ou em alguma outra interação que não aconteceria nos demais organismos. Dessa maneira poderíamos ter uma pista inicial na diferença da atividade da TrkA levando-se em conta esse tipo de interação.

As linhagens geradas em células HEK que expressam as TrkA de rato e NMR foram utilizadas para o ensaio de gel não redutor, em que seguiu-se o protocolo de tratamento com catalase e NEM (N-etilmaleimida), antes da lise celular. Os lisados seguiram o protocolo de desnaturação em duplicata, sendo que em uma replicata os lisados foram preparados com adição de β -mercaptoetanol e em outra adicionou-se água na mesma proporção. Em um único gel aplicaram-se as amostras reduzidas e as não reduzidas, incluindo-se como controle uma célula HEK que passou pelos mesmos tratamentos porém não foi transfectada com as construções de TrkA.

A Figura 4.2 mostra o resultado obtido desse ensaio, em que pode-se observar o mesmo padrão de bandas das construções de rato e quimera em um contexto

reduzido e em um contexto não reduzido, além de que as amostras que foram ativadas com NGF comparando-se rato e rato L775C também não apresentaram mudança. Vale destacar que a dimerização da TrkA que ocorre a partir da ligação do NGF não é mantida por pontes dissulfeto, com isso não esperamos obter a banda referente ao homodímero de TrkA referente apenas à ativação do receptor. Isso nos leva a refutar a hipótese inicial de que o resíduo de cisteína exclusivo do NMR desempenha algum papel na dimerização da TrkA ou quaisquer outras possíveis interações.

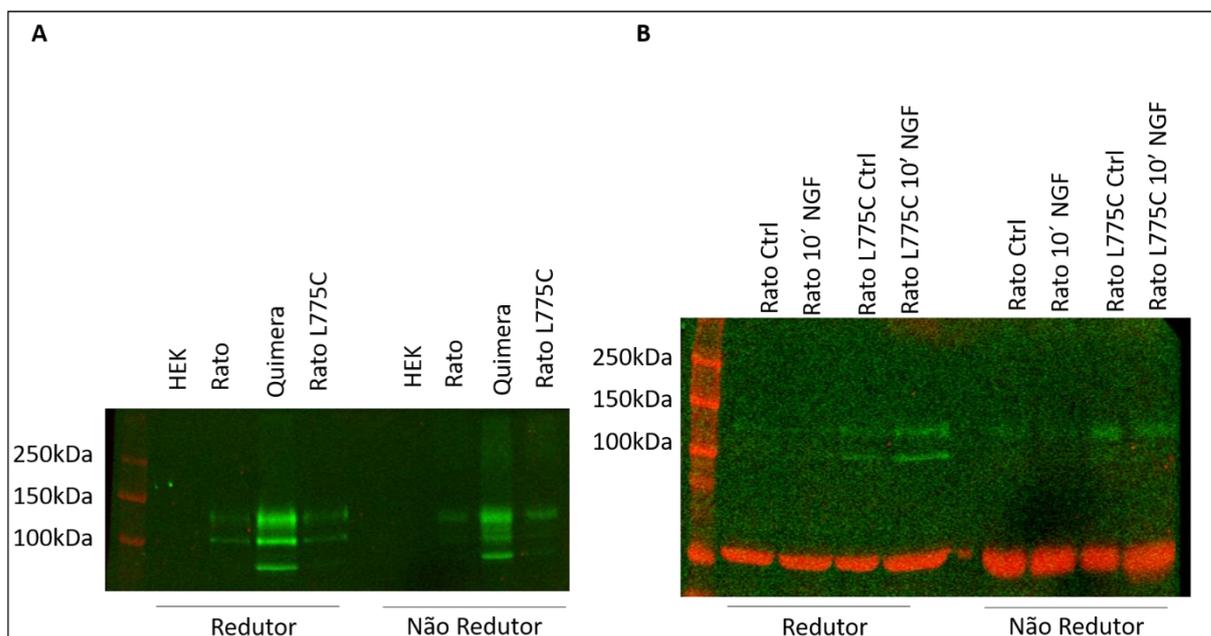


Figura 4.2. A construção quimérica e de rato com mutação L775C não influencia na dimerização da TrkA. (A) Utilizou-se como controle um célula HEK não transfectada com TrkA e realizou-se *Western blot* de linhagens que expressam TrkA de rato, quimérica e rato L775C tratando-se as amostras com β -mercaptoetanol ou não; não observaram-se bandas referentes possíveis dímeros, sendo representadas apenas as típicas bandas de TrkA imatura não glicosilada (80 kDa) e maduras (110 e 140 kDa) tanto em amostras reduzidas quanto em não reduzidas. (B) As linhagens que expressam as construções de rato e rato L775C foram tratadas ou não com NGF (75 ng/mL) e β -mercaptoetanol; pode-se notar que também não houve mudança quanto a possível dimerização ou interação do resíduo de cisteína adicionado com qualquer outra proteína. Em ambos foi utilizado o anticorpo anti-TrkA total produzido em coelho (ABCAM 76291), (1:2000) e em (B) foi utilizado para controle de endógeno o anticorpo anti α -Tubulina (*Thermo Fisher Scientific*), (1:10000).

4.3. As construções de TrkA localizam-se na membrana de células HEK293 transfectadas

Para realização dos ensaios de ativação da TrkA é importante que ela mimetize o máximo o seu sistema biológico natural. Como trata-se de um receptor de membrana acoplado a uma tirosina quinase, é importante investigar se a expressão dessa proteína como material exógeno em uma célula de interesse se direciona para a membrana. Além de futuros resultados de *Western blot* que indiquem a total glicosilação da TrkA com o aparecimento de bandas a 140kDa, indicando a sua localização na membrana (MARTIN-ZANCA et al., 1989), utilizou-se a imunofluorescência como um método qualitativo de localização celular para investigar essa condição (Figura 4.3).

As linhagens foram estabelecidas transfectando-se as construções de TrkA de rato e quimérica (porção extracelular de rato e porções transmembranar e intracelular de NMR), cordialmente cedidas pelo Dr Gary Lewin (*Max Delbrück Center for Molecular Medicine*, Berlim, Alemanha), utilizando-se células HEK293.

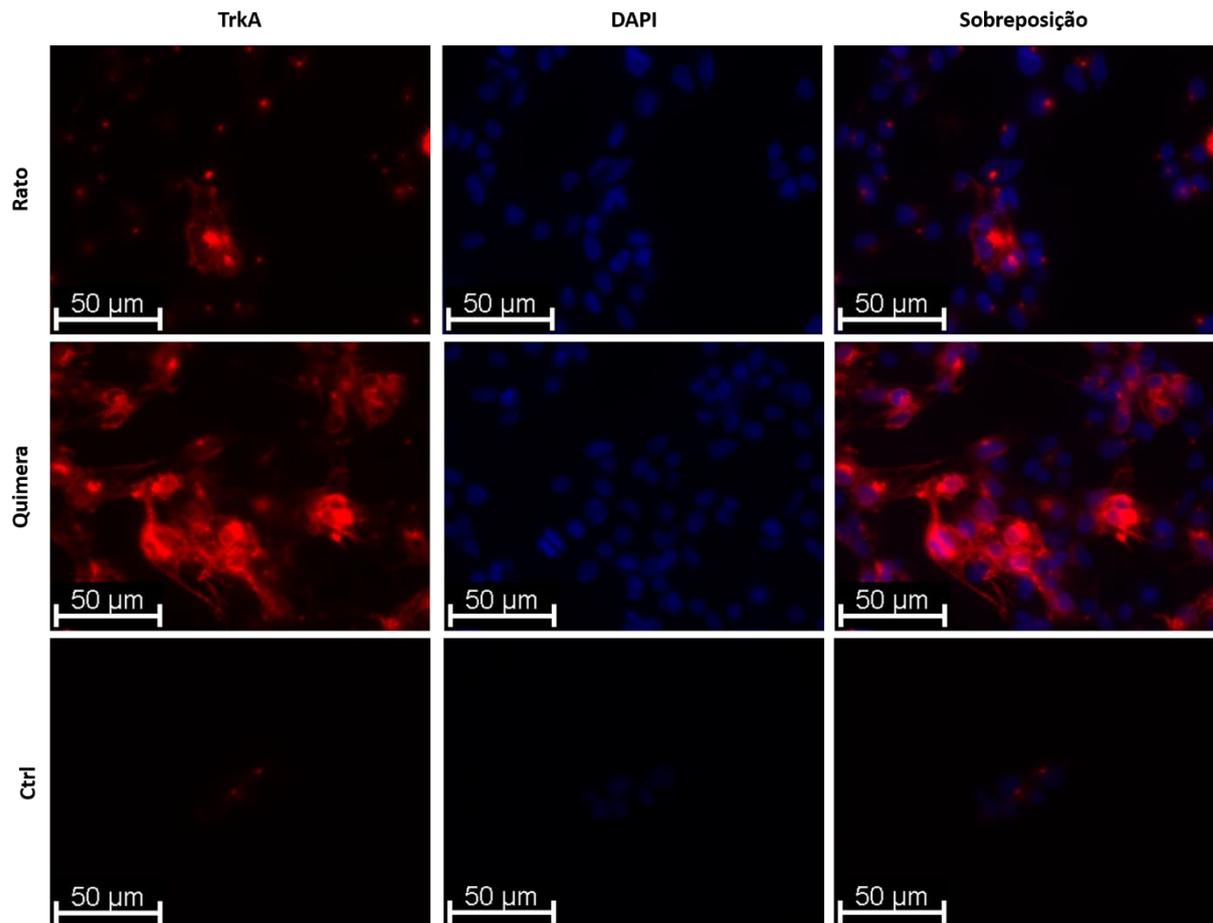


Figura 4.3. As construções de TrkA localizam-se na membrana das células transfectadas que as expressam. Linhagens celulares de HEK293 que expressam as construções de TrkA de rato e quimera, ou como controle apenas células HEK293, tratadas com DAPI 0,5 µg/mL e incubadas com anticorpo anti-TrkA total produzido em coelho (ABCAM 76291), (1:200). Utilizou-se o anticorpo secundário anti-coelho *AlexaFluor*® 555 (1:400) e o microscópio de fluorescência DMI8 Leica, canais DAPI e *Rhodamine 555*.

Pode-se observar pela Figura 4.3 que as linhagens transfectadas expressam a TrkA, que é marcada pelo anticorpo em comparação com o controle que consiste de células HEK não transfectadas, que não possui sinal. Observa-se também que o nível de expressão da linhagem de quimera aparenta ser maior do que a linhagem de rato, dado que se repete nos resultados de *western blot* (sessões posteriores). Pela morfologia demarcada pela marcação do anticorpo anti TrkA, em comparação com

DAPI que marca núcleo, pode-se concluir que a proteína localiza-se na membrana das células que a expressa. Isso é uma boa característica experimental pelos motivos já citados no início dessa sessão. Observa-se também que apesar de serem linhagens celulares muitas células não expressam TrkA.

Em seguida, nosso objetivo seria observar se a ativação das linhagens que expressam TrkA por NGF ao serem transfectadas de maneira transiente com PKC β -GFP levaria à translocação de PKC para a membrana, indicando que essa proteína foi ativada com um agonista a montante nessa via. Um experimento piloto foi realizado transfectando-se células HEK293, sem TrkA, com PKC β -GFP e ativando-as com PMA, um clássico agonista de PKC (Figura 4.4) (SCHECHTMAN et al., 2004).

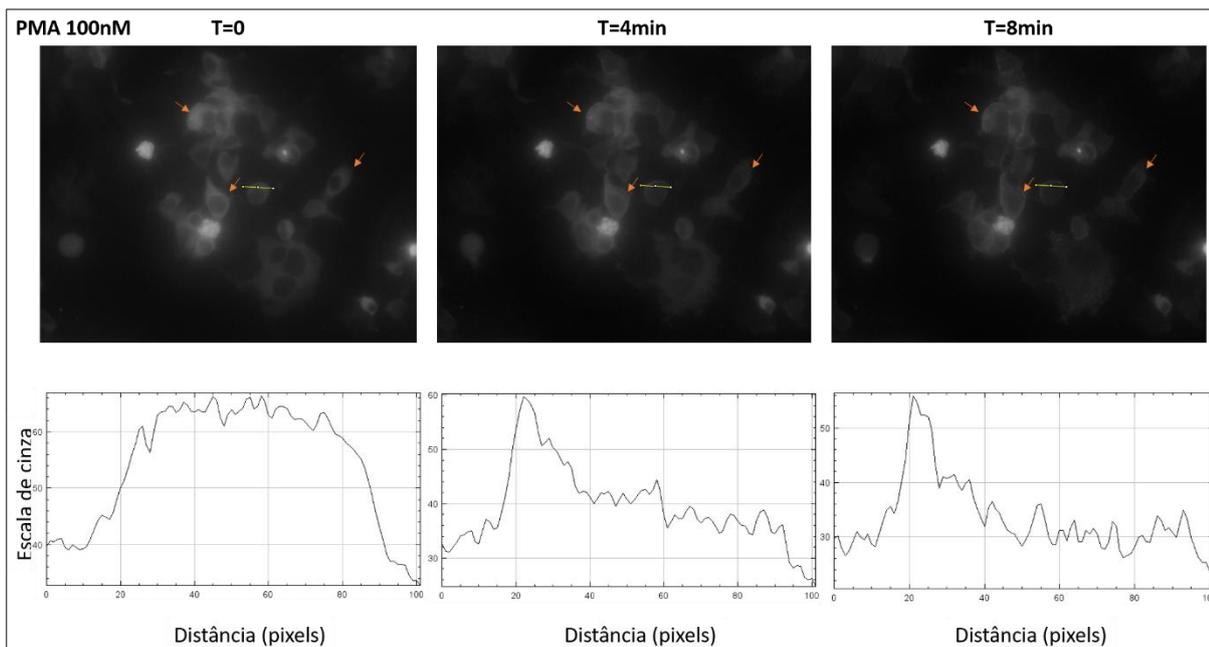
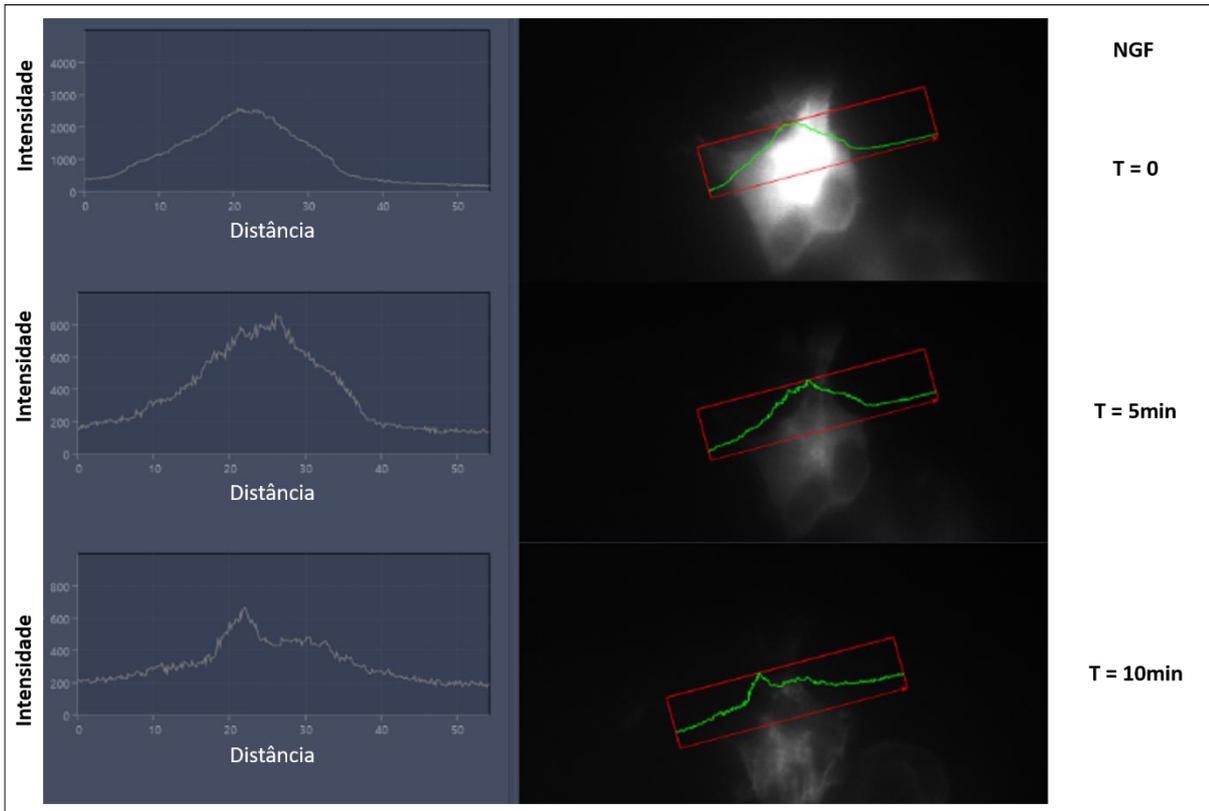


Figura 4.4. PKC β transloca-se para a membrana após ativação com PMA. Foi administrado 100 nM de PMA em células carenciadas de soro *overnight* e observou-se nos tempos de 4 e 8 minutos a translocação da sonda fluorescente (PKC β -GFP) para a membrana, como pode ser observado nos gráficos de perfil de intensidade linear de fluorescência. Foi utilizado o microscópio de fluorescência do laboratório da Professora Bettina Malnic (Instituto de Química, USP) - *Nikon Eclipse TE300*, e a quantificação de imagens pelo *software ImageJ*.

Pode-se observar pelo perfil de intensidade linear que a intensidade de fluorescência na região do citoplasma diminui à medida que na região periférica (membranar) da célula ganha destaque. Isso também é evidenciado nas imagens da microscopia, em que as células deixam de ter fluorescência homogênea no interior (excetuando-se região nuclear) e apresentam apenas uma “casca” fluorescente.

Uma vez que o experimento de translocação mostrou-se funcional, seguimos para a experimentação no microscópio de fluorescência com reflexão total interna (TIRF), em que as próprias linhagens que expressam TrkA são transfectadas com PKC β -GFP e podemos observar a translocação da sonda utilizando-se NGF (Figura 4.5).

A



B

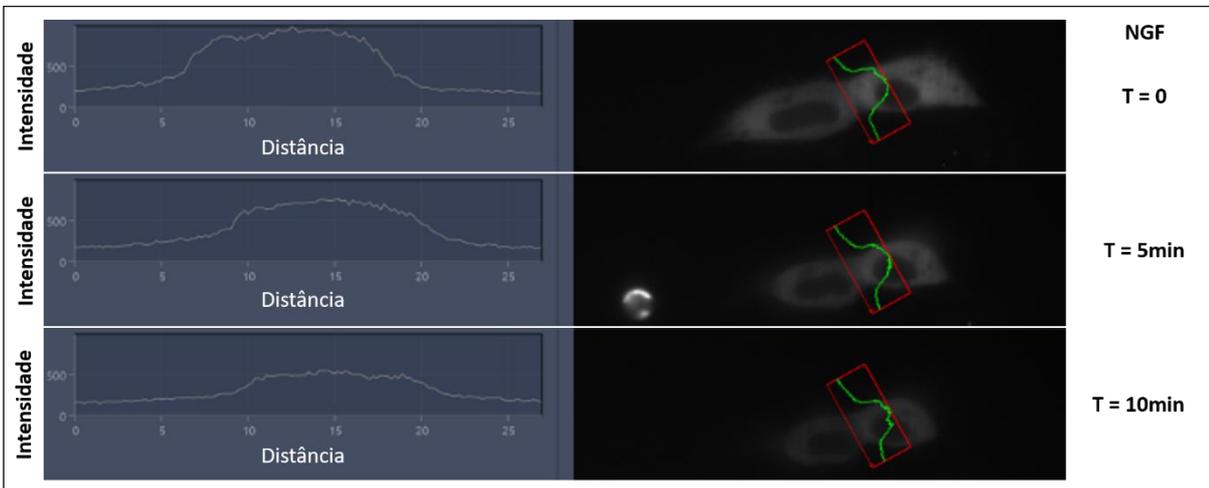


Figura 4.5. A ativação por NGF de células que expressam TrkA leva à translocação de PKC β -GFP de maneira diferente entre as construções rato e quimera. Linhagens celulares que expressam as construções (A) rato e (B) quimera foram transfectadas com PKC β -GFP estimuladas com NGF (70 ng/mL) e monitoradas em tempo real utilizando-se o microscópio *Axio Observer.Z1* (CEFAP – ICB, USP). 48 horas após transfecção da sonda fluorescente as células foram carenciadas de soro por 2h e

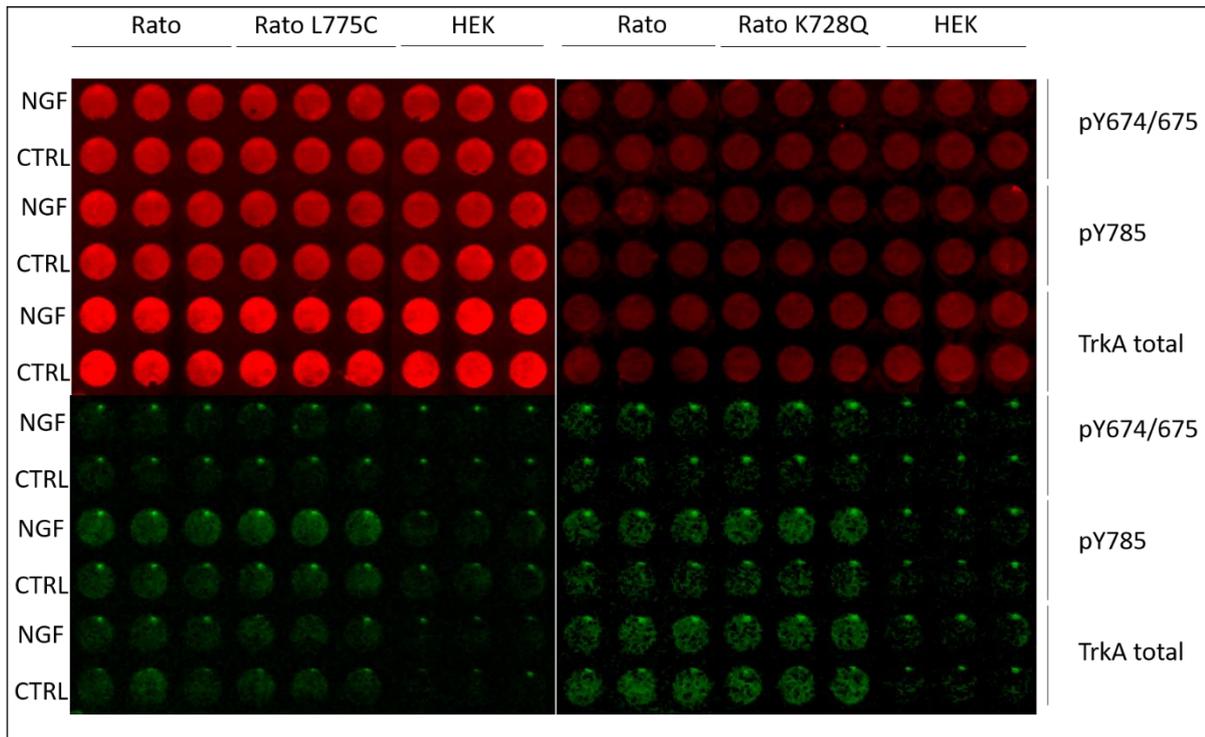
então submetidas à ativação e microscopia. Utilizando-se o *software Zen 2.6 (blue edition)* – Carl Zeiss, as imagens foram quantificadas fixando-se os tempos 0, 5 e 10 minutos para construção do perfil de intensidade linear.

Observamos o mesmo perfil de translocação do experimento de ativação apenas com PMA (Figura 4.4), quando ativamos com NGF a construção que expressa TrkA de rato (Figura 4.5a). Apesar de um claro efeito de *bleaching* da fluorescência, é claro pela localização do sinal na célula e pelo perfil de intensidade linear que houve uma redução na região interna e uma concentração na região periférica da célula. Isso indica que houve translocação da sonda, mostrando que ao ativar uma célula que expressa TrkA com NGF, uma proteína a jusante na via (PKC) foi ativada com sucesso. É importante a comparação dos resultados obtidos em A e B da Figura 4.5 porque há uma clara diferença na ocorrência do fenômeno de translocação, sendo que nos tempos 5 e 10 minutos isso ocorreu claramente na linhagem que expressa TrkA de rato, mas não na quimérica. Isso sugere que possa haver corroboração de dados da hipofuncionalidade da TrkA de NMR ao comparar-se com a de rato.

O ensaio de imagem em tempo real confirmou a hipofuncionalidade da TrkA de NMR entretanto queríamos primeiramente testar os mutantes em ensaios mais robustos e dessa forma utilizamos o *In-Cell* bem como o *Western blot*.

4.4. A mutação do resíduo de cisteína não interfere na ativação da TrkA

Após obtenção das linhagens celulares que expressam as construções desejadas, os ensaios de ativação via expressão das proteínas ou modificação pós traducionais (fosforilações) iniciaram-se. Uma tentativa de análise quantitativa foi a realização do *In-Cell*, em que seria mais fácil quantificar os efeitos de ativação ou inibição (Figura 4.6).

A

B

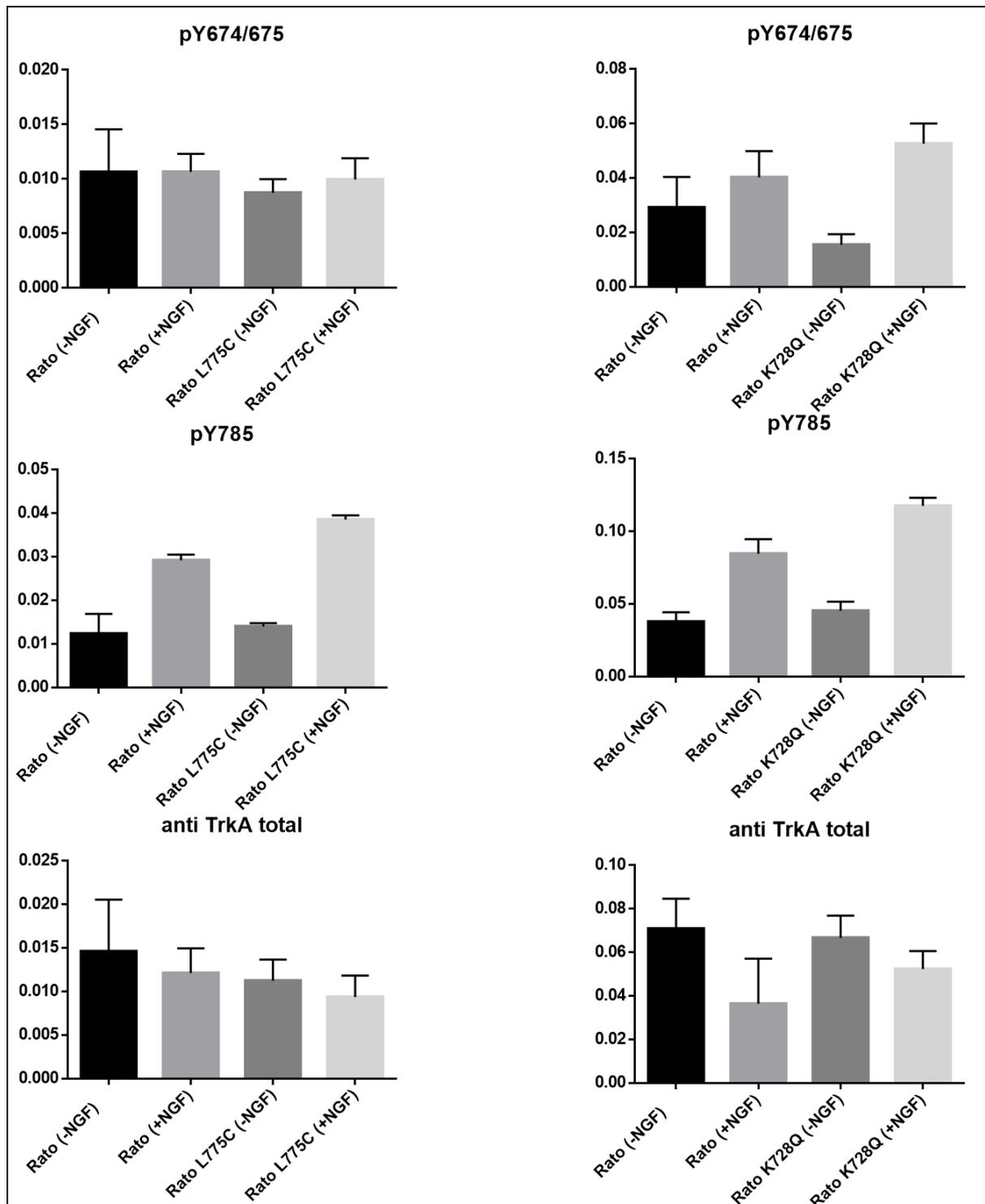


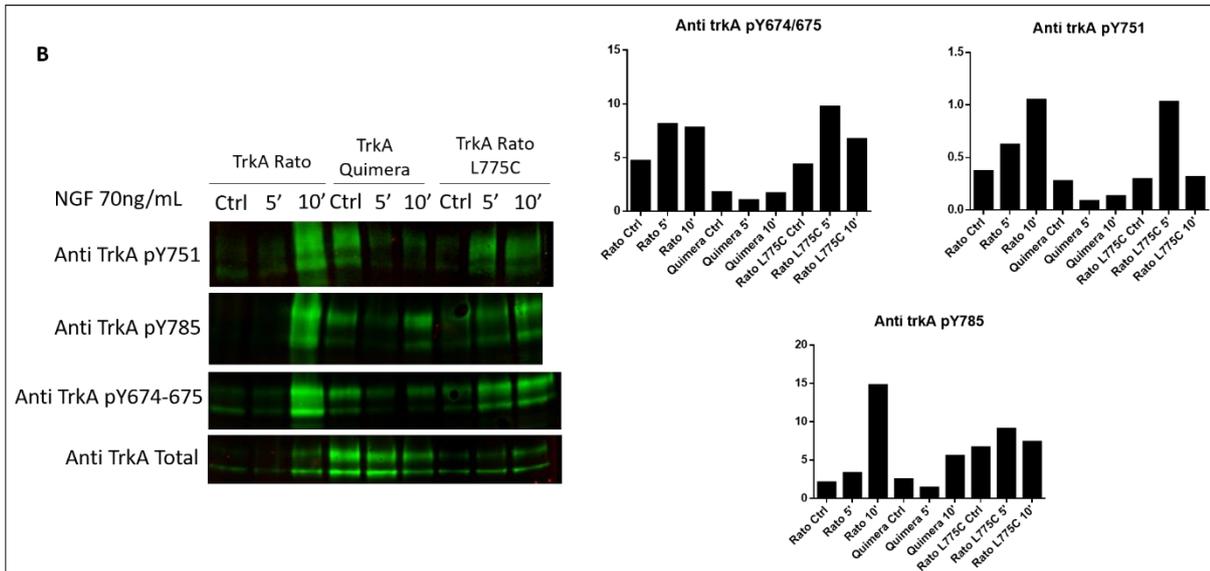
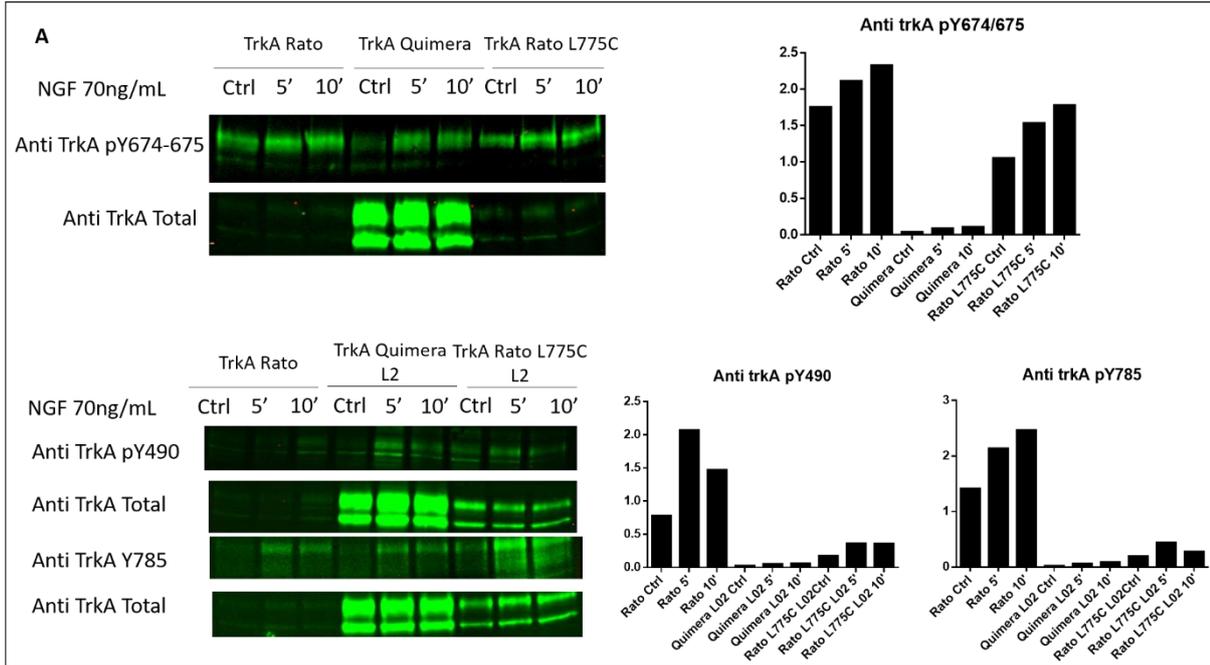
Figura 4.6. As mutações L775C e K728Q não alteram a auto ativação da TrkA. Linhagens que expressam as construções de TrkA de rato, rato L775C e rato K728Q foram plaqueadas em multipços P96 e seguiram o protocolo de *in-cell*. Após ativação ou não com NGF 100ng/mL por 10 minutos, fixação e bloqueio, as células foram incubadas *overnight* nos anticorpos primários anti pan TrkA 1:2000 (ABCAM 76291), anti TrkA pY674/675 1:200 (*Cell Signaling Technology* 4621) e anti TrkA pY785 1:200

(*Cell Signaling Technology* 4168) e anti α -Tubulina 1:5000 (*Thermo Fisher Scientific*). Incubação por 2h nos anticorpos secundários 1:10000 Li-Cor IRDye anti coelho 800CW e anti camundongo 680RD seguindo-se de leitura no equipamento *Odyssey Imager*. As imagens foram quantificadas no *software ImageStudio* e normalizados os valores do canal 800 (TrkA total e fosforiladas) em relação ao sinal da α -tubulina (canal 700). Os gráficos foram construídos no *software GraphPad Prism* 6. (A) Imagem representativa do sinal de fluorescência das células (vermelho o sinal referente a α -tubulina; verde referente a TrkA, total ou fosforilada). (B) Quantificação normalizada pelo sinal da tubulina em cada poço e representação gráfica. Experimentos realizados uma única vez com triplicata em cada placa (representada em A).

Essa técnica mostrou-se muito variável por questões técnicas de manuseio celular e eficiência de anticorpo, porém pudemos ter uma ideia inicial do impacto das mutações na ativação da TrkA. Na figura 4.6b, painel da esquerda existe a comparação entre rato e mutante L775C, em que sugere-se um aumento na fosforilação de Y785 e nenhuma mudança em Y674/675. No painel da direita a comparação entre rato e mutante K728Q sugere a mesma coisa: mutante aumenta a fosforilação em relação ao selvagem. Ou seja, esses mutantes na TrkA não tiveram impacto na atividade da proteína.

Como essa técnica apresentou certa dificuldade, seguimos as análises utilizando-se *Western blot* tradicional. Foram realizados protocolos de *Western blot* em lisados celulares provenientes de células HEK que expressam as construções de TrkA de rato, químera e rato mutante L775C, tanto em linhagens quanto em construções por transfecção transiente. Os experimentos iniciais foram feitos utilizando-se linhagens celulares, porém a diferença de expressão basal do receptor nas diferentes linhagens (já evidenciado nos resultados de imunofluorescência) tornou-se um problema. Com uma maior expressão por conta da TrkA quimérica e mutante de rato, pode haver interferência na via de sinalização, deixando-se o sinal

basal da TrkA dessas construções mais alto do que à referente ao rato selvagem (Figura 4.7). Com isso, os experimentos seguintes foram desenvolvidos apenas utilizando-se o modelo de transfecção transiente. A Figura 4.7 permite analisar o perfil de auto-ativação nos resíduos de fosforilação da TrkA já descritos (Y490, Y674/675, Y751 e Y785), tanto nas linhagens quanto em transfecção transiente.



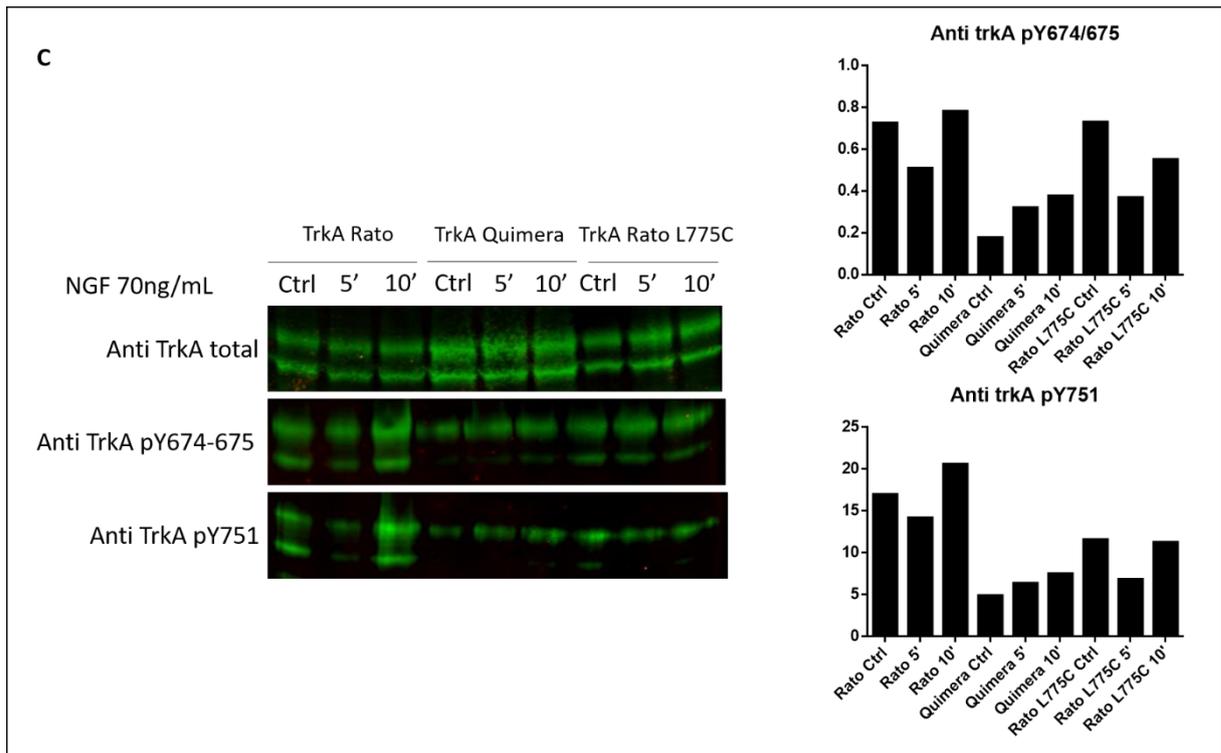


Figura 4.7. Variação da ativação de TrkA em linhagens celulares e de super expressão utilizando-se construções rato, quimera e rato L775C. As linhagens celulares que expressam as construções rato, quimera e rato mutante L775C foram estimuladas ou não com NGF (70 ng/mL) por 5 e 10 minutos. Lisados celulares foram quantificados utilizando-se *Bradford* e 70ug de proteínas (10% β -mercaptoetanol) foram utilizados para SDS-PAGE e posterior transferência em membrana PVDF. Anticorpos primários anti pan TrkA total 1:2000 (ABCAM 76291), anti TrkA pY490 1:400 (ABCAM 85130), anti TrkA pY674/675 1:1000 (*Cell Signaling Technology* 4621), anti TrkA pY751 1:1000 (Invitrogen 44-1342G) e anti TrkA pY785 1:1000 (*Cell Signaling Technology* 4168) foram incubados *overnight* e anticorpos secundários 1:15000 IRDye LI-COR anti coelho 800CW e anti camundongo 680RD por 1 hora ao abrigo da luz. Membranas foram analisadas no equipamento *Odyssey Imager* e imagens foram quantificadas com o *software ImageStudio*. Os sinais fosforilados foram normalizados dividindo-se pelo respectivo total (gel espelho) e as razões foram representadas graficamente utilizando-se *GraphPad Prism* 6. (A) Ativação de linhagens e análise de pY490, pY674/675 e pY785. (B e C) Ativação de construções por transfecção transiente e análise de pY674/675, pY751 e pY785 (B) e pY674/675 e pY751 (C).

Apesar de haver alguma variação nos resultados de ativação, cada imagem é representativa de uma duplicata. Pode-se notar a tendência de ativação em todas as

construções (rato, quimera e mutante rato L775C), porém com uma intensidade bem inferior na construção quimérica. Isso confirma resultados anteriores de menor ativação das tirosinas 490 e 674/675 (OMERBAŠIĆ et al., 2016), e traz uma nova análise de tirosinas ainda não estudadas (751 e 785).

Com relação ao perfil de ativação do mutante rato L775C, pudemos notar que na maioria dos experimentos ele mostrou-se ligeiramente reduzido em comparação à TrkA de rato, mostrando um resultado um pouco diferente do que havia sido demonstrado com o experimento de *In-Cell*. Com isso surgiu a necessidade de analisar, através de ferramentas computacionais, o real impacto que as mutações poderiam gerar para serem direcionados aos estudos *in vitro*. Também mudamos a abordagem de análise da ativação, ao observar apenas o perfil de ativação dos substratos da TrkA (seções posteriores).

4.5. Modelagem da interação com substratos indica a importância da Lisina 728 da TrkA de rato na ligação à PLC γ

Com auxílio do Dr Helder Veras Ribeiro Filho, pesquisador do Laboratório de Biologia Computacional do LNBio/CNPEM, realizamos uma modelagem para verificar o impacto das mutações no contexto estrutural da TrkA com seus substratos, especificamente a PLC γ .

Os resultados obtidos (Figura 4.8) indicam a importância do resíduo de lisina para interação com a PLC γ . Ao adicionar esse resíduo onde ele é mutante na TrkA de NMR (para um resíduo de glutamina) obteve-se uma variável energética mais favorável. Ao analisarmos a natureza bioquímica desses resíduos pode-se relacionar à maior basicidade da lisina frente à glutamina, em uma região de interação com substratos onde resíduos ácidos estão presentes (Figura 4.8e)

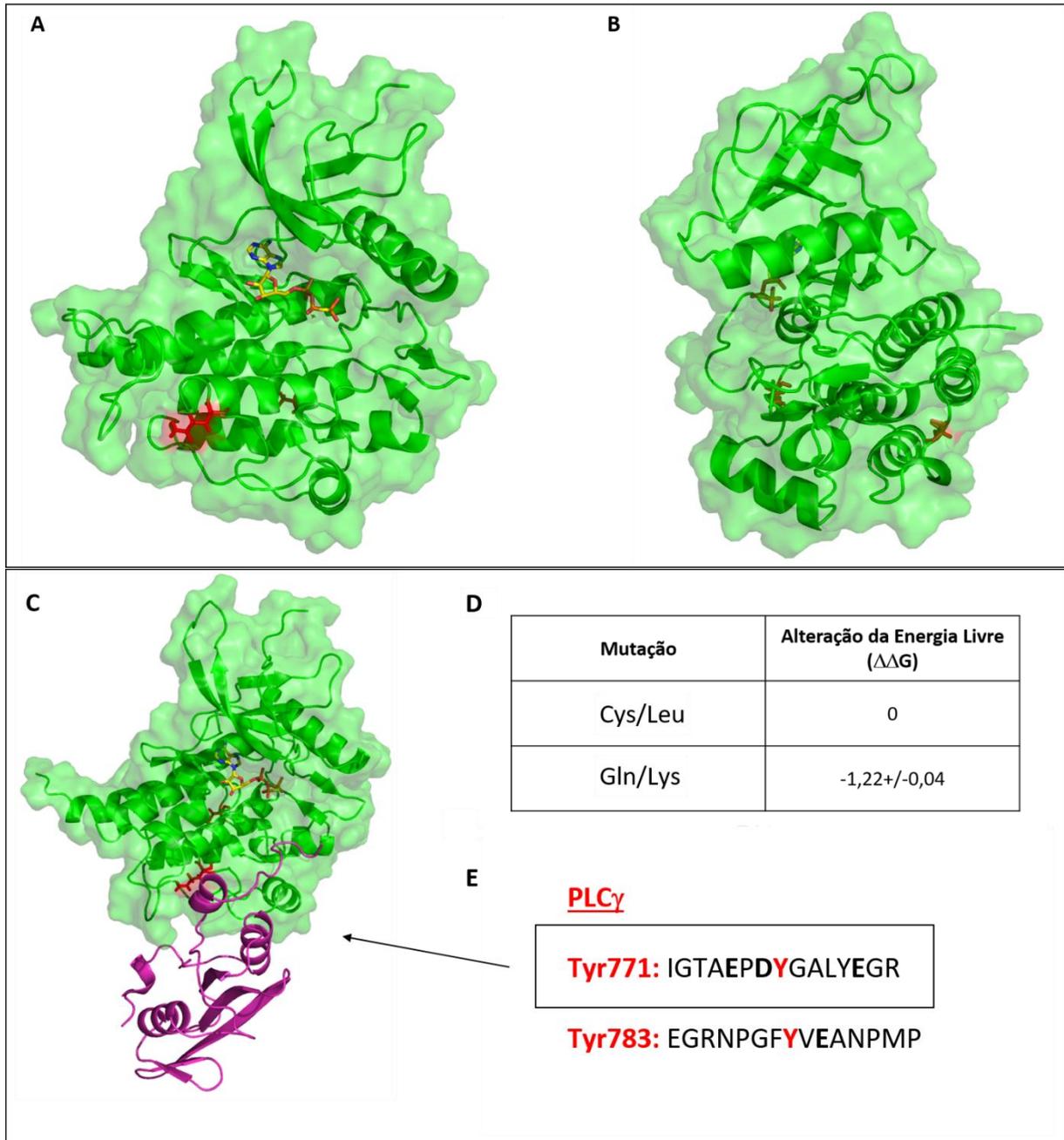


Figura 4.8. A localização das mutações na TrkA de NMR e a importância do resíduo de lisina que substitui a glutamina do NMR. (A-C) Em verde está representada a TrkA de NMR, modelada por homologia com o domínio quinase de FGF (PDB ID: 5EG3) utilizando-se o *software* YASARA. Em vermelho estão destacadas os resíduos de aminoácidos que trabalham com mutações: em NMR os resíduos cisteína 774 e glutamina 727. (A) Visão frontal da TrkA em relação ao sítio catalítico. (B) Rotação de 90° da quinase. Observa-se o posicionamento do resíduo de glutamina na face frontal, na mesma do sítio catalítico, e do resíduo de cisteína na face posterior da quinase. (C) Representação do *binding* com PLC γ (magenta), onde pode-se notar a proximidade da glutamina com esse substrato na

região de fosforilação da Y771. (D) Balanço energético resultante das mutações utilizando-se o *software* FoldX. (E) Sequência dos peptídeos que contém as tirosinas 771 e 783, no C-SH2 de PLC γ .

A partir desses dados pudemos nos direcionar melhor ao dar continuidade às análises de ativação de acordo com os resíduos de aminoácidos mutantes encontrados na TrkA de NMR. Até então não havíamos obtido um resultado satisfatório que provasse a hipofuncionalidade da proteína alvo ao analisar a mutação de L/C. Os resultados anteriores sugerem que pode não haver nenhuma outra interação com outras proteínas ou alguma outra região da TrkA através de potenciais novas pontes dissulfeto formadas pela inserção da cisteína. Esse último resultado confirma que além disso não existe qualquer efeito esperado no *binding* de um substrato importante na sinalização da dor, a lipase PLC γ , tanto pela sua distância espacial quanto por cálculos teóricos de energia. Lembrando que nossos dados sugerem que a ativação da PKC, que se dá via PLC γ é menor na TrkA de NMR quando comparada à TrkA de rato.

4.6. A ativação de PLC γ é alterada ao realizar mutação na Lisina 728 por Glutamina

Obtendo-se esse resultado promissor de que haveria mudança na ativação da TrkA pela mutação da lisina 728 (uma glutamina na posição 727 em NMR), pudemos analisar se nos ensaios celulares os cálculos concretizariam o fenômeno. Como citado anteriormente, pela variação dos anticorpos usados para análise da auto ativação da TrkA (anticorpos anti pY490, 674/675, 751 e 785), nossa estratégia foi de analisar a ativação dos próprios substratos: PLC γ (Figura 4.9) e ERK1/2 (Figura 4.11).

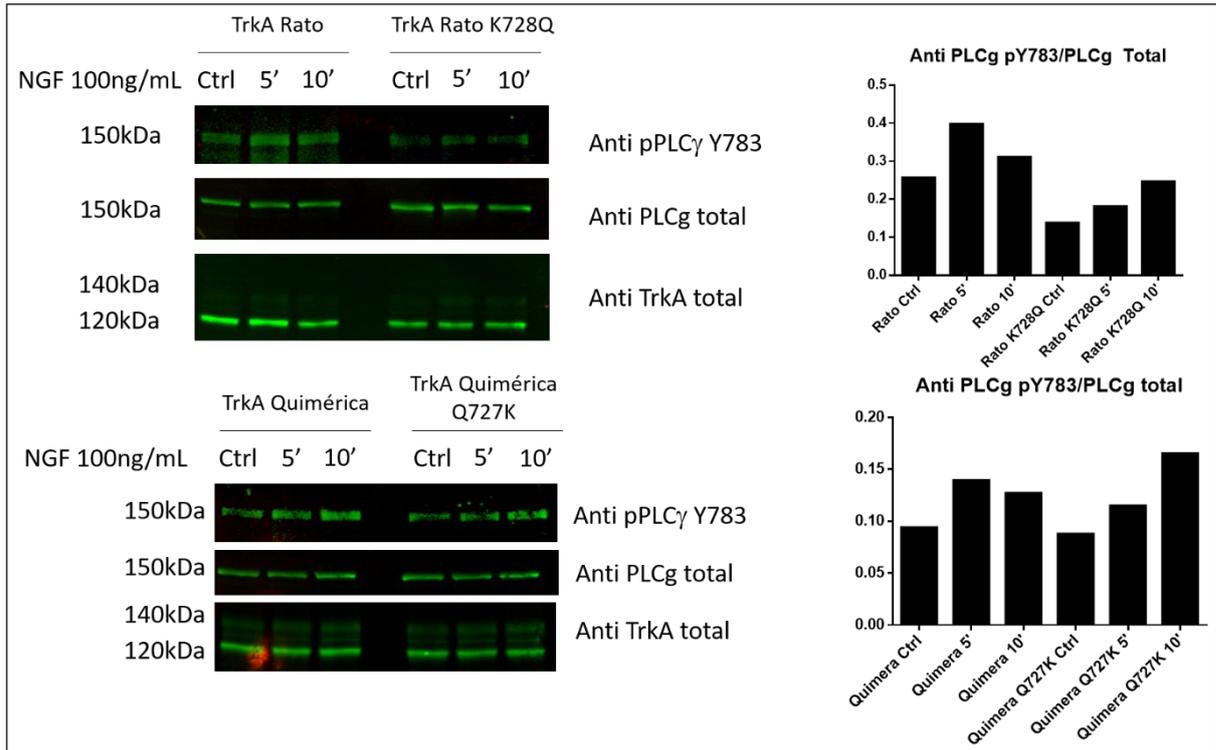


Figura 4.9. A mutação de lisina para glutamina na TrkA de rato reduz a ativação de PLCγ e a reversão da mutação – troca por lisina em NMR aumenta a ativação do mesmo substrato. Células HEK293 foram transfectadas seguindo o protocolo de transfecção transiente com as construções de TrkA de rato, rato mutante K728Q, quimera e quimera mutante Q727K. Antes da ativação as células foram carenciadas de soro *overnight* e foi utilizado 100 ng/mL de NGF por 5 e 10 minutos, excetuando-se o controle em que não houve utilização do agonista. 70 µg de proteínas (10% β-mercaptoetanol) foram utilizadas para performance de SDS-PAGE e posterior transferência para incubação dos anticorpos anti PLCγ pY783 1:1000 (Cell Signaling Technology 2821), anti PLCγ total 1:1000 (Cell Signaling Technology 2822) e anti TrkA total 1:2000 (ABCAM 76291); e anticorpos secundários LI-COR IRDye anti coelho 800CW e anti camundongo 680RD. Imagens obtidas pelo *Odyssey Imager* e quantificações realizadas no *ImageStudios*.

Podemos observar com esse experimento que de fato a ativação do substrato PLCγ apresentou uma redução quando troca-se o aminoácido lisina por glutamina na TrkA de rato, observando-se a redução da fosforilação da tirosina 783 do substrato. Ao reverter a mutação, trocando-se o aminoácido glutamina pela lisina na porção

quinase da TrkA de NMR, podemos ver um aumento da ativação em relação à construção sem mutante, o que sugere uma reversão no efeito observado no mutante de rato. Esse experimento foi repetido apenas no tempo 5 minutos com NGF e também foi testado um outro substrato a jusante na via com mesmo tempo de ativação, ERK1/2 (Figura 4.10).

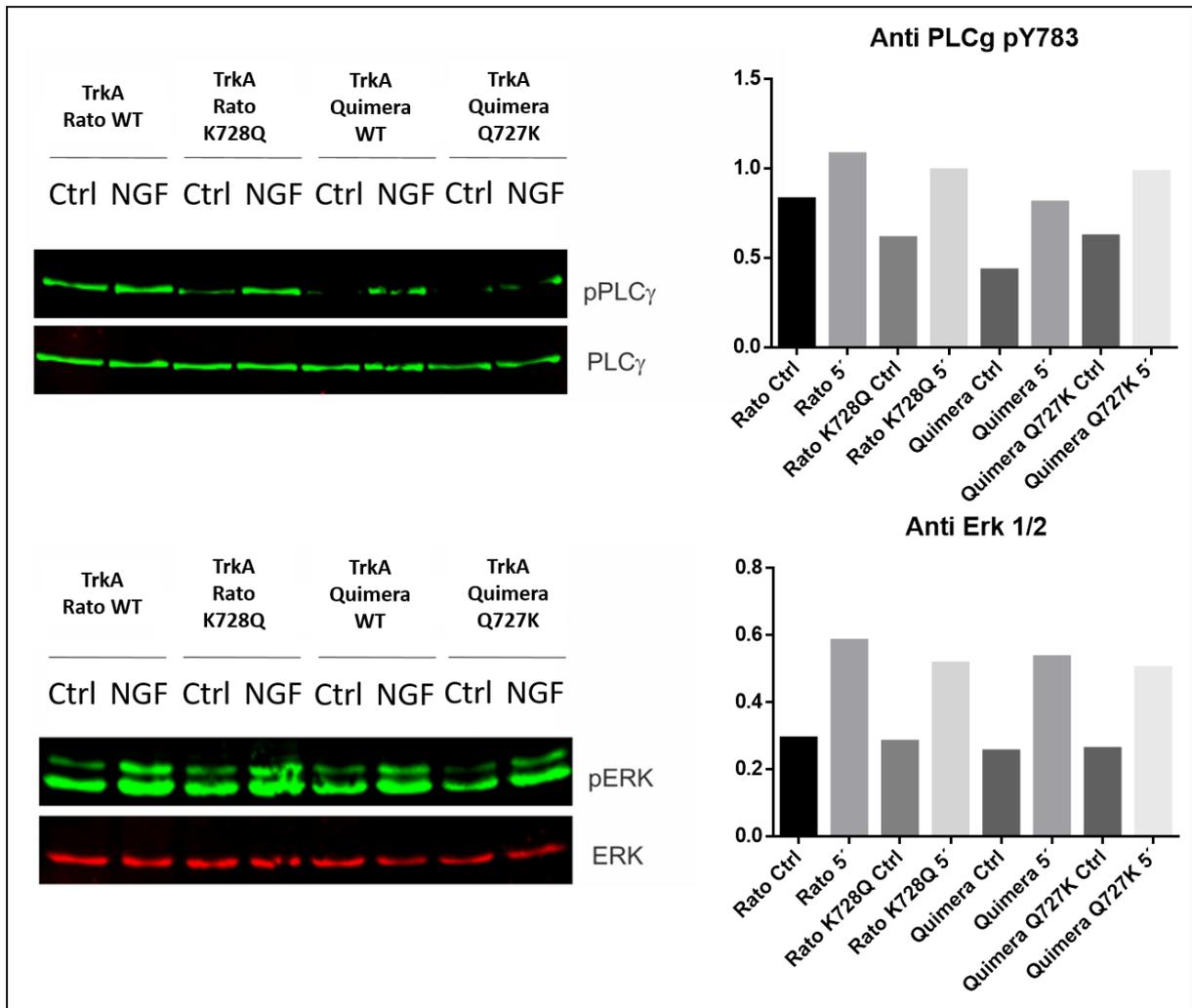


Figura 4.10. A mutação de lisina para glutamina em rato diminui a ativação de PLC γ e ERK e a reversão em quimera não ocorre com ERK. Células HEK293 foram transfectadas seguindo o protocolo de transfecção transiente com as construções de TrkA de rato, rato mutante K728Q, quimera e quimera mutante Q727K. Antes da ativação as células foram carenciadas de soro *overnight* e foi utilizado 100 ng/mL de NGF por 5 minutos, excetuando-se o controle em que não houve utilização do agonista. 70 μ g de proteínas (10% β -mercaptoetanol) foram utilizadas para performance de SDS-PAGE e posterior transferência para incubação dos anticorpos anti PLC γ pY783 1:1000 (Cell Signaling Technology 2821), anti PLC γ total 1:1000 (Cell Signaling Technology 2822), anti ERK pY204 (1:500) (Santa Cruz 7976) e ERK 1/2 (MK1) total 1:500 (Santa Cruz 135900); e anticorpos secundários LI-COR IRDye anti coelho 800CW, anti cabra 800CW e anti camundongo 680RD. Imagens obtidas pelo *Odyssey Imager* e quantificações realizadas no *ImageStudios*.

Temos a confirmação, embora bem sutil do efeito observado na Figura 4.10, em que a mutação de lisina diminui a ativação de PLC γ em rato e a reversão em NMR muito sutilmente reverte o efeito. Com relação ao substrato ERK, pode-se notar que tanto o mutante de glutamina em rato e lisina em NMR diminuem sua ativação, carecendo-se de uma repetição do experimento, que infelizmente não foi possível devido a problemas externos.

Apesar de a modelagem de *binding* representada na Figura 4.9 se tratar da interação da TrkA com a tirosina 771 de PLC γ , por falta desse anticorpo específico estamos vendo indiretamente a ativação, por outra tirosina. A modelagem com relação à interação da Y783 em PLC γ encontra-se na Figura 4.11.

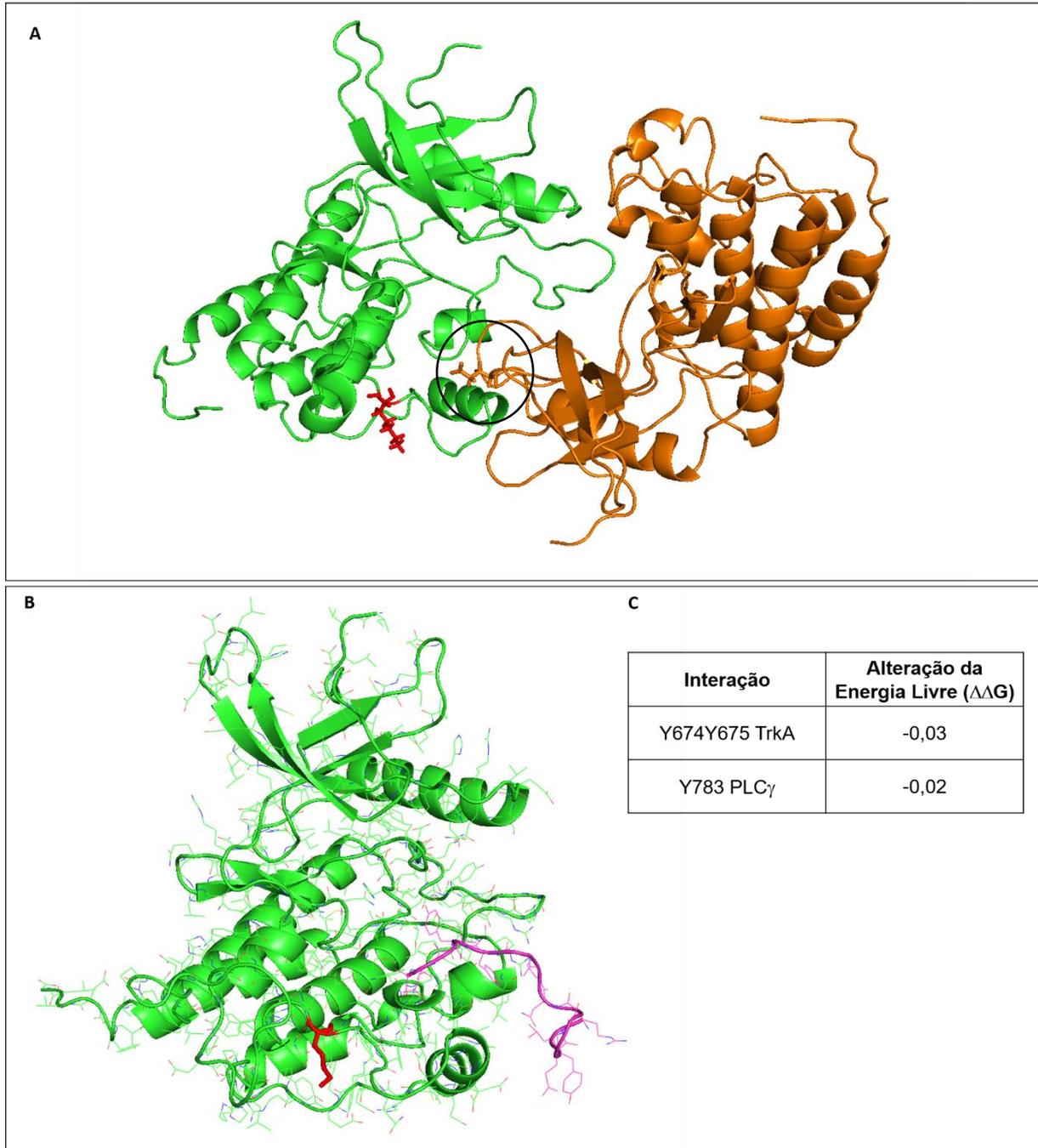


Figura 4.11. A mutação Q727K em NMR não impacta diretamente na auto-ativação da TrkA via Y674/675, nem no binding com PLC γ via Y783. Modelagem utilizando-se o mesmo molde anterior, a TrkA de NMR, modelada por homologia com o domínio quinase de FGF (PDB ID: 5EG3) utilizando-se o *software* YASARA. Em vermelho está destacado o resíduo de aminoácido glutamina 727, em magenta um trecho da PLC γ . (A) Modelo de dimerização da TrkA de NMR baseada no dímero da TrkA humana (também modelada anteriormente), destacando-se a referida mutação; em bastões laranja demarcado com círculo está representado um ácido glutâmico na cadeia lateral da TrkA. (B) Modelagem da TrkA de NMR interagindo com peptídeo que representa a região da PLC γ humana que

é fosforilada na posição Y783. (C) Balanço energético resultante das mutações utilizando-se o *software* FoldX.

Como já discutido anteriormente com relação aos resultados de *Western blot*, podemos analisar apenas a fosforilação da Y783 de PLC γ , que indicou certa mudança, apesar do balanço energético (Figura 4.11) indicar muito pouco impacto e sua posição estar distante do peptídeo indicado. Pode-se pressupor que a ativação observada na Y783 seja resultado indireto de ativação global da PLC γ , que deve ocorrer também na Y771. Além disso, na interação da TrkA e PLC γ de NMR, a última proteína pode se estender além do que está representado na modelagem, ocupando uma posição mais favorável da interação.

Outra consideração acerca dessa mutação é o impacto na auto-ativação da TrkA. Essa ativação não foi analisada por *western blot*, porém pode-se notar pela distância e pelo cálculo de energia de interação que nada mudaria também. No entanto, nota-se em destaque um ácido glutâmico que poderia se mover e acomodar-se próximo da lisina, no caso de um mutante de NMR, facilitando a afinidade e aumentando a atividade da TrkA (Figura 4.11A).

5. Discussão

O fato que motivou o desenvolvimento desse trabalho foi a atual crise de opioides, que agora é classificada como epidemia, que ocorre atualmente em países desenvolvidos (principalmente os Estados Unidos) (DEWEERDT, 2019). O uso de opioides, mesmo que de maneira lícita como morfina ou fentanyl no tratamento de doenças terminais como câncer tem levado a tolerância e a uma tendência em procura por uso recreativo, o que torna a procura por ilícitos, como a morfina se tornar um vício e levar à overdose (DEWEERDT, 2019; DUNN et al., 2010). Por mais que hajam outras alternativas terapêuticas como os NSAIDs, a busca pelo tratamento da dor tem se tornado um foco de grande interesse na pesquisa, sendo um objetivo a longo prazo a ser elaborado com início nesse trabalho. Os grandes motivos que levam à essa busca surgiram desde que a dor começou a ser classificada como um problema que necessita de maiores cuidados, e as drogas utilizadas em seu tratamento tiveram as consequências já citadas que levaram à atual crise.

Surpreendentemente, apenas na 72ª Assembleia de Saúde Mundial (Organização Mundial de Saúde), em maio de 2019, a dor crônica foi indicada para entrar na categoria “Sintomas, Sinais ou Achados Clínicos” do CID-11 (11ª edição da Classificação Internacional de Doenças) (RODRIGUEZ, 2019). Isso confirma a crescente necessidade de abordagem da dor na sociedade, que no Brasil atinge de maneira crônica 37% da população (SBED, [s.d.]).

Essa dissertação buscou explorar o contexto de dor no rato toupeira pelado, após estudos chamarem a atenção sobre a ausência desse fenômeno nesse organismo, com indícios sobre características moleculares que envolvem as proteínas TrkA e TRPV1 (OMERBAŠIĆ et al., 2016). O rato toupeira pelado é um organismo

modelo para estudo de envelhecimento, e apresenta características marcantes sobre sobrevivência em escassez de oxigênio e resistência a câncer (BUFFENSTEIN, 2005, 2008; LEWIS; RUBINSTEIN; BUFFENSTEIN, 2018). Ao analisar o comportamento desses roedores em relação a estímulos dolorosos em contextos de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica, surgiram evidências de que canais iônicos envolvidos no mecanismo de dor, incluindo-se ASICs e TRPV1, poderiam estar envolvidos nesse fenômeno de ausência de dor (PARK et al., 2008a; SCHUHMACHER; SMITH, 2016). Por fim, num estudo de 2016 ao analisar-se o funcionamento correto do TRPV1 de NMR, os pesquisadores investigaram elementos a montante na via de transdução de sinal e chegaram ao dado de que o domínio quinase da TrkA desse organismo possui mutações pontuais em resíduos de aminoácidos muito conservados em outros mamíferos (OMERBAŠIĆ et al., 2016). Isso serviu de hipótese para esse trabalho, em que uma investigação a nível molecular de ativação dessa proteína se fez necessária, incluindo-se os referidos aminoácidos como mutações na proteína de um organismo que transduz corretamente o sinal da dor. Nesse estudo investigamos o papel das mutações L775C e K728Q em rato, e a reversão C774L e Q727K em NMR.

A TrkA é uma proteína transmembranar, constituída de uma tirosina quinase acoplada ao receptor extracelular de alta afinidade por NGF. O fator de crescimento neural foi o primeiro fator de crescimento descrito por Rita Levi-Montalcini (Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1986). Pertence à classe das neurotrofinas, que compreende também BDNF, NT-3 e NT-4/5, e foi descoberto como um fator difusível que estimulava o crescimento neuronal a partir de tumores num contexto embrionário de galinhas (LEVI-MONTALCINI; HAMBURGER, 1953). Os fatores neurotróficos são secretados como proteínas precursoras, que possuem afinidade reduzida pelos respectivos receptores, porém aumentada por um receptor genérico (p75NTR) que se

associa a outros receptores determinando o destino celular (normalmente apoptose ao associar-se com sortilina) (KUMAR; MAHAL, 2012; ROUX; BARKER, 2002). Ao serem processados por convertases e serem clivados, os fatores neurotróficos maduros associam-se com maior afinidade aos receptores TrkA, TrkB e TrkC, respectivamente NGF, BDNF e NT-4/5, e NT-3 (HEFTI et al., 2006).

Nosso estudo é voltado diretamente pela função da TrkA, devido ao fato do domínio quinase dessa proteína em NMR ser ligeiramente diferente dos demais organismos. Com isso, esse trabalho tratou-se apenas de analisar as interações e ativações das vias relacionadas ao par TrkA/NGF. A TrkA foi identificada durante os primeiros estudos sobre oncogenes, sendo caracterizada como uma glicoproteína de massa 140kDa quando totalmente glicosilada, que possui atividade tirosina quinase e estava acoplada a uma sequência truncada de tropomiosina (MARTIN-ZANCA et al., 1989). A proteína possui sua total atividade quando está totalmente glicosilada devido a sua localização na membrana plasmática, podendo atuar como um receptor de fatores exógenos (MARTIN-ZANCA et al., 1989).

Com relação ao domínio quinase, ao ser ativado por seu receptor, a TrkA promove a fosforilação dos resíduos tirosina 490, 674/675, 751 e 785 (posições relativas à proteína humana), criando-se sítios de ancoragem pelos diversos substratos (SHC, PI3K e PLC γ nas posições 490, 751 e 785, respectivamente) (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003). Até então havia sido estudada a ativação da TrkA em NMR através da fosforilação dos resíduos Y674/675 e Y490, para investigação da auto-ativação da TrkA e da via de ERK (a jusante de SHC) (OMERBAŠIĆ et al., 2016). Esse trabalho buscou investigar todos os sítios que estão envolvidos nas vias, para ter um entendimento claro se a mutação desses resíduos afeta alguma via específica ou as interações como um todo.

Outro componente molecular importante da via, como já descrito, é o TRPV1, um canal iônico que ao ser ativado permite o influxo de cátions e despolariza o nociceptor, levando-se à sensibilização da dor (CHUNG; JUNG; OH, 2011; HEFTI et al., 2006). O TRPV1 possui uma ativação direta, causada pela capsaicina, acidez e temperatura elevada, além de uma ativação indireta causada por espécies moleculares presentes na via da TrkA, destacando-se segundos mensageiros da PKC ou a própria mudança na composição lipídica (clivagem do inibidor basal PIP2), após atividade lipase de PLC γ (CHUANG et al., 2001). As vias que iniciam-se pela ancoragem de SHC e PLC γ levam a ativação da PKC, sendo importante além do estudo da lipase, também o estudo de ERK, uma proteína mais a jusante de SHC. Isso evidencia a importância do estudo não só da auto ativação da TrkA (tirosinas 490, 674/675, 751 e 785), como também da ativação dos substratos.

Com isso nossa estratégia foi, além de analisar o padrão de ativação por fosforilação da TrkA com dois métodos de imuno-ensaio (*In-Cell* e *Western blot*), também da PLC γ e ERK. Além dos ensaios de ativação por modificação pós traducional, buscamos uma estratégia que demonstrasse, pela translocação para a membrana de PKC β , analisar sua ativação via NGF/TrkA.

As construções de mutantes (representadas na Tabela 5.1) foram geradas a partir de mutagênese sítio-dirigida utilizando-se como molde DNAs que contém os genes NTRK1 de rato e uma construção quimérica constituída da porção extracelular de rato e transmembranar e quinase de NMR (OMERBASIC et al., 2016). Essa proteína quimérica garante que os efeitos de atividade observados pela TrkA são decorrentes apenas de mudanças do domínio quinase, e não por variação na afinidade pelo agonista.

Rato	NMR	Tipo de Alteração
Leu775	Cys774	Apolar/Polar
Lys728	Gln727	Básico/Polar

Tabela 5.1. Destaque da natureza das mutações estudadas no trabalho.

Tomamos como ponto de partida a construção da mutação L775C devido à natureza química do aminoácido cisteína que está presente em NMR e não nos demais organismos. Acreditamos que isso poderia conferir uma interação a mais na TrkA de NMR de maneira intramolecular ou com alguma outra proteína, o que afetaria a atividade do nosso objeto de estudo. Utilizamos a metodologia de SDS-PAGE com amostras não reduzidas e com o inibidor de *crosslink* via cisteína o reagente NEM (LEI; CHEN; MERCADÉ -PRIETO, 2016). Com isso, espera-se observar as proteínas totalmente desnaturadas no gel redutor pela ação do β -mercaptoetanol, e possíveis dímeros ou *crosslinks* mantidos através de pontes dissulfeto no não redutor. A alquilação irreversível promovida por NEM em grupos tiois livres garante que as interações existentes nas amostras não redutoras são apenas fruto de *crosslink* no contexto natural da proteína. Nosso resultado ao realizar esse experimento mostra que não houve mudança no tamanho das bandas observadas em relação ao controle de amostras reduzidas, sugerindo que não houve interações exclusivas das construções que possuem a cisteína.

Para conferir a expressão da proteína nas células HEK293 utilizadas no estudo além de *Western blot*, realizamos um ensaio de imunofluorescência em que pudemos observar a localização do sinal relativo à TrkA na região membranar das células que foram transfectadas. As células controle que não expressam TrkA não foram marcadas, e em comparação com a marcação nuclear (DAPI), pudemos concluir que

nosso sistema foi montado corretamente, e podemos ter a TrkA expressa nessas células em sua forma mais próxima do natural.

Para termos pistas sobre a ativação das vias, testamos uma metodologia que observa através da translocação de PKC para a membrana, a sua ativação. Inicialmente, utilizando um microscópio de fluorescência, testamos o funcionamento dessa metodologia ativando células HEK293 que foram transfectadas transientemente com PKC β -GFP após ativação com PMA. Com o sucesso desse experimento pudemos utilizar essa sonda como ferramenta para analisar o funcionamento do nosso sistema, a partir da ativação da TrkA por NGF. Para obter-se uma resolução melhor e realizar uma possível cinética de ativação da via, utilizamos a microscopia TIRF, que permite analisar em tempo real a variação da fluorescência na célula após ativação. Com isso pudemos observar que a translocação de PKC para a membrana ocorreu num tempo de até 10 minutos utilizando-se NGF em uma linhagem que expressa TrkA de rato, e não ocorreu em uma linhagem que expressa TrkA de NMR nesse mesmo período. Isso corrobora dados da hipofuncionalidade da TrkA de NMR já reportado por *western blot* (OMERBAŠIĆ et al., 2016).

Em seguida, através de análises de *Western blot* pudemos analisar a ativação da TrkA a partir da fosforilação das tirosinas em seu domínio quinase. Iniciamos com o método *in-cell* por ser potencialmente mais fácil de quantificar em um modelo de ativação ou inibição diretamente nas células aderentes fixadas pós tratamento (PANDRE et al., 2018). Como o modelo celular utilizado consiste de células (HEK293) que perdem adesão muito fácil e o método *in-cell* consiste de vários tratamentos e pipetagens, julgamos não ser totalmente confiável para o presente estudo. No entanto, o resultado obtido pode fornecer uma noção inicial de que duas mutações na TrkA de

rato (L775C e K728Q) alteram ligeiramente a ativação da proteína a nível de fosforilações nas tirosinas 674/675 e 785.

Devido às restrições encontradas no método *in-cell*, seguimos analisando através de *Western blot* tradicional as fosforilações de auto ativação da TrkA. Trabalhando inicialmente com linhagens, tivemos um problema de expressão muito mais elevada da construção quimérica frente à construção de TrkA de rato e o mutante rato L775C. Para conferência acerca da composição genética do plasmídeo fornecido, sequenciamos as regiões dos ditos promotores pUC e CMV e identificamos que os genes estão inseridos no mesmo *backbone*, que contém os mesmo promotores. Com isso, a estratégia foi de abolir o uso de linhagens para experimentos de *Western blot* e utilizar apenas transfecção transiente.

Os resultados obtidos tanto analisando-se linhagens e posteriormente as construções com transfecção transiente, notamos uma sutil mudança na ativação da TrkA quando inserimos as mutações na TrkA de rato quando observamos as mutações isoladas. Uma hipótese que deve ser testada em continuidade do estudo é a combinação das mutações, talvez ao realizar o duplo mutante podemos observar um resultado mais conclusivo.

Para agregarmos mais variabilidade na análise do impacto das mutações, resolvemos utilizar ferramentas computacionais de modelagem, em que foi feita uma simulação de interação com a PLC γ , um substrato importante que abrange tanto TrkA quanto TRPV1. Foi concluído com essa análise que apenas a mutação de glutamina tem o potencial de causar uma mudança na ativação de PLC γ , sendo que na estrutura da TrkA esse resíduo localiza-se numa região de interação crítica com a lipase. Além da proximidade espacial da lisina (antes da mutação), a natureza química desse resíduo é muito importante na afinidade de ligação das duas proteínas. Na região em

que TrkA fosforila as tirosinas de seus substratos, estão presentes uma maior quantidade de aminoácidos ácidos, sendo necessária para uma energia mais favorável de *binding* a presença de aminoácidos básicos na própria TrkA. Como em NMR ocorre a mutação de um resíduo básico conservado (lisina) por uma glutamina (aminoácido polar com menor caráter básico), isso leva a uma menor afinidade para a realização da interação necessária.

Por fim, tendo em mente a importância da mutação lisina/glutamina, analisamos por ativação dos substratos (fosforilação de PLC γ e ERK) o impacto dessa mudança nas TrkA de rato e NMR. Novamente de maneira sutil pudemos obter uma diminuição da ativação de PLC γ e ERK quando efetuamos a troca de lisina por glutamina em rato, e observamos a reversão em NMR quando trocamos glutamina por lisina apenas em PLC γ . A análise da ativação de ERK constou-se reduzida tanto na mutação de rato quanto na reversão da quimera mutante. De fato Omerbasic e colaboradores (2016) observaram uma menor ativação da via da ERK na TrkA quimera (OMERBAŠIĆ et al., 2016), que pode ser indicativo de uma diminuição da fosforilação da Y490 e SHC ou da ativação da via da PLC γ pois ambas as vias levariam à ativação da ERK. Além disso, como vimos, a ativação da PKC pelo NGF é mais lenta mediada pela TrkA do NMR do que pela de rato. Isso também indica que a hipofuncionalidade da TrkA pode ser via a ativação da PLC γ .

Complementando-se, ao analisar modelagens em que ocorre a interação de dimerização da TrkA ou interação com PLC γ , inserindo-se a lisina em NMR mutante, podemos analisar dois pontos: a lisina pode interagir com um ácido glutâmico na cadeia lateral do outro monômero de TrkA e aumentar a afinidade (o que não ocorreria com tanta estabilidade se houvesse a glutamina selvagem); a região de interação da

vermelho, a porção que corresponde à estrutura transmembranar contida no éxon 11; e azul, intracelular. Os retângulos vermelhos indicam resíduos que são mutantes apenas em NMR. * início da proteína exclusiva de NMR na construção quimera usada nesse trabalho, que está destacada também em sombreado avermelhado.

Ao analisar o alinhamento, dentre os aminoácidos destacados que são exclusivos do NMR, os que realmente poderiam gerar algum impacto seriam as trocas S398P, D408H, T481A e D501N, devido à mudança importante no caráter bioquímico de suas cadeias laterais. As duas primeiras ocorrem na porção extracelular e as duas últimas na porção intracelular que antecede o domínio quinase. Essas mutações poderiam interferir e colaborar para uma mudança de função da proteína e devem ser objeto de estudo no futuro. Nossas construções contém os domínios transmembranar seja de Rato na TrkA de rato ou do NMR da TrkA quimera, o que deve ser considerado para estudos subsequentes.

É extremamente importante elucidar os mecanismos de ativação ou interação com substratos da TrkA, visto que sua terapêutica na dor pode ser promissora. Terapias baseadas no antagonismo de NGF já são descritas com poder analgésico, porém ao bloquear-se o fator neurotrófico em si pode-se comprometer seu papel na manutenção do sistema nervoso, não apenas no contexto de dor. A investigação da TrkA como alvo terapêutico pode sanar esse problema, permitindo-se a ativação por NGF, mas interferindo-se em interações específicas da quinase. Como ela possui vários sítios e substratos possíveis, cada um pode ser analisado de uma vez, sem causar maiores danos a vias não relacionadas a dor.

Concluo, portanto, salientando que essa pesquisa pode facilitar na busca do desenvolvimento de novos analgésicos não opioides, investigando-se o potencial papel da TrkA como *drug lead*. As análises moleculares presentes nesse trabalho dão

um passo inicial guiando-se para o entendimento dos papéis de aminoácidos específicos, baseado na insensibilidade à dor do NMR, que podem interferir na estrutura e interações da TrkA com demais proteínas influenciando seu papel fisiológico.

6. Conclusões

O objetivo principal dessa dissertação foi identificar as mutações pontuais que levam à uma hipofuncionalidade da TrkA do NMR. No total encontramos quatro resíduos de aminoácidos diferentes no domínio quinase da TrkA de NMR em comparação com demais mamíferos que apresentam significativa conservação.

A primeira hipótese foi de que o resíduo de cisteína, presente exclusivamente em NMR, poderia interferir no papel de quinase por interações proteína-proteína inexistentes em organismos sem esse aminoácido. Sem sucesso na resolução dessa hipótese pela ausência de quaisquer espécies que interagem num contexto não redutor, buscamos analisar o padrão de auto-ativação nos resíduos tirosinas que ativam a TrkA.

Os resultados relacionados a auto-ativação não indicaram mudanças significativas quanto à mutação em rato L775C. Isso levou à necessidade de uma busca mais robusta para dar continuidade aos estudos com outra mutação. Um estudo por modelagem indicou que a mutação em rato K728Q geraria um impacto na interação de TrkA com um dos seus substratos, a PLC γ .

Com isso, ao realizar *Western blot* para verificação de ativação dos substratos através de suas fosforilações pudemos notar uma discreta redução na ativação de PLC γ e de ERK, e uma reversão em PLC γ quando se troca a glutamina de NMR pela lisina.

Também pudemos investigar por translocação da PKC β -GFP para a membrana após ativação com NGF em células que expressam TrkA exógena, que a TrkA de rato possui uma cinética de ativação mais rápida comparando-se com a de NMR. Esse

resultado corrobora os encontrados em *Western blot*, em que a ativação da quimera também apresenta-se reduzida em comparação com a de rato.

Com relação ao que já está sendo investigado no que diz respeito ao NMR, pudemos nos aprofundar no entendimento da ativação da TrkA desse organismo através do padrão de fosforilação de todas as tirosinas-chave da proteína. Corroboramos os achados de Omerbasic e colaboradores a respeito da redução de fosforilação de quimera nos sítios 674/675 e 490 e nos aprofundamos nas Y751 e Y785. Além disso fomos além na investigação dos mutantes e também de vias a jusante da TrkA.

Acreditamos, por fim, que haja um impacto bioquímico a presença dessas mutações combinadas, e não isoladas, ou do domínio transmembranar, podendo levar a mudanças conformacionais na proteína e interferindo no seu papel enzimático. Compreendendo-se estrutural e bioquimicamente o que inibe a atividade da TrkA do NMR poderá nos auxiliar a desenvolver novos analgésicos não opioides, deixando em evidencia a importância da TrkA como um potencial *drug lead* nessa área.

7. Bibliografia

AHLUWALIA, A. et al. Nerve growth factor is critical requirement for in vitro angiogenesis in gastric endothelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 311, p. 981–987, 2016.

AHMED, F.; HRISTOVA, K. Dimerization of the Trk receptors in the plasma membrane: effects of their cognate ligands. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 22, p. 3669–3685, 2018.

ALOE, L. et al. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 35, n. 3, p. 351–5, mar. 1992.

AMADESI, S. et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C epsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. **J Physiol**, p. 555–71, 2006.

AMADESI, S. et al. Protein kinase D isoforms are expressed in rat and mouse primary sensory neurons and are activated by agonists of protease-activated receptor 2. **Journal of Comparative Neurology**, v. 516, n. 2, p. 141–156, 10 set. 2009.

BONNINGTON, J. K.; MCNAUGHTON, P. A. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. **The Journal of Physiology**, v. 551, n. 2, p. 433–446, 1 set. 2003.

BUFFENSTEIN, R. The Naked Mole-Rat: A New Long-Living Model for Human Aging Research. **Journal of Gerontology**, v. 60A, n. 11, p. 1369–1377, 2005.

BUFFENSTEIN, R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: Insights from a successfully aging species. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 178, n. 4, p. 439–445, 2008.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306–313, 14 abr. 2000.

CDC. **Opioid Data Analysis and Resources**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/drugoverdose/data/analysis.html>>. Acesso em: 22 maio. 2020.

CHUANG, H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 957–962, 21 jun. 2001.

CHUNG, M. K.; JUNG, S. J.; OH, S. B. **Role of TRP channels in pain sensation**. Advances in Experimental Medicine and Biology. **Anais...**2011Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-0265-3_33>. Acesso em: 21 maio. 2020

COHEN, S. PURIFICATION OF A NERVE-GROWTH PROMOTING PROTEIN FROM THE MOUSE SALIVARY GLAND AND ITS NEURO-CYTOTOXIC ANTISERUM. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 46, n. 3, p. 302–311, 1 mar. 1960.

DAVIS, J. B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 183–187, 11 maio 2000.

DELGADO, J. et al. FoldX 5.0: working with RNA, small molecules and a new graphical interface. **Bioinformatics**, v. 35, n. 20, p. 4168–4169, 2019.

DELLA SETA, D. et al. NGF effects on hot plate behaviors in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 49, n. 3, p. 701–5, nov. 1994.

DEWEERDT, S. OPIOIDS OUTLOOK: The natural history of an epidemic. **Nature**, p. S10–S12, 2019.

DIKIC, I. et al. Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 25, p. 15125–9, 23 jun. 1995.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 1 nov. 2010.

DUNN, K. M. et al. Opioid Prescriptions for Chronic Pain and Overdose. **Annals of Internal Medicine**, v. 152, n. 2, p. 85, 19 jan. 2010.

DYCK, P. J. et al. Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans. **Neurology**, v. 48, n. 2, p. 501–5, fev. 1997.

EIGENBROD, O. et al. Rapid molecular evolution of pain insensitivity in multiple African rodents. **Science**, v. 364, p. 852–859, 2019.

FRANCO, M. L. et al. Structural basis of the transmembrane domain dimerization and rotation in the activation mechanism of the TRKA receptor by nerve growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, 2019.

FRIEDMAN, W. J.; GREENE, L. A. Neurotrophin Signaling via Trks and p75. **Experimental Cell Research**, v. 253, n. 1, p. 131–142, nov. 1999.

HALLIDAY, D. A. et al. Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease. **Neurochemical research**, v. 23, n. 6, p. 919–22, jun. 1998.

HEFTI, F. F. et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 85–91, fev. 2006.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 609–642, 28 jun. 2003.

IASP. **IASP Terminology**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576>>. Acesso em: 4 mar. 2020.

INDO, Y. Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): Mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. **Human Mutation**, v. 18, n. 6, p. 462–471, 2001.

IVANISEVIC, L.; SARAGOVI, H. U. Neurotrophins. In: **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 1639–1646.

JI, R. R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57–68, 26 set. 2002.

KRIEGER, E.; VRIEND, G. YASARA View - Molecular Graphics for All Devices - From Smartphones to Workstations. **Bioinformatics**, v. 30, n. 20, p. 2981–2982, 2014.

KUMAR, V.; MAHAL. NGF - The TrkA to successful pain treatment. **Journal of Pain**

Research, p. 279, ago. 2012.

LEI, Z.; CHEN, X. D.; MERCADÉ -PRIETO, R. Effect of N-Ethylmaleimide as a Blocker of Disulfide Crosslinks Formation on the Alkali-Cold Gelation of Whey Proteins. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. 1–18, 2016.

LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. **Journal of Experimental Zoology**, v. 123, n. 2, p. 233–287, jul. 1953.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. **TRP channels: Targets for the relief of pain***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, ago. 2007.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443907000324>>.

Acesso em: 21 maio. 2020

LEWIN, G. R.; LECHNER, S. G.; SMITH, E. S. J. Nerve Growth Factor and Nociception: From Experimental Embryology to New Analgesic Therapy. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 251–282.

LEWIN, G. R.; RUEFF, A.; MENDELL, L. M. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. **The European journal of neuroscience**, v. 6, n. 12, p. 1903–12, 1 dez. 1994.

LEWIS, K. N. et al. The Naked Mole-Rat Response to Oxidative Stress: Just Deal with It. **Antioxid. Redox Signal**, v. 19, n. 12, p. 1388–1399, 2013.

LEWIS, K. N. et al. Unraveling the message: insights into comparative genomics of the naked mole-rat. **Mammalian genome**, n. 27, p. 259–278, 2016.

LEWIS, K. N.; RUBINSTEIN, N. D.; BUFFENSTEIN, R. A window into extreme longevity; the circulating metabolomic signature of the naked mole-rat, a mammal that shows negligible senescence. **GeroScience**, n. 40, p. 105–121, 2018.

LIANG, S. et al. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). **Ageing Cell**, v. 9, n. 4, p. 626–635, 2010.

LOMEN-HOERTH, C.; SHOOTER, E. M. Widespread Neurotrophin Receptor Expression in the Immune System and Other Nonneuronal Rat Tissues. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 4, p. 1780–1789, 23 nov. 1995.

- LOUW, A.; NIJS, J.; PUENTEDURA, E. J. A clinical perspective on a pain neuroscience education approach to manual therapy. **Journal of Manual and Manipulative Therapy**, v. 25, n. 3, p. 160–168, 27 maio 2017.
- LOWE, E. M. et al. Increased nerve growth factor levels in the urinary bladder of women with idiopathic sensory urgency and interstitial cystitis. **British journal of urology**, v. 79, n. 4, p. 572–7, abr. 1997.
- LUBERG, K. et al. Novel transcripts reveal a complex structure of the human TRKA gene and imply the presence of multiple protein isoforms. **BMC Neurosci**, v. 16, p. 78, 2015.
- MARTIN-ZANCA, D. et al. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 1, p. 24–33, jan. 1989.
- MARTIN-ZANCA, D.; HUGHES, S. H.; BARBACID, M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. **Nature**, v. 319, n. 6056, p. 743–748, 1986.
- OBERMEIER, A. et al. Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 31, p. 22963–6, 5 nov. 1993.
- ODDIAH, D. et al. Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder. **Neuroreport**, v. 9, n. 7, p. 1455–8, 11 maio 1998.
- OMERBAŠIĆ, D. et al. Hypofunctional TrkA Accounts for the Absence of Pain Sensitization in the African Naked Mole-Rat. **Cell reports**, v. 17, n. 3, p. 748–758, 2016.
- PANDRE, M. K. et al. A novel in-cell ELISA method for screening of compounds inhibiting TRKA phosphorylation, using KM12 cell line harboring TRKA rearrangement. **Analytical Biochemistry**, v. 545, p. 78–83, 15 mar. 2018.
- PAREEK, T. K. et al. Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 2, p. 660–665, 9 jan. 2007.
- PARK, T. J. et al. Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-

rat (*Heterocephalus glaber*). **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 0156–0170, jan. 2008a.

PARK, T. J. et al. Selective Inflammatory Pain Insensitivity in the African Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber*). **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. e13, 29 jan. 2008b.

PÉREZ, P. et al. NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 97–105, abr. 1995.

RAFFIONI, S.; BRADSHAW, R. A. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9121–9125, 1 out. 1992.

RODRIGUEZ, T. **Redefining the Way Chronic Pain Is Categorized**. Disponível em: <<https://www.rheumatologyadvisor.com/home/topics/pain-management/changing-the-way-chronic-pain-is-categorized/>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

ROUX, P. P.; BARKER, P. A. **Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor****Progress in Neurobiology**Prog Neurobiol, , 2002.

RUBY, J. G.; SMITH, M.; BUFFENSTEIN, R. Naked mole-rat mortality rates defy Gompertzian laws by not increasing with age. **eLife**, n. 7, p. 1–18, 2018.

SARCHIELLI, P. et al. Levels of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients. **Neurology**, v. 57, n. 1, p. 132–4, 10 jul. 2001.

SBED. **CAMPANHA NACIONAL PELO TRATAMENTO E CONTROLE DA DOR AGUDA E CRÔNICA**. Disponível em: <<https://sbed.org.br/wp-content/uploads/2019/01/CAMPANHA-NACIONAL-PELO-TRATAMENTO-E-CONTROLE-DA-DOR-AGUDA-E-CRÔNICA-3-MB.pdf>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

SCHECHTMAN, D. et al. A Critical Intramolecular Interaction for Protein Kinase C ϵ Translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 16, p. 15831–15840, 16 abr. 2004.

SCHUHMACHER, L.-N.; SMITH, E. S. J. Expression of acid-sensing ion channels and selection of reference genes in mouse and naked mole rat. **Molecular Brain**, v. 9, n. 97, p. 1–12, 2016.

SELUANOV, A. et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 46, p. 19352–19357, 2009.

SHI, H. et al. Nerve growth factor and Tropomyosin receptor kinase A are increased in the gastric mucosa of patients with functional dyspepsia. **BMC Gastroenterology**, v. 19, n. 221, p. 1–8, 2019.

SHIBAYAMA, E.; KOIZUMI, H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. **American Journal of Pathology**, v. 148, n. 6, p. 1807–1818, 1996.

TENG, K. K. et al. Understanding Proneurotrophin Actions: Recent Advances and Challenges. **Developmental neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 350–359, 2010.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS. **Tissue expression of NTRK1 - Summary.**

Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198400-NTRK1/tissue>>.

Acesso em: 17 jun. 2020.

ULTSCH, M. H. et al. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. **Journal of Molecular Biology**, v. 290, n. 1, p. 149–159, 2 jul. 1999.

VETTER, M. L. et al. Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 13, p. 5650–5654, 1 jul. 1991.

ZHU, W.; OXFORD, G. S. Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 34, n. 4, p. 689–700, abr. 2007.

ZHUANG, Z. Y. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 38, p. 8300–8309, 22 set. 2004.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais:

Nome: Allan Pradelli Roldão

Local e data de nascimento: Araraquara, SP, 08/12/1992

EDUCAÇÃO:

Externato Santa Terezinha, Araraquara, SP, 2010

Ensino Médio

Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Araraquara, SP, 2017

Licenciado em Química

Angelo State University, San Angelo, TX, EUA, 2015

Bolsista CAPES Ciência sem Fronteiras – Graduação Sanduíche (Junho 2014 –
Maio 2015)

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2020

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

Biocatálise: Química a Serviço da Sustentabilidade. (Carga horária: 30h). Instituto de
Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2015

IV Curso de Inverno em Dor e Sinalização Celular. (Carga horária: 40h). Instituto Butantan, São Paulo, SP, 2019

OCUPAÇÃO:

Bolsista de Mestrado, CAPES, Novembro 2017 – Outubro 2019

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. ROLDÃO, A. P.; BERTOLINI, M. C. ; AMBRÓSIO, D. L. . Obtenção de linhagens de *Neurospora crassa* que expressem FLB-3 e RUV-1 fusionadas com PTP-tag para a purificação de complexos proteicos. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2016, Araraquara. Anais do XXVIII CIC, 2016.

2. PACHIEGA, R. ; MAINTINGUER, S. I. ; SEQUINEL, R. ; OLIVEIRA, J. E. ; ROLDÃO, A. P. . Obtenção de consórcios bacterianos produtores de H₂ a partir de inóculo de sistema de tratamento industrial. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2013, Araraquara. Anais do XXV CIC, 2016.

3. ROLDÃO, A. P.; MAINTINGUER, S. I. ; PACHIEGA, R. ; SEQUINEL, R. ; OLIVEIRA, J. E. . Aplicação de inóculos provenientes de sistemas biológicos de tratamento na geração de H₂. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2013, Araraquara. Anais do XXV CIC, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos

1. AMBRÓSIO, D. L. ; **ROLDÃO, A. P.** ; BERTOLINI, M. C. . Establishment of the PTP-tag purification protocol for the identification of *Neurospora crassa* protein complexes. In: VII Proteomics Workshop, 2016, Campinas. Abstract Book, 2016, 2016.