

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BRUNO EDUARDO GABRIEL DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TLR4 NA NOCICEPÇÃO
INDUZIDA POR PEPTIDEOS DA PORÇÃO SPIKE DA SARVS-COV2 EM
CAMUNDONGOS**

**ALFENAS-MG
2024**

BRUNO EDUARDO GABRIEL DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TLR4 NA NOCICEPÇÃO
INDUZIDA POR PEPTIDEOS DA PORÇÃO *SPIKE* DA SARVS-COV2 EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas, *campus* Alfenas, Minas Gerais. Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza.

ALFENAS-MG
2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Unidade Educacional Santa Clara

Gabriel da Silva, Bruno Eduardo.

Avaliação da participação dos receptores TLR4 na nocicepção induzida por peptídeos da porção spike da sars-cov 2 em camundongos : Estudo exploratório / Bruno Eduardo Gabriel da Silva. - Alfenas, MG, 2024.

69 f. : il. -

Orientador(a): Giovane Galdino de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. COVID-19. 2. Dor. 3. Proteína spike. 4. SARS-CoV 2. I. de Souza, Giovane Galdino, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

BRUNO EDUARDO GABRIEL DA SILVA

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TLR4 NA NOCICEPÇÃO
INDUZIDA POR PEPTÍDEOS DA PORÇÃO SPIKE DA SARVS-COV2 EM
CAMUNDONGOS

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 08 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Flavio Protasio Veras

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 08/02/2024, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1184825** e o código CRC **E601CE5E**.

A Deus toda honra e glória!

AGRADECIMENTOS

Nada na vida é por acaso e tudo serve de aprendizado! Com esta frase de efeito que sempre ouvi na minha mente e carrego no fundo da alma dou início aos meus agradecimentos neste breve texto no qual tentarei expressar em palavras as emoções e sentimentos que a pós-graduação me proporcionou.

Assim como tudo que fiz, faço e farei na vida, coloco sempre Deus em primeiro lugar e desta vez não seria diferente, pois sem Ele nada disso seria possível! Obrigado Senhor por me amparar sempre e por guiar os meus passos quando caminhei por caminhos obscuros! A Ti consagro a minha vida e minhas conquistas!

Na terra, a minha gratidão eterna será sempre à minha família que, apesar dos pesares, nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor educação que pudessem! A minha dedicação especial aos meus pais, Leila e Luiz. Minha mãe por sempre rezar por mim, por ser abrigo nas tempestades e brisa suave na calmaria, obrigado, minha Rainha. Meu pai por ser exemplo de dedicação, honra e proteção, pois me ensinou a sempre dar a vida pelos seus, independente das consequências, obrigado meu Herói. Meu irmão Felipe que nunca foi “fã” dos estudos, mas se tornou um doutor na vida e sempre me apoiou em todas as minhas decisões, me chamou a atenção quando precisei e não pensou duas vezes para me emprestar o seu “mini” notebook quando disse que queria estudar para o processo seletivo do mestrado. Aos meus avós pelas poucas, mas muito fortes palavras de incentivo, minha vó Nilce por sempre me abençoar e rezar por mim quando dizia que estava indo estudar. A todos vocês dedico a minha vida e tudo o que sou!

Não cabe a mim tentar entender o destino assim como os planos de Deus na minha vida, mas Ele jamais faz a sua obra pela metade. E por isso completou a minha vida me fazendo encontrar alguém, inexplicavelmente, incrível! Minha namorada Aline, a quem agradeço todos os dias por me fazer uma pessoa melhor, por me abrir os olhos em muitas situações, por ser o meu ponto de equilíbrio nas horas incertas, pelos puxões de orelha, conselhos, paciência e acima de tudo amor! Obrigado por ser tão especial e por fazer parte da minha vida, Paixão.

Além de tudo o que passou nestes anos, o que levo no coração são as amizades que fiz no laboratório e na UNIFAL. Pessoas espetaculares, inteligentes, alegres e sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso. Obrigado sempre lago,

Thamyris, Lívia, Gabriela e Fernanda. Tudo que aprendi neste tempo devo a vocês. Agradeço por todos os conselhos e auxílios!

Não poderia deixar de agradecer ao Professor Leandro que, na graduação, fez despertar o meu interesse pela fisiologia com suas explicações simples, porém didáticas e com um conteúdo inestimável.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Giovane Galdino de Souza, que me deu a oportunidade de conhecer, verdadeiramente, o que é ciência o quão importante ela é para a humanidade.

Aos bons colegas que sempre me apoiaram, me incentivaram e mandaram boas energias. Mesmo sendo clichê, nada disso seria possível sem vocês!

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

RESUMO

O coronavírus 2019 (COVID-19) é uma doença infecciosa altamente transmissível causada pela síndrome aguda respiratória grave coronavírus 2 (SARS-CoV 2) e tem causado graves problemas na saúde, economia e desenvolvimento dos países mundo afora levando, em casos extremos, à morte de milhares de pessoas. Sugere-se que a inflamação causada pela infecção possa desempenhar um importante papel no desenvolvimento da dor durante o período de incubação do vírus. Várias estruturas estão envolvidas na modulação dessa dor, por exemplo os neurônios e células da glia que, por sua vez, quando ativadas têm a capacidade de aumentar a expressão de receptores de ativação de vias intracelulares que culminam na liberação de mediadores pró-inflamatórios. A proteína Spike presente na superfície da subunidade S1 do vírus é responsável por se ligar ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE 2) e ativar a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) provocando a entrada do RNA viral na célula do hospedeiro. Assim também acontece com outros tipos de receptores, como por exemplo o Toll like receptor 4 (TLR4) que tem como função o reconhecimento de padrões moleculares associados a danos e patógenos (DAMPs e PAMPs). Deste modo, o presente estudo investigou a participação na nocicepção induzida pelos peptídeos (PSPD2001, PSPD2002 e PSPD2003) presentes na proteína spike da SARS-CoV-2). Os peptídeos foram sintetizados e doados em colaboração com o Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara-SP. Para tal, foram utilizados camundongos machos C57BL/6 e C57BL/6 TLR4(-/-) pesando entre 20 e 25g. Foi utilizado o aparato von Frey filamentos para avaliação do limiar nociceptivo. Para a indução da nocicepção, os peptídeos foram administrados via intratecal (i.t) e o limiar nociceptivo foi avaliado 1h, 3h, 5h, 7h e 24h após a injeção. A participação do TLR4 foi investigada usando o antagonista LPS-RS administrado via intratecal (i.t). Para avaliar a participação da micróglia foi utilizado o inibidor minociclina, também administrado via intratecal. O ensaio de Western Blott foi utilizado para avaliar os níveis proteicos de TLR4 assim como o ensaio de ELISA para avaliar os níveis de TNF- α e IL-1 β . Os resultados indicam a participação do TLR4 e micróglia na redução do limiar nociceptivo. O bloqueio do receptor TLR4 e a inibição da micróglia levou a reversão da nocicepção. Os resultados sugerem que os peptídeos da proteína Spike ativaram

o receptor TLR4, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para o desenvolvimento da dor.

Palavras-Chave: Covid-19; Dor; Proteína Spike; SARS-Cov 2.

ABSTRACT

Coronavirus 2019 (COVID-19) is a highly transmissible infectious disease induced by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and resulted in serious problems in the health, economy, and development of countries around the world, leading, in extreme cases, to death of thousands of people. It is suggested that inflammation caused by the infection may play a relevant role in the development of pain during the virus' period of incubation. Several structures are involved in modulating this pain, for example, neurons and glial cells, which, when triggered, can increase the expression of receptors that activate intracellular pathways that culminate in the release of pro-inflammatory mediators. The Spike protein present on the surface of the S1 subunit of the virus is responsible for binding to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE 2) receptor and activating the transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2), causing the viral RNA to enter the host cell. It also happens with other types of receptors, such as Toll-like receptor 4 (TLR4), whose function is to recognize molecular patterns associated with damage and pathogens (DAMPs and PAMPs). Therefore, the present study investigated the participation in nociception induced by peptides (PSPD2001, PSPD2002, and PSPD2003) present in the spike protein of SARS-CoV-2. The peptides were synthesized and donated in collaboration with the Department of Pharmacology at the University of São Paulo's Institute of Biomedical Sciences. Thus, we used male C57BL/6 and C57BL/6 TLR4(-/-) mice weighing between 20 and 25g. We applied the von Frey filament apparatus to assess the nociceptive threshold. For the induction of nociception, the peptides were administered intrathecally (i.t), and we evaluated the nociceptive threshold 1 hr, 3 hr, 5 hr, 7 hr, and 24 hr after injection. The involvement of TLR4 was investigated using the antagonist LPS-RS administered intrathecally (i.t). We used the inhibitor minocycline to evaluate the participation of microglia, and it was also administered intrathecally. The Western Blott assay was used to estimate the protein levels of TLR4, and the ELISA assay to evaluate the levels of TNF- α and IL-1 β . The results indicate the participation of TLR4 and microglia in reducing the nociceptive threshold. Blocking the TLR4 receptor and inhibiting microglia led to the reversal of nociception. The results suggest that Spike protein peptides activated the TLR4 receptor, increasing the levels of pro-inflammatory cytokines and contributing to the development of pain.

Keywords: Covid-19; Pain; SARS-COV-2; Spike Protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação das vias fisiológicas ascendente e descendente da dor	21
Figura 2 -	Efeitos da ativação da microglia e dos astrócitos na plasticidade sináptica	23
Figura 3 -	Modelo esquemático demonstrativo da SARS-CoV 2, proteína Spike e suas subunidades	24
Figura 4 -	Esquema simplificado demonstrando, resumidamente, duas possíveis vias de infecção pelo vírus da SARS-CoV 2 utilizando o receptor da ACE2 ou por endocitose	24
Figura 5 -	Visão geral das principais vias de sinalização do TLR4. O TLR4 pode ser ativado por LPS (PAMP clássico), DAMPs ou PAMPs virais	26
Figura 6 -	Modelos estruturais dos peptídeos (A) PSPD2001, (B) PSPD2002 e (C) PSPD2003, que foram sintetizados para o presente estudo	31
Figura 7 -	Imagem representativa do método de administração de substâncias via intratecal	33
Figura 8 -	Aparato utilizado para realização do teste de von Frey	35
Figura 9 -	Kit com os diferentes filamentos utilizado no Teste de von Frey	35
Figura 10 -	Modelo esquemático da administração dos peptídeos/veículo e avaliação do limiar nociceptivo demonstrado em horas. As linhas azuis verticais indicam as horas das avaliações após a administração dos peptídeos/veículo	37
Figura 11 -	Modelo esquemático da administração do LPS-RS e minociclina, peptídeos e avaliação do limiar nociceptivo demonstrado em horas. As linhas azuis verticais indicam as horas das avaliações após a administração dos peptídeos/veículo	37
Figura 12 -	Delineamento experimental para o ensaio de dosagem de citocinas pró-inflamatórias pelo ensaio de ELISA. Peptídeos: PSPD 2001, PSPD 2002 e PSPD 2003	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Avaliação do efeito da administração intratecal do peptídeo 1 nas doses (25ng) e (50ng).	43
Gráfico 2 -	Avaliação da participação do TLR4 na alodínia mecânica induzida pelo PSPD 2001 (50ng) através da injeção i.t. do antagonista LPS-RS (4ug) (A) e avaliação do limiar nociceptivo de animais TLR4-/- tratados com PSPD 2001 (50ng) (B)	45
Gráfico 3 -	Avaliação do envolvimento da micróglia pela administração i.t. do inibidor (minociclina 10ug) 30 minutos antes do tratamento com o peptídeo na dose de 50ng	46
Gráfico 4 -	Avaliação do efeito da administração intratecal do peptídeo 2 nas doses (25ng) e (50ng)	47
Gráfico 5 -	Avaliação da participação do TLR4 na alodínia mecânica induzida pelo PSPD 2002 (50ng) através da injeção i.t. do antagonista LPS-RS (4ug) (A) e avaliação do limiar nociceptivo de animais TLR4-/- tratados com PSPD 2002 (50ng) (B)	49
Gráfico 6 -	Avaliação do envolvimento da micróglia espinal pela administração i.t. do inibidor (minociclina 10ug) 30 minutos antes do tratamento com o peptídeo na dose de 50ng	50
Gráfico 7 -	Avaliação do efeito da administração intratecal do peptídeo 3 (PSPD 2003) nas doses (25ng) e (50ng)	51
Gráfico 8 -	Avaliação da participação do TLR4 na alodínia mecânica induzida pelo PSPD 2003 (50ng) através da injeção i.t. do antagonista LPS-RS (4ug) (A) e avaliação do limiar nociceptivo de animais TLR4-/- tratados com PSPD 2003 (50ng) (B)	53
Gráfico 9 -	Avaliação do envolvimento da micróglia espinal pela administração i.t. do inibidor (minociclina 10ug) 30 minutos antes do tratamento com o peptídeo na dose de 50ng	54
Gráfico 10 -	Avaliação da expressão gênica do receptor TLR4 na medula espinhal durante a alodínia mecânica induzida pelos peptídeos ...	55

Gráfico 11 - Avaliação do nível da citocina pró-inflamatória IL-1 β na medula espinhal durante a nocicepção induzida pelos peptídeos	56
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos genes.....	40
-------------------------------------	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
2.2	CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA.....	22
2.3	SARS-COV 2 E DOR	23
2.4	RECEPTOR TLR4.....	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	ANIMAIS PARA EXPERIMENTAÇÃO	29
4.2	DROGAS UTILIZADAS NO ESTUDO	29
4.3	SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARCATERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	29
4.3.1	Síntese.....	29
4.3.2	Clivagem.....	30
4.3.3	Purificação.....	31
4.3.4	Caracterização.....	32
4.3.5	Alinhamento dos Peptídeos.....	32
4.4	VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.....	33
4.4.1	Via intratecal	33
4.5	INDUÇÃO DA NOCICEPÇÃO PELOS PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA SPIKE.....	34
4.6	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO	34
4.7	DELINEAMENTO DOS ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	36
4.8	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TLR4 NA PRODUÇÃO DA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA IL-1B DURANTE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELOS PEPTÍDEOS DA PORÇÃO SPIKE.....	38

4.9	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RNAM PELA TÉCNICA DE RT-PCR	39
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	42
5.1	AVALIAÇÃO NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELOS PEPTÍDEOS DA SPIKE.....	42
5.1.1	PSPD 2001 (25ng) e (50 ng)	42
5.1.2	PSPD 2001: Avaliação da participação do receptor TLR4 espinhal.....	43
5.1.3	PSPD 2001: Participação da micróglia espinhal na nocicepção induzida pelo peptídeo.....	46
5.1.4	PSPD 2002 (25ng) e (50ng).....	47
5.1.5	PSPD 2002: Avaliação da participação espinhal do receptor TLR4..	48
5.1.6	PSPD 2002: Participação da micróglia espinhal na nocicepção induzida pelo peptídeo.....	50
5.1.7	PSPD 2003 (25ng) e (50ng).....	51
5.1.8	PSPD 2003: Avaliação da participação do receptor TLR4 espinhal.....	52
5.1.9	PSPD 2003: Participação de microglia espinal na nocicepção induzida pelo peptídeo.....	54
5.2	ENVOLVIMENTO DE GENE RELACIONADO AO RECEPTOR TLR4 ESPINHAL DURANTE A NOCICEPÇÃO.....	55
5.3	VALIAÇÃO DO NÍVEL ESPINHAL DA CITOCINA IL-1B DURANTE A NOCICEPÇÃO.....	56
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO I	69

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do mês de dezembro de 2019, milhões de pessoas no mundo têm sido afetadas pela patologia descrita como doença do coronavírus 2019 (do inglês *coronavirus disease 2019*, COVID-19) (Liu *et al.*, 2020). Posteriormente, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) designou oficialmente o vírus como SARS-CoV-2 com base na filogenia, taxonomia e prática estabelecida, onde foi verificado por meio de uma análise completa do genoma viral revela que o vírus compartilha 88% de identidade de sequência com dois coronavírus do tipo síndrome respiratória aguda grave (SARS) derivados do morcego, porém com uma menor semelhança ao coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) (ICTV, 2020).

De acordo com a *Oxfam International*, cerca de 500 milhões de pessoas podem sucumbir à pobreza em decorrência do novo coronavírus (OI, 2020). As estimativas mais recentes sobre o status da pandemia no mundo registram mais de 40 milhões de casos confirmados e mais de um milhão de mortes no mundo todo (ECDC, 2020).

Os principais sintomas relatados pela maioria dos pacientes com COVID-19 incluem: febre, tosse, mialgia, coriza, evoluindo para dor de cabeça e dispneia (Li *et al.*, 2020). Em casos mais graves, essa patologia pode evoluir para insuficiência respiratória associada à pneumonia viral (Li *et al.*, 2020). Nesta situação há redução na saturação de oxigênio e alterações visíveis à tomografia computadorizada de pulmão (alterações alveolares, cicatriciais pulmonares incipientes com estrias fibróticas, derrame pleural dentre outras) (Zhou *et al.*, 2020).

Todos esses sinais e sintomas são acompanhados da chamada “tempestade” de citocinas, uma resposta imunológica intensa quando o vírus atinge as células do nosso corpo (Velavan; Meyer, 2020). Tem-se o aumento de citocinas pro-inflamatórias com a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (do inglês TNF- α) que regulam a infiltração celular no tecido pulmonar com lesão pulmonar aguda (XIE *et al.*, 2020). Paralelamente, a febre alta é outra resposta a citocinas, pois estas atuam no hipotálamo e induzem as células endoteliais locais ou as células microgliais a secretarem a prostaglandina E₂ (PGE₂) (Steinman, 2008). A PGE₂ por sua vez, irá atuar em um receptor específico que, no caso, é o do tipo 3 (EP3), situados em neurônios na área pré-óptica do hipotálamo, regulará a temperatura corporal (Steinman, 2008).

Outro sintoma bastante comum nos indivíduos com COVID-19 é a dor, principalmente muscular e articular, que na fase inicial é a principal queixa de incapacitação e incômodo relatada (Lovell *et al.*, 2020). Durante a infecção pela COVID-19, as citocinas pró-inflamatórias também contribuem diretamente para o desencadeamento da dor, tanto a nível periférico quanto a nível central. Periféricamente essas citocinas também estimulam a liberação de PGE₂ via macrófagos e monócitos, o quais iram sensibilizar os nociceptores ou elas agem diretamente neles, facilitando a despolarização do impulso nociceptivo até o sistema nervoso central (SNC) (Hopkins, 2003; Milligan; Watkins, 2009). A nível central, principalmente medular, as citocinas pró-inflamatórias podem estimular as células microgliais a liberarem uma gama de substâncias e neurotransmissores que irão facilitar a transmissão resposta nociceptiva (Milligan; Watkins, 2009).

SARS-CoV-2 é um vírus com envelope de RNA de fita simples, composto por genes S, E, M e N que codificam proteínas estruturais, enquanto proteínas não estruturais, como protease semelhante à 3-quimiotripsina, protease semelhante à papaína e RNA dependente de RNA polimerase, são codificados pela região descrita como ORF (Lu *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Além disso, um grande número de proteínas S glicosiladas cobrem a superfície do SARS-CoV-2 e se ligam ao receptor da célula hospedeira da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), mediando a entrada na célula viral (Letko *et al.*, 2020). Quando a proteína S se liga ao receptor TM protease serina 2 (TMPRSS2), uma TM serina protease tipo 2 localizada na membrana da célula hospedeira, promove a entrada do vírus na célula ativando a proteína S. Assim que o vírus entra na célula, o RNA viral é liberado, as poliproteínas são traduzidas do genoma do RNA e a replicação e a transcrição do genoma do RNA viral ocorrem por meio da clivagem da proteína e montagem do complexo replicase-transcriptase. O RNA viral é replicado e as proteínas estruturais são sintetizadas, montadas e empacotadas na célula hospedeira, após o que as partículas virais são liberadas (Fehr; Perlman, 2015).

Essas proteínas são críticas para o ciclo de vida viral e fornecem alvos potenciais para terapias medicamentosas. Por exemplo, o peptídeo baseado em ACE2, o inibidor 3CLpro (3CLpro-1) e um novo inibidor de protease de vinilsulfona demonstraram ser experimentalmente eficazes contra a SARS-CoV-2 (Morse *et al.*, 2020). A proteína SARS-CoV-2 S é altamente conservada entre todos os coronavírus

humanos (HCoV) e está envolvida no reconhecimento do receptor, ligação viral e entrada nas células hospedeiras (Morse *et al.*, 2020).

Um possível alvo relacionado à dor induzida pelo SARS-CoV-2 são os receptores *Toll-like* (do inglês, TLR). Os TLR são essenciais para orquestrar respostas inflamatórias de proteção e defesa do hospedeiro contra patógenos e dano tecidual (Kawai; Akira, 2007). Dentre a família dos TLR's, o TLR do tipo 4 (TLR4) tem sido amplamente descrito, principalmente devido ao seu papel de reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (do inglês DAMPs), que no caso são moléculas endógenas liberadas, principalmente durante lesão, necrose de células ativas ou infecção, conforme Kawai e Akira (2007), como no caso, podendo estar relacionado na infecção causada pela COVID-19.

Estudos já tem demonstrado o envolvimento do TLR4 tanto no curso da sepse e pneumonia quanto na liberação de citocinas pró-inflamatórias durante essas patologias. Nesse contexto, os TLR4 poderiam estar envolvidos nos principais sinais e sintomas encontrados durante a COVID-19 como a dor.

Assim, o presente estudo objetiva investigar o efeito de 3 proteínas sintetizadas principalmente a partir da isoforma da proteína *spike S* da SARS-CoV-2, sobre o limiar nociceptivo de camundongos, bem como o envolvimento do TLR4 nesse processo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A dor é considerada como um processo fisiológico adaptativo e protetor essencial para sobrevivência. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), descreve que a dor pode ser conceituada como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos de tal lesão” (Desantana *et al.*, 2020; Raja *et al.*, 2020). Ela é sempre uma experiência pessoal subjetiva influenciada por fatores biológicos, psicológicos e sociais, condicionada no decorrer de vivências (Raja *et al.*, 2020).

O termo utilizado para designar a ativação fisiológica das vias neurais por estímulos que geram danos reais ou potenciais para que sejam evitados é denominado nocicepção (Julius; Basbaum, 2001; Sneddon, 2018). Neurônios sensoriais periféricos possuem terminações nervosas livres, denominados nociceptores, os quais expressam diferentes receptores e canais iônicos, que são ativados por estímulos térmicos, mecânicos e químicos nocivos (Julius; Basbaum, 2001; Lee; Neumeister, 2020). Os nociceptores possuem limiares de ativação específicos e quando ativados transformam o estímulo em sinais elétricos desencadeando potenciais de ação, processo denominado transdução, assim o estímulo é transmitido por meio de fibras aferentes até o corno dorsal da medula espinal (CDME), onde faz sinapse com neurônios de segunda ordem (Sneddon, 2018).

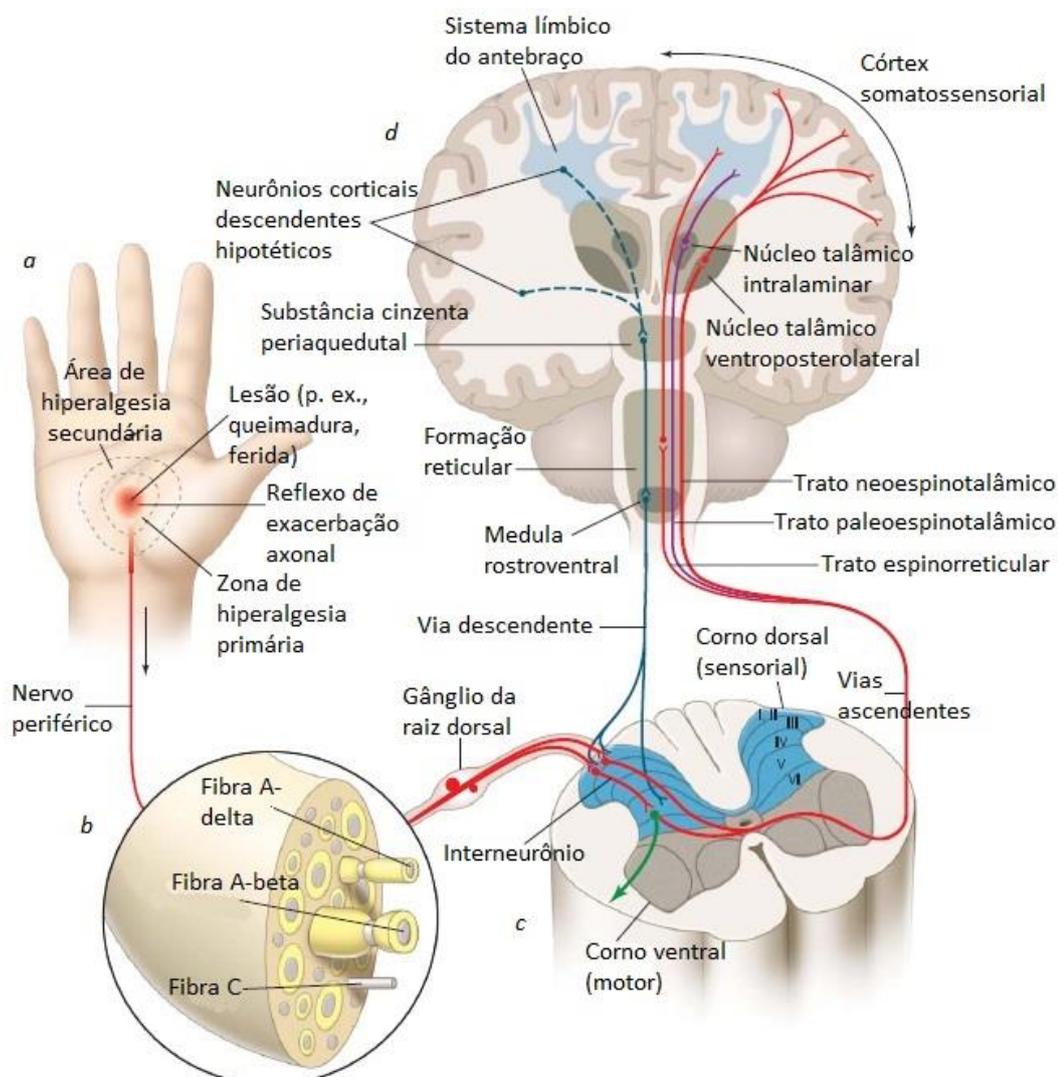
A transmissão do estímulo ocorre por meio das fibras aferentes até os nociceptores localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD) e posteriormente as fibras A δ fazem sinapse com neurônios de segunda ordem nas lâminas I e V e as fibras C com os das lâminas I e II do (CDME), uma vez que liberam mediadores excitatórios que sensibilizam os neurônios de segunda ordem (Lee; Neumeister, 2020; Milligan; Watkins, 2009).

A transmissão prossegue por meio dos neurônios de segunda ordem que ascendem contralateralmente e conduzem o impulso pelo trato espinotalâmico lateral e medial até o tálamo, onde estão presentes neurônios de terceira ordem que se

projetam para regiões corticais específicas que medeiam a interpretação da dor (Almeida *et al.*, 2004; Milligan; Watkins, 2009).

A modulação da dor ou via descendente inibitória está relacionada à ativação dos receptores opioides presentes na medula espinal e substância cinzenta periaquedutal (PAG – do inglês, “periaquedutal grey matter”), ao sistema inibitório descendente, o qual atua via serotonina e norepinefrina, e a ativação de fibras mecânicas não nociceptivas chamadas A β , a qual suprime o sinal de dor e é chamada “teoria do portão”, postulada por Melzack e Wall em 1965 (Lee; Neumeister, 2020; Melzack; Wall, 1965).

Figura 1 - Representação das vias fisiológicas ascendente e descendente da dor.



Fonte: Adaptado de Oaklander (2011).

2.2 CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA

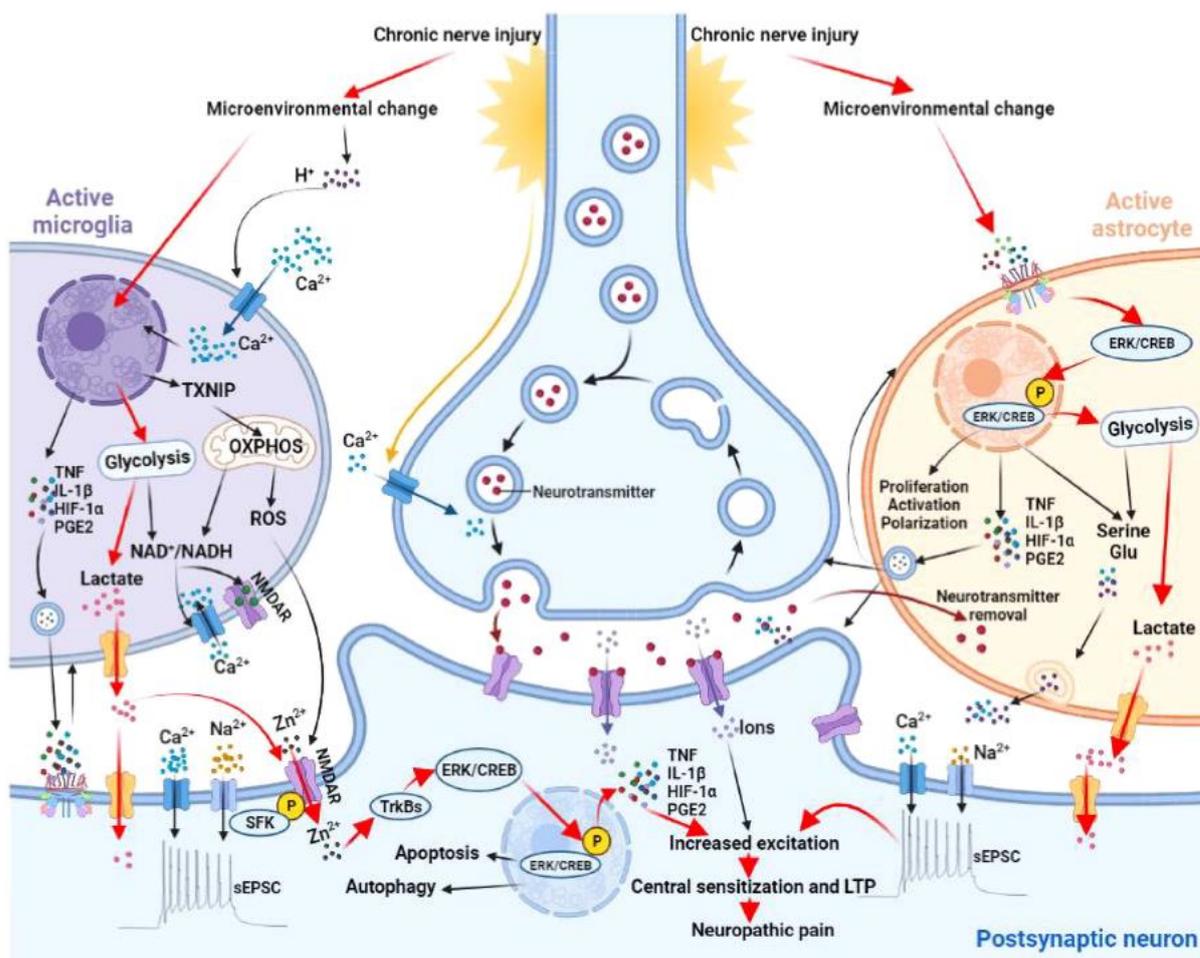
As células da glia compreendem cerca de 70% das células do sistema SNC e superam o número de neurônios. São divididas em: astrócitos, micróglia e oligodendrócitos; sendo que, micróglia e astrócitos têm sido as principais células envolvidas na modulação neuroimune da dor (Ji *et al.*, 2013; Mika *et al.*, 2013).

Geralmente, a micróglia e os astrócitos encontram-se normalmente em um estado quiescente e desempenhando seu papel fisiológico. Com a entrada aumentada de estímulos resultantes de lesões ou doenças do sistema nervoso somatossensorial, como ocorre na DN, essas células ficam reativas, se hipertrofiam e proliferam, aumentando a expressão de proteínas, como a proteína adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (Iba1) para micróglia e a proteína fibrilar glial ácida (GFAP) para astrócitos, além de uma gama de receptores, tais como TLR4 e TRPV1 (Grace *et al.*, 2014; Marrone *et al.*, 2017; Milligan; Watkins, 2009).

Em condições fisiológicas, a micróglia representa cerca de 5-20% de todas as células da glia e em condições patológicas, como a dor neuropática, são as primeiras a se tornarem ativas em casos de lesão do nervo e se proliferam contribuindo para a modulação neuronal (Mika *et al.*, 2013).

Em sua forma não ativa, a micróglia apresenta morfologia ramificada, pouca ou nenhuma expressão de receptores e marcadores de superfície celular e atuam no desenvolvimento cerebral a partir de interações com as sinapses (Costigan *et al.*, 2009; Ji; Ru Rong *et al.*, 2013). Em estado ativado, estas células sofrem alterações morfológicas, sendo elas: hipertrofia, proliferação, aumento de alguns marcadores de superfície celular, como a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (IBA1) e de receptores acompanhados pela ativação de proteínas cinases e consequente liberação de substâncias pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , e interleucina 6 (IL-6) que sensibilizam o neurônio de segunda ordem, favorecendo a alodínia e hiperalgesia durante a dor neuropática (Mika *et al.*, 2013; Watkins; Maier, 2003).

Figura 2 - Efeitos da ativação da microglia e dos astrócitos na plasticidade sináptica.



Fonte: Kong *et al.* (2022).

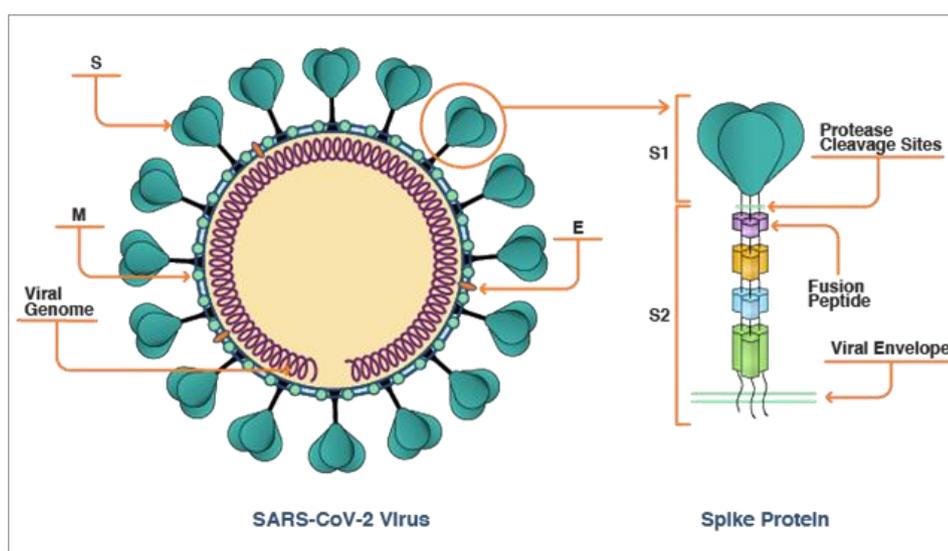
2.3 SARS-COV 2 E DOR

Durante a infecção da SARS-CoV-2, os sintomas e manifestações neurológicas podem afetar três sistemas diferentes: o sistema nervoso central (SNC), o sistema nervoso periférico (SNP) e o sistema músculo-esquelético (Leonardi *et al.*, 2020). Embora a capacidade neuroinvasiva do SARS-CoV-2 ainda não tenha sido totalmente compreendida, múltiplas linhas de evidência implicam que tanto a via hematogênica quanto a neuronal podem ser utilizadas para penetrar no SNC (Desforges *et al.*, 2019).

Atualmente, foram encontradas várias vias e receptores responsáveis pela entrada do vírus nas células em humanos. Um dos primeiros mecanismos estudados depende da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) como receptor funcional do SARS-CoV-2. A proteína *spike* do vírus interage com os receptores ACE 2

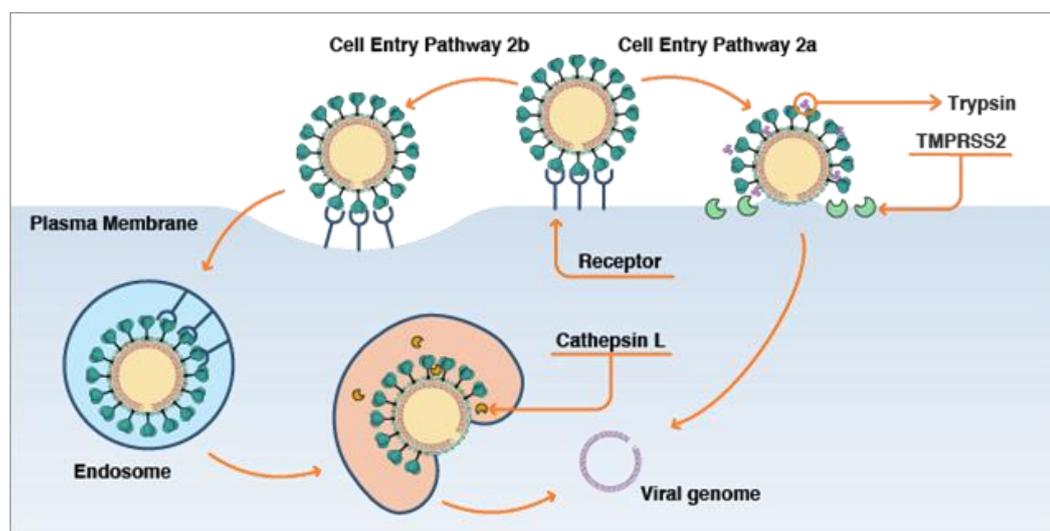
expressos em neurônios e células gliais do cérebro, o que torna o cérebro suscetível à neuroinvasão. Após a ligação ao receptor ACE 2, a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) leva à clivagem proteolítica e ao *priming* da proteína *spike*, que permite que o vírus entre nas células hospedeiras (Desforgues *et al.*, 2019).

Figura 3 - Modelo esquemático demonstrativo da SARS-CoV 2, proteína Spike e suas subunidades.



Fonte: Granet (2020).

Figura 4 - Esquema simplificado demonstrando, resumidamente, duas possíveis vias de infecção pelo vírus da SARS-CoV 2 utilizando o receptor da ACE2 ou por endocitose.



Fonte: Granet (2020).

Em humanos, os receptores ECA 2 são amplamente expressos nos epitélios das vias aéreas, células renais, intestino delgado, parênquima pulmonar, endotélio vascular e em todo o SNC, incluindo neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, ventrículos, giro temporal médio, córtex cingulado posterior e bulbo olfatório (CHEN *et al.*, 2020). O SARS-CoV-2 tem, portanto, potencial para infectar neurônios e células gliais expressas em todo o SNC (Harapan; Yoo, 2021).

Após infectar as vias aéreas, o SARS-CoV-2 pode passar através da barreira epitelial e acessar a corrente sanguínea através da infecção das células endoteliais da barreira hematoencefálica ou da barreira sangue-LCR no plexo coróide. Além disso, o SARSCoV-2 pode infectar leucócitos, que se disseminam para outros tecidos do corpo humano e depois atravessam a barreira para ter acesso ao SNC (Desforges *et al.*, 2019). Os leucócitos liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF que danificam oligodendrócitos e neurônios. Eles produzem quimiocinas como CCL5, CXCL10 e CXCL11 que induzem quimioatração de células T ativadas. Os astrócitos liberam quimiocinas como CCL2, CCL5 e CXCL12, que têm como função recrutar mais leucócitos infectados. No geral, sugere-se que muitos mais fatores estão envolvidos no processo inflamatório e que o SARSCoV-2 acaba por iniciar um círculo vicioso de neuroinflamação (Desforges *et al.*, 2014).

Independentemente da via de transmissão que o vírus utilize, uma vez que o vírus atinja o SNC, o neurotropismo e a subsequente resposta imunitária causarão uma patologia do SNC, resultando numa doença (Amirian Es, 2020). Além disso, o dano indireto ao SNC mediado pelo sistema imunológico através da tempestade de citocinas é outro possível mecanismo neuropatológico observado em pacientes com COVID-19 (Ahmed *et al.*, 2020).

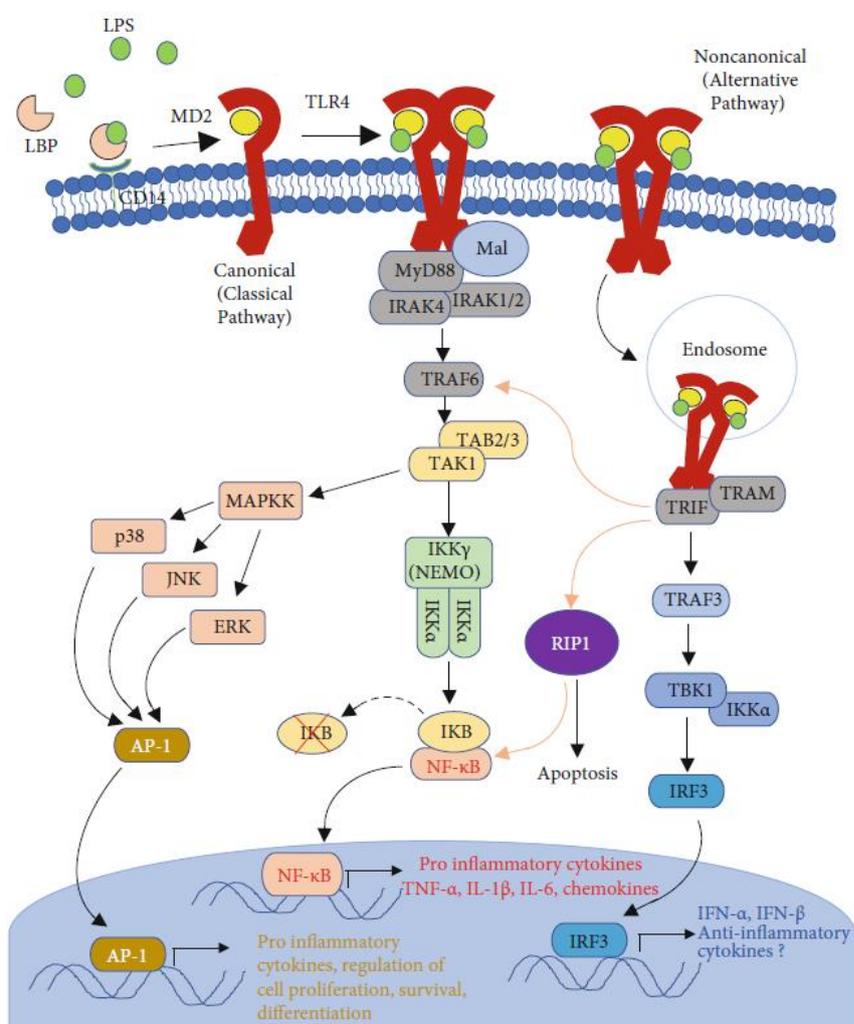
Coletivamente, as evidências mostradas em vários estudos indicam que várias infecções agudas são capazes de desencadear dor crônica regional ou generalizada. As evidências também sugerem que a infecção desencadeante deve ser de gravidade e duração para interromper as atividades normais de uma pessoa infectada (Wessely *et al.*, 1995).

2.4 RECEPTOR TLR4

O TLR4 é um receptor que tem como função o reconhecimento de padrões (RRP's), evolutivamente conservado e expresso por células imunes, tais como os

macrófagos, neurônios e pelas células da glia (Lacagnina *et al.*, 2017). Os receptores TLR4 são ativados durante a dor neuropática (Zhao *et al.*, 2020). Estes receptores são classificados como receptores de reconhecimento de padrões transmembrana e possuem papel fundamental no reconhecimento bacteriano, em respostas inflamatórias e lesão tecidual, sendo ativados por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), padrões moleculares associados aos xenobióticos (XAMPs) e DAMPs (Akira; Takeda, 2004).

Figura 5 - Visão geral das principais vias de sinalização do TLR4. O TLR4 pode ser ativado por LPS (PAMP clássico), DAMPs ou PAMPs virais



Fonte: Aboudounya; Heads (2021).

O TLR4 participa da primeira linha de defesa da resposta imune inata. Sua estrutura consiste em um domínio extracelular com repetições ricas em leucina, um domínio transmembranar composto de uma hélice e um domínio extracelular Toll/IL1-R (TIR). A porção extracelular TIR recruta moléculas adaptadoras como a MyD88 para

iniciar cascatas que resultarão na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. São expressos em células imunes e células da glia (Akira; Takeda, 2004; Zhao *et al.*, 2020).

Choudhury *et al.* (2020) demonstraram em uma análise *in silico* recente que a proteína Spike de SARS-CoV-2 tem o potencial de interagir com certos membros da família TLRs, incluindo TLR4, além de ACE2. Por outro lado, o próprio vírus propagado também pode provocar respostas pró-inflamatórias em macrófagos, pois os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias, detectando uma ampla gama de patógenos usando receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores toll-like (TLRs) (Hoffmann *et al.*, 2020).

A subunidade proteína S1 da proteína Spike de SARS-CoV-2 provoca fortemente a produção de mediadores pró-inflamatórios e ativação de NF- κ B e proteína quinase ativada por mitógeno ativada por estresse (MAPK) via de sinalização de TLR4, de maneira semelhante ao lipopóliosacarídeo (LPS) (Shirato; Kizaki, 2021).

Portanto, o objetivo do presente estudo é investigar a participação do receptor TLR4 em células da glia a nível espinal durante a nocicepção induzida pelos peptídeos da proteína *Spike*, uma vez que sua participação ainda não foi demonstrada e a participação das células da glia neste processo ainda não está clara.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação espinhal do TLR4 na nocicepção induzida pelos peptídeos da proteína da *spike* da SARS-CoV-2 em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos o trabalho pretende:

- a) avaliar o efeito da administração intratecal das proteínas da *spike* da SARS-CoV-2 sobre o limiar nociceptivo de camundongos;
- b) avaliar o envolvimento do TLR4 sobre a nocicepção induzida pela administração intratecal das proteínas da *spike* da SARS-CoV-2;
- c) avaliar o envolvimento da micróglia sobre a nocicepção induzida pela administração intratecal das proteínas da *spike* da SARS-CoV-2;
- d) avaliar a expressão do mRNA para o TLR4 na medula espinhal de camundongos com nocicepção induzida pela administração intratecal das proteínas da *spike* da SARS-CoV-2;
- e) avaliar os níveis de citocinas pro-inflamatórias em medula espinhal de camundongos com nocicepção induzida pela administração intratecal das proteínas da *spike* da SARS-CoV-2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS PARA EXPERIMENTAÇÃO

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL6, pesando entre 20 e 25 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) e C57BL6 knockouts para TLR4 provenientes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram alocados sob condições controladas de temperatura ($22,1 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$), de ciclo claro/escuro (12h/12h), de umidade relativa do ar a 65% e com livre acesso a ração e água até o início de cada experimento. Além disso, os animais serão alojados em caixas de polipropileno, sendo 6 animais por caixa. Todos os experimentos seguirão as normas de ética estabelecidas para experimentação, recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentaram aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela CEUA da UNIFAL-MG.

4.2 DROGAS UTILIZADAS NO ESTUDO

Para o estudo optou-se pelo uso das seguintes drogas:

- a) LPS-RS (Invivogen/EUA): antagonista para o TLR4, diluído em solução salina estéril (0,9%) e administrado por via *i.t* na dose 4 μg (Elisei *et al.*, 2020);
- b) Minociclina (Sigma-Aldrich/EUA): inibidor seletivo de micróglia, diluída em solução salina estéril (0,9 %) e administrada por via *i.t* na dose de 10 μg (Chen *et al.*, 2018).

4.3 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

4.3.1 Síntese

Os peptídeos foram obtidos em colaboração com o Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara-SP. Inicialmente, foi utilizado o método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) por meio da estratégia Fmoc.

O protocolo de síntese química consistiu de passos cíclicos de desproteção e acoplamento, intercalados por lavagens, para eliminação do excesso de reagentes utilizados e subprodutos obtidos. O acoplamento foi realizado pela ativação dos grupos carboxila dos Fmoc-aminoácidos em solução de diisopropilcarbodimida e hidroxibenzotriazolil urônio (HBTU), durante 2 h. Nesta etapa, um excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número de sítios reativos existentes na resina foi utilizado.

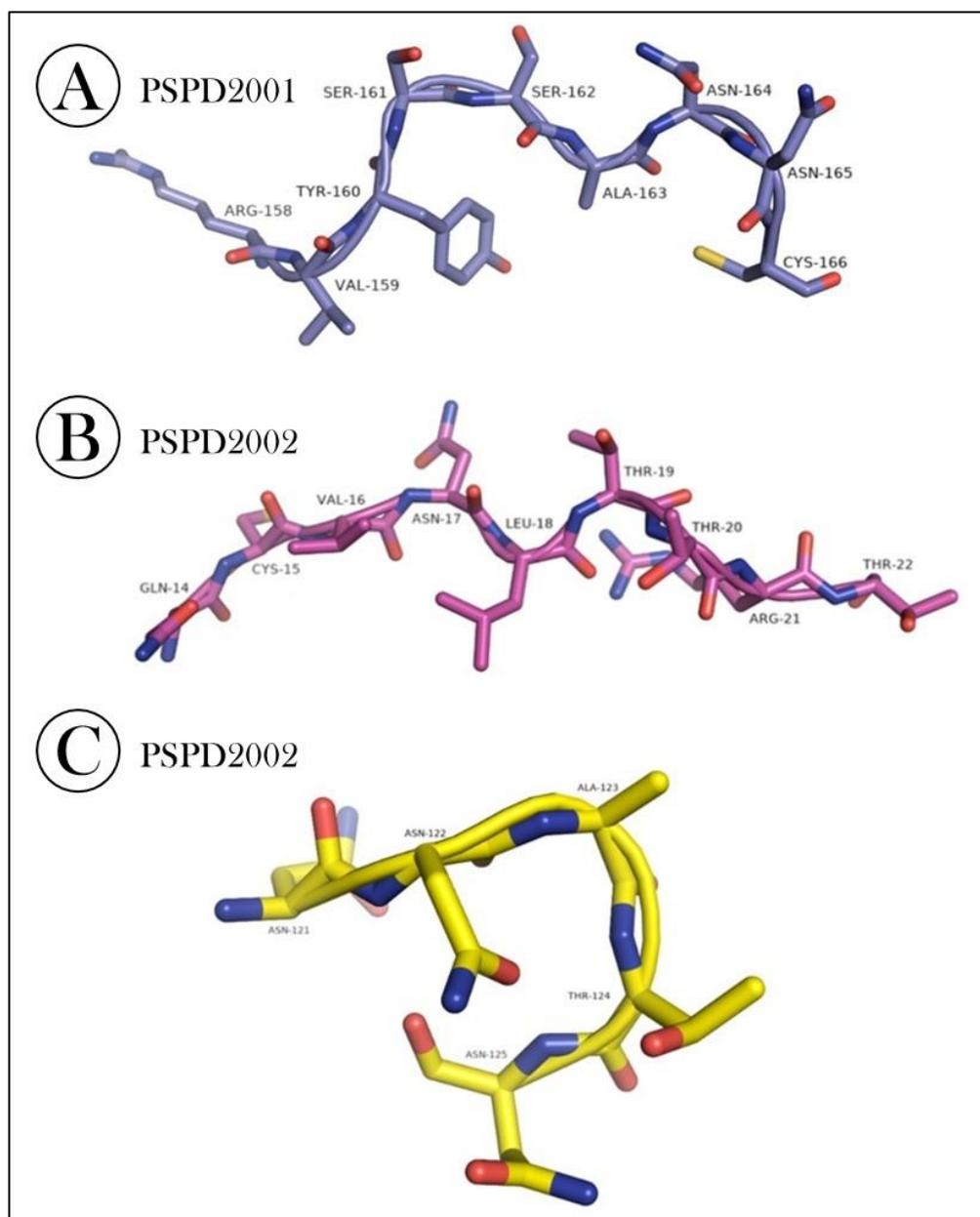
A desproteção do grupo amino após acoplamento, i.e., a retirada do grupo Fmoc base-lábil foi realizada por meio da reação com uma solução 20% de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF) acompanhando a saída do grupo protetor por meio do teste colorimétrico de ninidrina (referência) que identifica grupos aminas livres convertendo a solução amarela em azul violáceo após incubação a 110 °C durante 3 min (Behrendt *et al.*, 2016).

Entre cada etapa foram efetuadas lavagens subsequentes com DMF. As resinas utilizadas foram Fmoc-Cys-Wang, Fmoc-Thr-Wang e Fmoc-Asn-Wang para os peptídeos: Arg-Val-Tyr-Ser-Ser-Ala-Asn-Asn-Cys- COOH; Gln-Cys-Val-Asn-Leu-Thr-Thr-Arg-Thr-COOH e Asn-Asn-Ala-Thr-Asn-COOH, respectivamente. Essas resinas permitiram ao final da síntese a obtenção de peptídeos com a extremidade C-terminal carboxilada.

4.3.2 Clivagem

Após acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos das sequências peptídicas, as cadeias foram removidas do suporte sólido por meio de clivagem ácida utilizando ácido trifluoracético (TFA) durante 2h. Além do TFA, supressores de reação foram adicionados com objetivo de proteção dos aminoácidos ao ataque ácido e para evitar a volta dos protetores de cadeia lateral presentes em alguns aminoácidos com cadeia lateral reativa. Os supressores foram definidos de acordo com a sequência de cada peptídeo. Após clivagem, os peptídeos foram precipitados com éter gelado com posterior extração com solução a 0,045% de TFA em água purificada (Guy *et al.*, 1997). As soluções foram liofilizadas para obtenção do material bruto sólido. A figura 6 apresenta os modelos estruturais das moléculas sintetizadas obtidas.

Figura 6 - Modelos estruturais dos peptídeos (A) PSPD2001, (B) PSPD2002 e (C) PSPD2003, que foram sintetizados para o presente estudo.



Fonte: Autor (2024).

4.3.3 Purificação

Os compostos brutos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna em fase reversa utilizando diferentes métodos de purificação de acordo com o tempo de retenção obtido em um programa gradiente de 5 a 95% em 30 min (gradiente de exploração) em CLAE analítico. Após recolhimento das frações puras e liofilização, o material foi pesado e seu rendimento calculado,

obtendo-se 13,0% para o PSPD2001, 21,4% para o PSPD2002 e 18,2 % para o PSPD2003 (Klaassen *et al.*, 2019). O material puro e sólido foi submetido à análise cromatográfica para determinação do grau de pureza do produto. Apenas compostos com pureza igual ou maior que 95,0% foram considerados para análise biológica, seguindo as normas determinadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/Brasil) e do *Food and Drug Administration* (FDA/USA), onde os contaminantes não devem superar 5% da amostra e os existentes não devem superar 2,5% individualmente.

4.3.4 Caracterização

As análises da pureza dos peptídeos sintetizados foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS. Para isso, foi realizada a infusão direta das soluções de amostra a uma concentração de aproximadamente 10 mg/L em acetonitrila/água contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A vazão de infusão foi ajustada a 5.0 μ L/min e a fonte de eletrospray foi operada em modo positivo, aplicando-se 4,5 kV no capilar de eletrospray. Os espectros obtidos indicaram a razão massa molecular/carga (m/z) dos compostos identificados que permitiram confirmar a obtenção das moléculas preteridas (Luna *et al.*, 2016).

4.3.5 Alinhamento Dos Peptídeos

As similaridades entre os peptídeos (A) PSPD2001, (B) PSPD2002 e (C) PSPD2003 sintetizados no presente estudo foram testadas utilizando o programa CLUSTAL W versão 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Os peptídeos foram alinhados com proteínas depositadas no NCBI/BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que consta de um conjunto de programas que buscam similaridades entre diferentes sequências.

O alinhamento das sequências investigadas foi realizado com os bancos de dados de ácidos nucleicos e/ou proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Dentro do BLAST a busca foi realizada no “Protein blast” utilizando como database o “*swissprot protein sequence (swissprot)*”, algoritmo - *blastp (protein BLAST)* e a pesquisa foi restrita ao *Physalaemus cuvieri* (taxid:218685).

Para obter informações detalhadas sobre as proteínas que alinharam com os peptídeos selecionados será utilizado o banco de dados *UniProtKB SwissProt* (<http://www.uniprot.org/>).

4.4 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

4.4.1 Via intratecal

Antes das injeções *i.t.*, os animais foram anestesiados com isoflurano (2%) (Cristália/BR) e O₂ (2 L / min). Em seguida, a região lombar foi tricotomizada e foi feita a assepsia com álcool 70%. Os animais foram posicionados em decúbito ventral para facilitar a palpação dos espaços intervertebrais L4-L5. A injeção *i.t.* foi realizada nesse espaço intervertebral para acesso da região subaracnóide usando uma agulha de 13 × 0,3 mm e volume de 5 µL. O movimento da cauda foi considerado indicativo da administração correta (Hylden; Wilcox, 1980). Para a padronização da técnica, a solução de lidocaína 2% (Densply Pharmaceutical/EUA) foi administrada *i.t.* a um grupo de animais de teste, admitindo a paralisia temporária dos membros posteriores como ponto final para confirmar a eficácia da técnica de injeção (Hylden; Wilcox, 1980).

Figura 7 - Imagem representativa do método de administração de substâncias via intratecal



Fonte: Autor (2023)

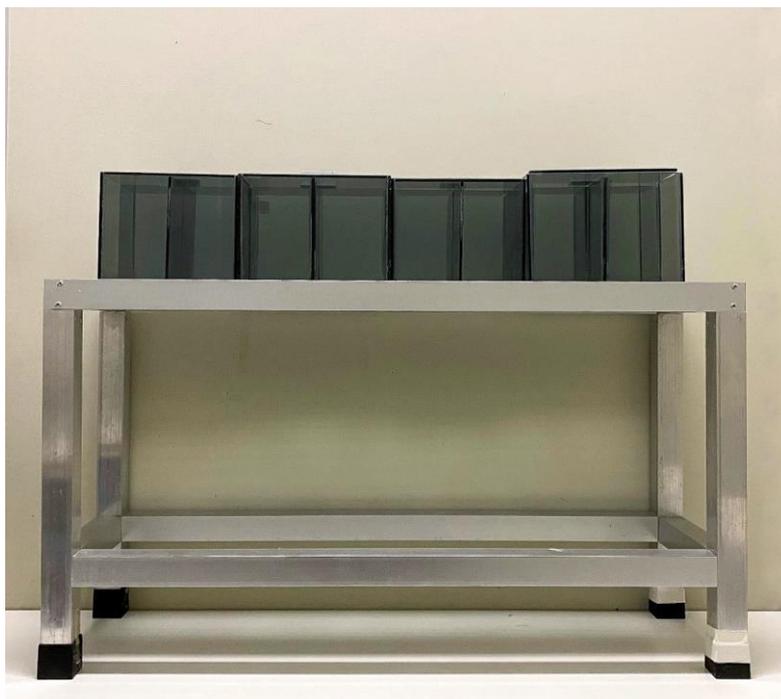
4.5 INDUÇÃO DA NOCICEPÇÃO PELOS PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA SPIKE

Com o intuito de verificar o envolvimento espinal do TLR4 na nocicepção e investigar os mecanismos envolvidos nesse processo, os peptídeos (PSPD 2001, 2002 e 2003) foram administrados por via *i.t.* nas doses de 25 ng e 50 ng e os animais controle receberam o respectivo veículo (salina) (n=6).

4.6 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado com base no método padronizado em nosso laboratório previamente (De Oliveira *et al.*, 2019). Neste teste os animais foram colocados em caixas individuais de vidro sobre uma grade de metal que dá acesso a pata e mantidos por no mínimo 30 minutos para a aclimatação (figura 8). Logo em seguida, a avaliação do limiar de retirada da pata foi feita por meio de filamentos de diferentes espessuras (von Frey filamentos; Aesthesio, EUA) (figura 9), que foram aplicados na superfície plantar da pata direita de cada animal). Então, considerou-se uma resposta positiva a retirada da pata, seguida de lambida da mesma. A média de 3 medidas foi descrita como o limiar mecânico de retirada de pata em gramas (g).

Figura 8 - Aparato utilizado para realização do teste de von Frey.



Fonte: Autor (2023).

Figura 9 - Kit com os diferentes filamentos utilizado no Teste de von Frey.



Fonte: Autor (2023).

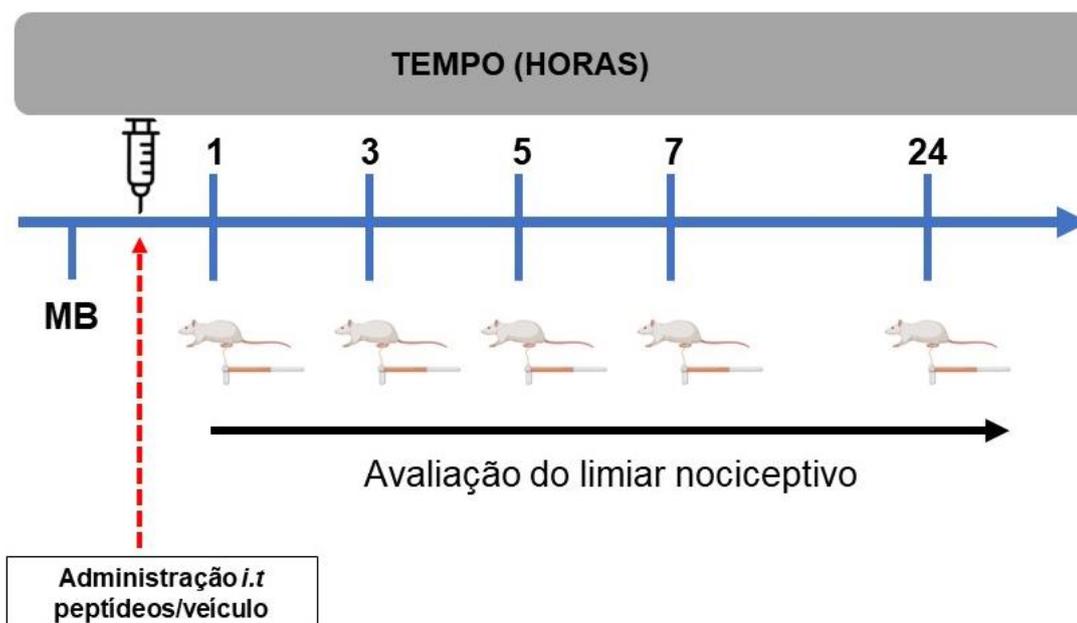
4.7 DELINEAMENTO DOS ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Para a avaliação do limiar nociceptivo, primeiramente foi realizada a medida basal de cada animal, e logo em seguida, os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos (n=6 por grupo): Pep1 (25ug), animais que receberam o peptídeo 1 (PSPD2001) na dose de 25ug por via intratecal; Pep1 (50ug), animais que receberam o peptídeo 1 (PSPD2001) na dose de 50ug por via intratecal; Pep2 (25ug), animais que receberam o peptídeo 2 (PSPD2002) na dose de 25ug por via intratecal; Pep2 (50ug), animais que receberam o peptídeo 2 (PSPD2002) na dose de 50ug por via intratecal; Pep3 (25ug), animais que receberam o peptídeo 3 (PSPD2003) na dose de 25ug por via intratecal; Pep3 (50ug), animais que receberam o peptídeo 3 (PSPD2003) na dose de 50ug por via intratecal; Veículo (VEC), animais que receberam o veículo dos peptídeos (salina estéril 0.9%) por via intratecal. Após as injeções as medidas do limiar nociceptivo foram repetidas 1h, 3h, 5h, 7h e 24h, conforme demonstrado na figura 10.

As doses dos peptídeos foram definidas por meio de estudos piloto do Departamento de Farmacologia da USP, dos quais foi verificado em outro modelos de avaliação de dor que cada dose pode promover respostas nociceptivas diferentes em relação ao animal apresentar dor aguda ou crônica, de acordo com a dose. Além disso, para verificar a participação do TLR4 na nocicepção induzida pelos peptídeos, grupos similares aos grupos acima foram utilizados com animais pré-tratados com o antagonista LPS-RS. Após a avaliação do limiar nociceptivo, cada peptídeo referente ao respectivo grupo ou o veículo, foram administrados e 1, 3, 5, 7 e 24h após a administração, uma nova medida do limiar nociceptivo foi realizada. No caso dos animais pré-tratados com LPS-RS e que receberam os peptídeos, o antagonista foi administrado por via intratecal 30 min antes da administração de cada peptídeo (Figura 11).

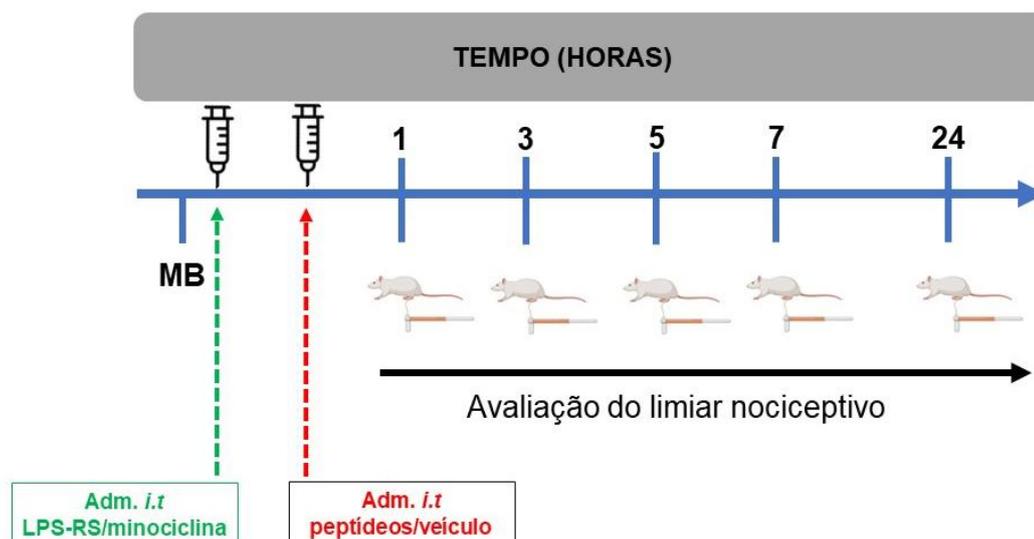
Foi investigado também o envolvimento da micróglia, através do seu inibidor específico minociclina na dose de 10 µg. Tanto o antagonista de TLR4 quanto o inibidor da microglia foram administrados por via *i.t* 30 minutos antes da administração dos peptídes ou seu respectivo veículo e o limiar nociceptivo foi avaliado antes de qualquer injeção para obtenção da MB e após 1, 3, 5, 7 e 24 horas dos tratamentos (Figura 11). Os experimentos ocorreram de maneira independente, ou seja, para cada grupo de tratamento foram utilizados animais diferentes.

Figura 10 - Modelo esquemático da administração dos peptídeos/veículo e avaliação do limiar nociceptivo demonstrado em horas. As linhas azuis verticais indicam as horas das avaliações após a administração dos peptídeos/veículo.



Fonte: Autor (2023).

Figura 11 - Modelo esquemático da administração do LPS-RS e minociclina, peptídeos e avaliação do limiar nociceptivo demonstrado em horas. As linhas azuis verticais indicam as horas das avaliações após a administração dos peptídeos/veículo.



Fonte: Autor (2023).

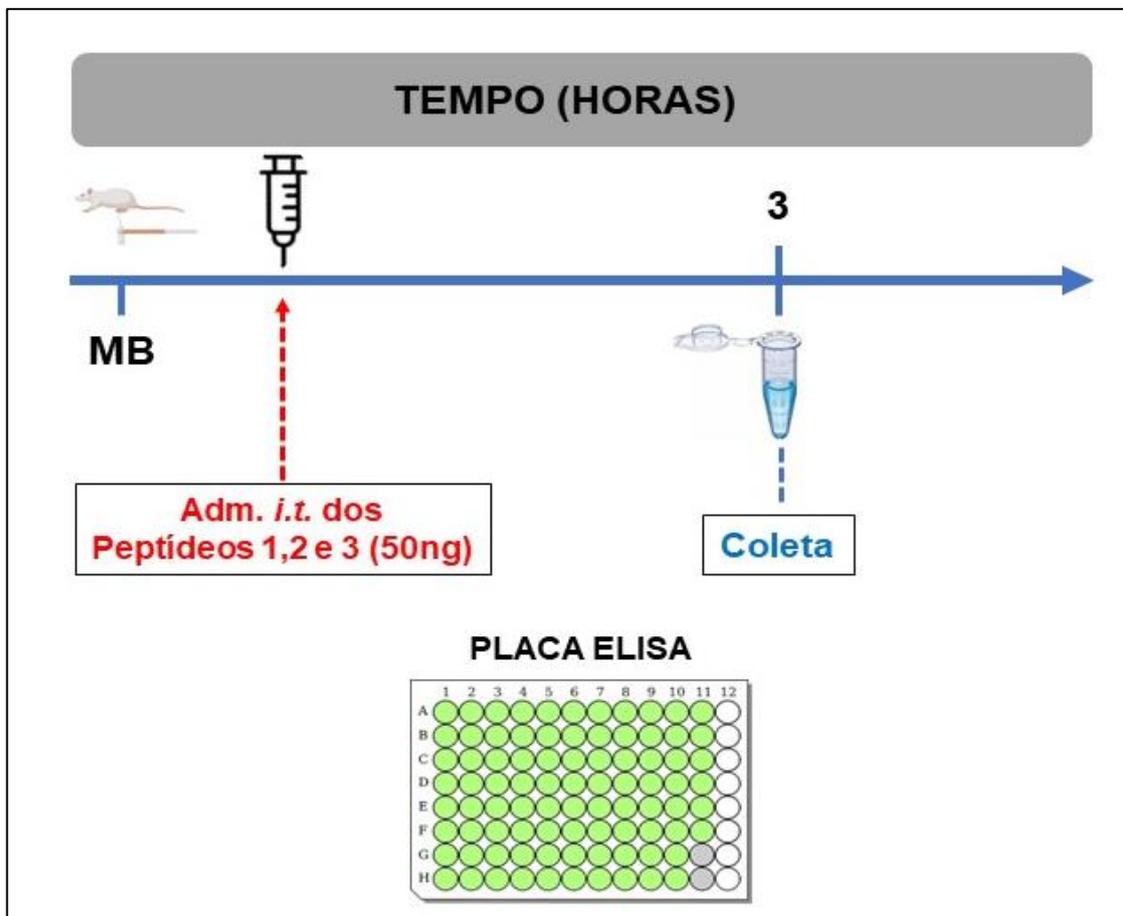
4.8 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TLR4 NA PRODUÇÃO DA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA IL-1 β DURANTE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELOS PEPTÍDEOS DA PORÇÃO *SPIKE*

Foi realizado o ensaio de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para avaliar a participação do TLR4 na produção da citocina IL-1 β durante a nocicepção induzida pela *Spike*.

Para verificar a produção da citocina, foram administrados os peptídeos 1, 2 e 3 na dose de 50 ng e após 3 horas da administração dos peptídeos os segmentos L4 a L6 da medula espinal de cada grupo de animais (n=6) foram coletados e posteriormente colocados em microtubos contendo uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M (pH=7.4). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados e o homogenato foi centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos em uma temperatura de 4°C e então os sobrenadantes foram retirados e armazenados em criotubos em um biofreezer a uma temperatura de -80°C até o momento da análise.

Para analisar o nível espinal da IL-1 β foi dosado por meio do kit específico (Peprotech/EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise, microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura *overnight* e posteriormente tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com solução de albumina bovina por 2 horas. Após lavagem, as amostras ou padrões foram incubadas com o anticorpo de detecção, com a solução de avidina-peroxidase e posteriormente adicionada uma solução cromogênica para as leituras das reações colorimétricas, as quais foram realizadas a 405nm de comprimento em um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Os cálculos foram realizados a partir da curva padrão para determinação das concentrações das amostras.

Figura 12 - Delineamento experimental para o ensaio de dosagem de citocinas pró-inflamatórias pelo ensaio de ELISA. Peptídeos: PSPD 2001, PSPD 2002 e PSPD 2003.



Fonte: Autor (2023).

4.9 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RNAM PELA TÉCNICA DE RT-PCR

A análise da expressão gênica de alvos envolvidos na nocicepção induzida pelos peptídeos da proteína spike, foi realizada pela reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR). Avaliou-se o marcador para o receptor TLR4. O primer utilizado na quantificação pode ser encontrado na Tabela 2.

Os segmentos medulares L4-L6 foram coletados após eutanásia dos animais na 3ª hora de nocicepção induzida, armazenada em solução trizol a 80°C e submetida à extração de RNA total. A quantificação do RNA total foi avaliada por leitura espectrofotométrica usando o NanoDrop ND1000 (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE,

EUA). Em seguida, 1µg deRNA total foi incubado com DNase por 15 min em termociclador a 37°C para eliminar possível contaminação com DNA genômico.

Então, o RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando *primers Oligo dT e SuperScript IV First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiro, o *primer Oligo dT*, a mistura de DNTP e o RNA total foram aquecidos a 65°C por 5 min. Em seguida, o tampão 5X RT, DTT, inibidor de ribonuclease e *SuperScript IV* transcriptase reversa foram adicionados ao RNA recozido e incubados a 55°C por 30 min e depois a 80°C por 10 min para promover a inativação da enzima.

A expressão de genes-alvo foi investigada usando o Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) no Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil). Todas as reações foram realizadas obtendo um volume final de 25 µL e os genes foram amplificados nas seguintes condições experimentais: 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 10 s, seguido de anelamento a 60°C e extensão por 1 min (40 ciclos).

A normalização dos valores de expressão dos genes-alvo foi realizada por meio da expressão do gene constitutivo SDHA. O método $\Delta\Delta C_t$ com correção de eficiência foi empregado para calcular a expressão relativa de cada gene, e uma amostra de controle foi usada como calibrador (PFAFFL, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram medidos através do perfil de amplificação de cada amostra, utilizando o programa LinRegPCR, conforme recomendado por Ramakers e colaboradores (Ramakers *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Sequência dos genes

GENE	SEQUÊNCIA
<i>tlr4</i>	F 5'- CCTGACACCAGGAAGCTTGAA-3'
<i>sdha</i>	F: 5'- GGAACACTCCAAAACAGACCT-3' R: 5'- CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA-3'

Fonte: Autor (2023).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA). Já o tratamento estatístico dos dados obtidos nos ensaios moleculares foi realizado por meio da análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA). Ambas as análises foram seguidas pelos pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. A análise estatística e a preparação dos gráficos foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 5 (GraphPad Software, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELOS PEPTÍDEOS DA SPIKE

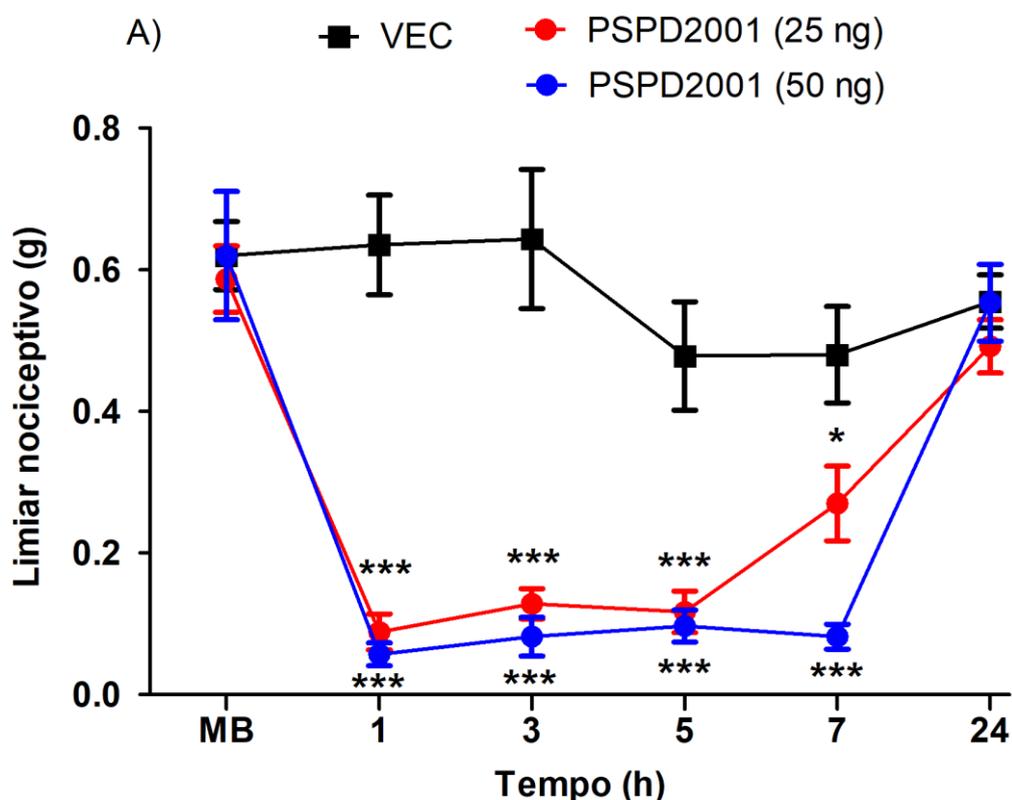
A dor é uma preocupação crescente em pacientes sintomáticos, provavelmente emanado de um ataque direto da SARS-CoV-2 às células e a “tempestade de citocinas” desencadeada pelas células afetadas (Dhama *et al.*, 2020). Evidências emergentes apontam para um subconjunto de neurônios sensoriais que expressam ACE2 (Shiers *et al.*, 2020) e que fazem sinapse com a coluna vertebral e neurônios do SNC do tronco cerebral para produzir efeitos neurológicos, incluindo dor de cabeça e dor nos nervos (Mao *et al.*, 2020; Montalvan *et al.*, 2020).

5.1.1 PSPD 2001 (25ng) e (50 ng)

Inicialmente, foi avaliado o efeito da administração intratecal do peptídeo 1 em duas doses diferentes (25ng) e (50ng). Para isso, foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos de 6 animais cada: veículo (VEC), PSPD 2001 (25ng) e PSPD 2001 (50ng).

Os resultados mostram uma redução significativa do limiar nociceptivo mecânico do grupo PSPD 2001 (25ng) em relação ao grupo VEC, da 1ª a 5ª hora ($p < 0,001$; $F_{2,12} = 8,447$) e 7ª hora ($p < 0,05$; $F_{2,12} = 8,447$). O grupo PSPD 2001 (50ng) também apresentou significativa redução do limiar nociceptivo quando comparado ao grupo VEC, da 1ª até a 7ª hora ($p < 0,001$; $F_{2,12} = 8,447$) após a administração do peptídeo (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Avaliação do efeito da administração intratecal do peptídeo 1 nas doses (25ng) e (50ng).



Fonte: Autor (2023)

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC). MB: medida basal do limiar nociceptivo. VEC: grupo veículo. A seta em azul indica a injeção intratecal do PSPD 2001. A chave sobre as setas indica que a injeção de ambas as doses ocorreu no mesmo intervalo de tempo.

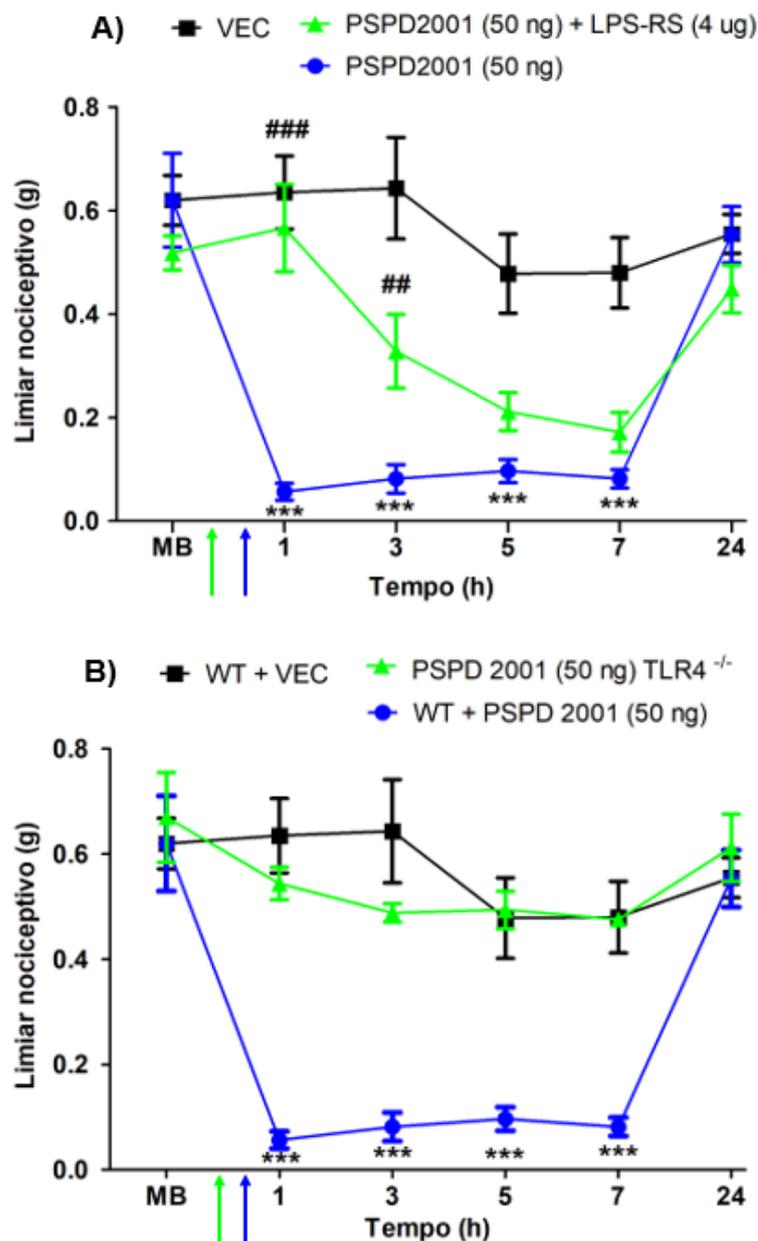
5.1.2 PSPD 2001: Avaliação da participação do receptor TLR4 espinal

O receptor TLR4 exerce um papel importante no início das respostas inflamatórias e sua super estimulação pode ser prejudicial levando à hiperinflamação. Foi demonstrado que a desregulação da sinalização TLR4 desempenha um papel na iniciação e/ou progressão de diversas doenças, como lesão de isquemia-reperfusão, aterosclerose, hipertensão, câncer e distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos (Molteni *et al.*, 2016; Biancardi *et al.*, 2017).

Sendo assim, avaliamos a participação do receptor TLR4 na nocicepção induzida pelo PSPD 2001 (50ng) através da prévia administração *i.t.* do seu antagonista seletivo LPS-RS (4 μ g).

A participação do TLR4 pode ser observada no gráfico B, onde é demonstrada que, a administração do seu antagonista LPS-RS (4 μ g) foi capaz de reverter, parcialmente, a nocicepção na 1^a ($p < 0,001$; $F_{2,12} = 7,666$) e 3^a hora ($p < 0,01$; $F_{2,12} = 7,666$) após a sua administração (Gráfico 2A). Foram utilizados animais TLR4 ^{-/-} (*Knock-outs*: que não expressam o receptor) e estes animais receberam a injeção intratecal do PSPD 2001 (50ng). O grupo WT + PSPD 2001 (50ng) apresentou redução significativa no limiar nociceptivo mecânico da 1^a até a 7^a hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 7,162$) quando comparado ao grupo WT + VEC. Já o grupo PSPD 2001 (50ng) TLR4 ^{-/-} não apresentou redução significativa do limiar nociceptivo em nenhum dos tempos avaliados (Gráfico 2B). Estes resultados sugerem a participação do TLR4 a nível espinal durante a nocicepção induzida pelo PSPD 2001.

Gráfico 2 - Avaliação da participação do TLR4 na alodínia mecânica induzida pelo PSPD 2001 (50ng) através da injeção i.t. do antagonista LPS-RS (4ug) (A) e avaliação do limiar nociceptivo de animais TLR4^{-/-} tratados com PSPD 2001 (50ng) (B).



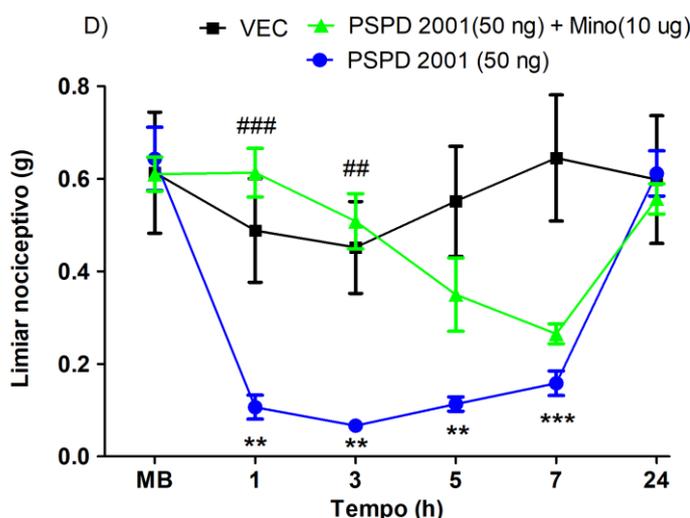
Fonte: Autor (2023).

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC), ### $p < 0,001$ e ## $p < 0,01$ indicam significância estatística em relação ao grupo PSPD 2001 (50ng) (A), *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo PSPD 2001 (50ng) TLR4^{-/-} (B). LPS-RS: *Lipopolysaccharide Rhodobacter sphaeroides*. WT: *wild type*. VEC: grupo veículo. MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em verde indica a injeção intratecal do antagonista e a seta em azul a injeção do peptídeo.

5.1.3 PSPD 2001: Participação da micróglia espinhal na nocicepção induzida pelo peptídeo

Está bem esclarecido na literatura que, durante o desenvolvimento da nocicepção ocorre a participação do receptor TLR4 e estudos apontam que este receptor é expresso por células da glia. Ao serem ativadas, essas células podem liberar mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a hipernocicepção neuronal e manutenção do estado de sensibilização central (Milligan; Watkins, 2009). Com isso, este estudo avaliou a participação de micróglia a nível espinal na nocicepção induzida pelo PSPD 2001. O gráfico 3 indica a participação da micróglia, pois o grupo que recebeu PSPD 2001 (50ng) apresentou redução significativa do limiar nociceptivo em comparação ao grupo VEC na 1ª, 3ª, 5ª ($p < 0,01$; $F_{2,11} = 11,1$) e 7ª hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 11,1$), porém animais tratados com o inibidor de micróglia, (minociclina 10 μg) apresentaram aumento significativo do limiar nociceptivo em relação ao grupo PSPD 2001 (50ng) na 1ª ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 11,1$) e 3ª hora ($p < 0,01$; $F_{2,11} = 11,1$).

Gráfico 3 - Avaliação do envolvimento da micróglia pela administração i.t. do inibidor (minociclina 10ug) 30 minutos antes do tratamento com o peptídeo na dose de 50ng.



Fonte: Autor (2023).

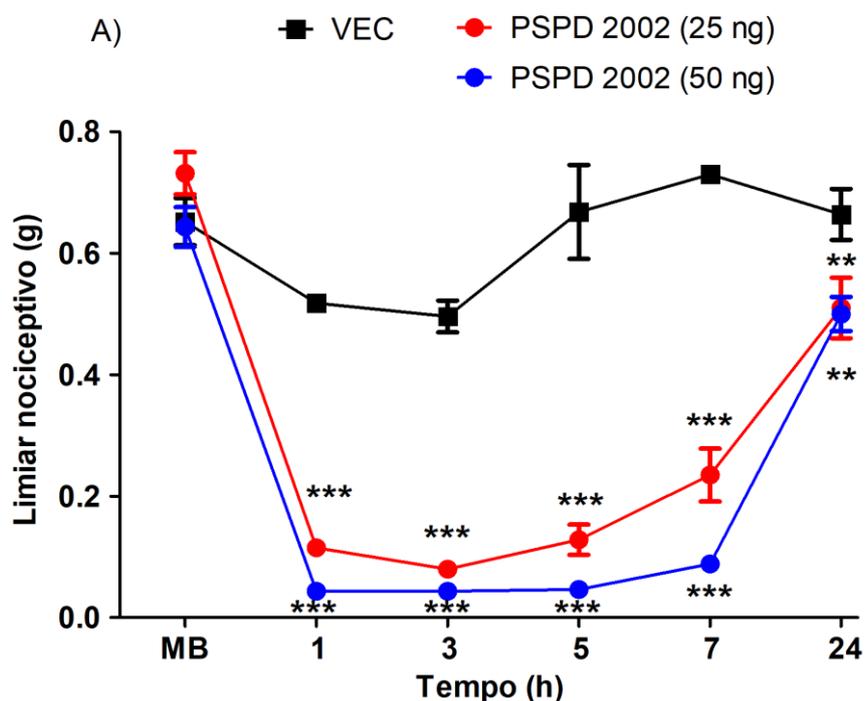
Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC) e ### $p < 0,001$ e ## $p < 0,01$ indicam significância estatística em relação ao grupo PSPD 2001 (50 ng). MB: medida basal do limiar nociceptivo. Mino: minociclina. VEC: grupo veículo. A seta em verde indica a injeção intratecal do inibidor e a seta em azul a injeção do peptídeo.

5.1.4 PSPD 2002 (25ng) e (50ng)

Avaliamos também o efeito da administração do peptídeo 2 em duas doses diferentes (25ng) e (50ng) sob o limiar nociceptivo mecânico dos animais. Os grupos utilizados para este experimento foram semelhantes aos do peptídeo 1: grupo veículo (VEC), PSPD 2002 (25ng) e PSPD 2002 (50ng) composto por 6 animais cada grupo totalizando 18 animais.

O gráfico 4 nos mostra que, assim como no PSPD 2001, os resultados do PSPD 2002 mostram que houve uma significativa redução do limiar nociceptivo mecânico após a administração de ambas as doses na 1^a, 3^a, 5^a, 7^a ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 23,93$) e 24^a hora ($p < 0,01$; $F_{2,11} = 23,93$) quando comparados ao grupo VEC.

Gráfico 4 - Avaliação do efeito da administração intratecal do peptídeo 2 nas doses (25ng) e (50ng).



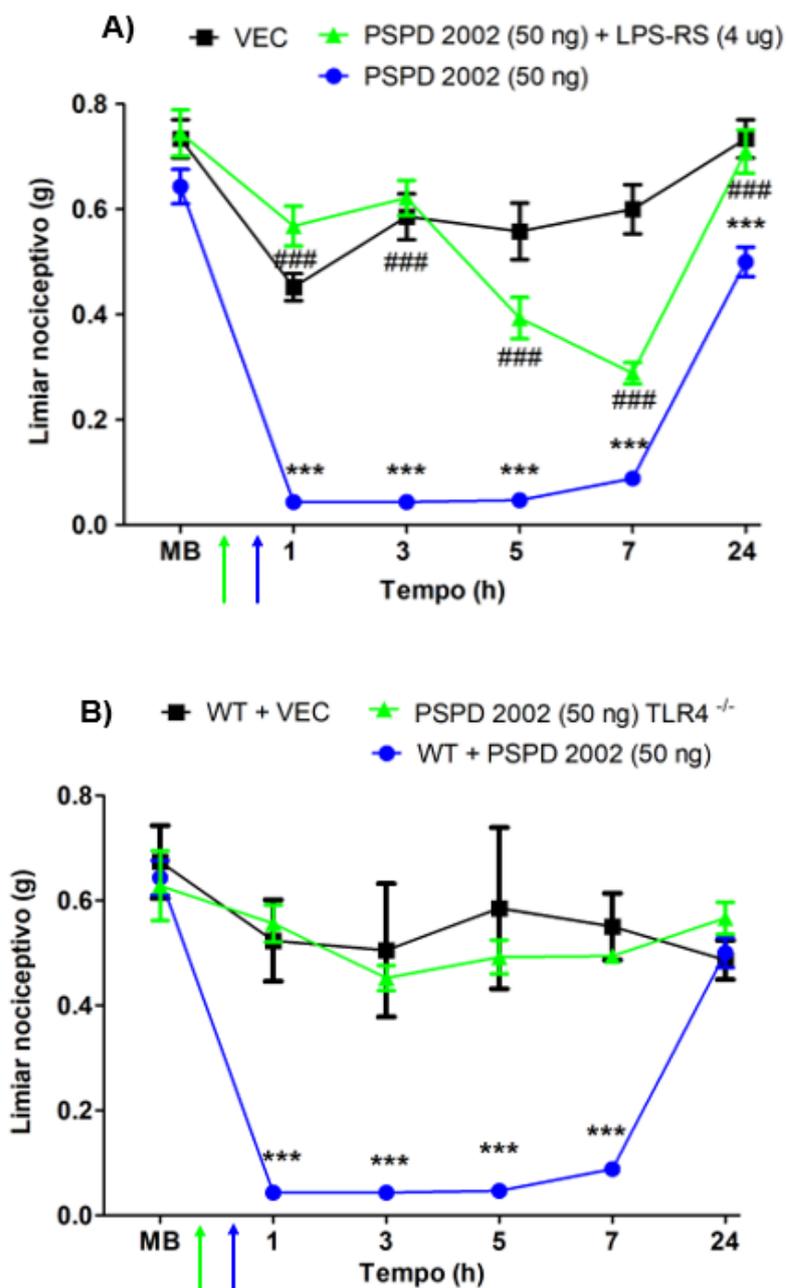
Fonte: Autor (2023).

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC). MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em azul indica a injeção intratecal do PSPD 2002 (50ng) e a seta vermelha indica a injeção na dose (25ng). A chave sobre as setas indica que a injeção de ambas as doses ocorreu no mesmo intervalo de tempo.

5.1.5 PSPD 2002: Avaliação da participação espinal do receptor TLR4

Ao avaliar a participação do TLR4 através da administração intratecal do antagonista LPS-RS (4 μ g), observamos que, o antagonista foi capaz de reverter, significativamente, a redução do limiar nociceptivo da 1^a até a 24^a hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 13,10$) quando comparado ao grupo PSPD 2002 (50ng) (Gráfico 5A). Para corroborar a participação do TLR4 utilizamos animais *Knock-outs* (não expressam o gene do receptor avaliado) e estes animais foram tratados com o peptídeo na dose de 50ng. O grupo WT + PSPD 2002 (50ng) apresentou uma redução significativa do limiar nociceptivo entre a 1^a e a 7^a hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 5,666$) após a administração do peptídeo, quando comparado ao grupo WT + VEC. Já o grupo PSPD 2002 (50ng) TLR4^{-/-} não apresentou redução significativa do limiar nociceptivo mecânico em comparação ao grupo WT + PSPD 2002 (50ng) (Gráfico 5B). Os resultados encontrados nas avaliações com o PSPD 2002 sugerem a participação do TLR4 na nocicepção induzida pelo peptídeo 2.

Gráfico 5 - Avaliação da participação do TLR4 na alodínia mecânica induzida pelo PSPD 2002 (50ng) através da injeção i.t. do antagonista LPS-RS (4ug) (A) e avaliação do limiar nociceptivo de animais TLR4^{-/-} tratados com PSPD 2002 (50ng) (B).



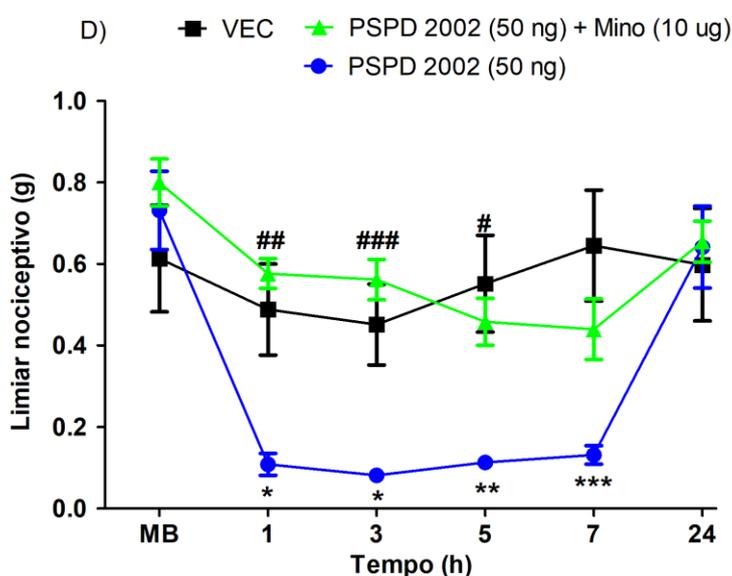
Fonte: Autor (2023).

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 6-5 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC), ### $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo PSPD 2002 (50ng) (A), *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo PSPD 2002 (50ng) TLR4^{-/-} (B). MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em verde indica a injeção intratecal do antagonista e a seta em azul a injeção do peptídeo.

5.1.6 PSPD 2002: Participação da micróglia espinal na nocicepção induzida pelo peptídeo

Assim como nos resultados anteriores, também foi investigada a participação da micróglia espinal durante a nocicepção induzida pelo peptídeo 2. Para esta avaliação, foi utilizado o inibidor específico da micróglia (minociclina 10 ug) o qual foi administrado 30 minutos antes da injeção do peptídeo 2. O gráfico D mostra que o grupo que recebeu somente o PSPD 2002 (50ng) induziu uma significativa redução do limiar nociceptivo dos animais na 1ª, 3ª ($p < 0,05$; $F_{2,11} = 8,83$), 5ª ($p < 0,01$; $F_{2,11} = 8,83$) e 7ª hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 8,83$), enquanto o grupo com os animais tratados previamente com minociclina (10ug) apresentou reversão da nocicepção na 1ª ($p < 0,01$; $F_{2,11} = 8,83$), 3ª ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 8,83$) e 5ª hora ($p < 0,05$; $F_{2,11} = 8,83$). Estes achados sugerem a participação da micróglia espinal durante a nocicepção induzida pelo peptídeo 2 (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Avaliação do envolvimento da micróglia espinal pela administração i.t. do inibidor (minociclina 10ug) 30 minutos antes do tratamento com o peptídeo na dose de 50ng.



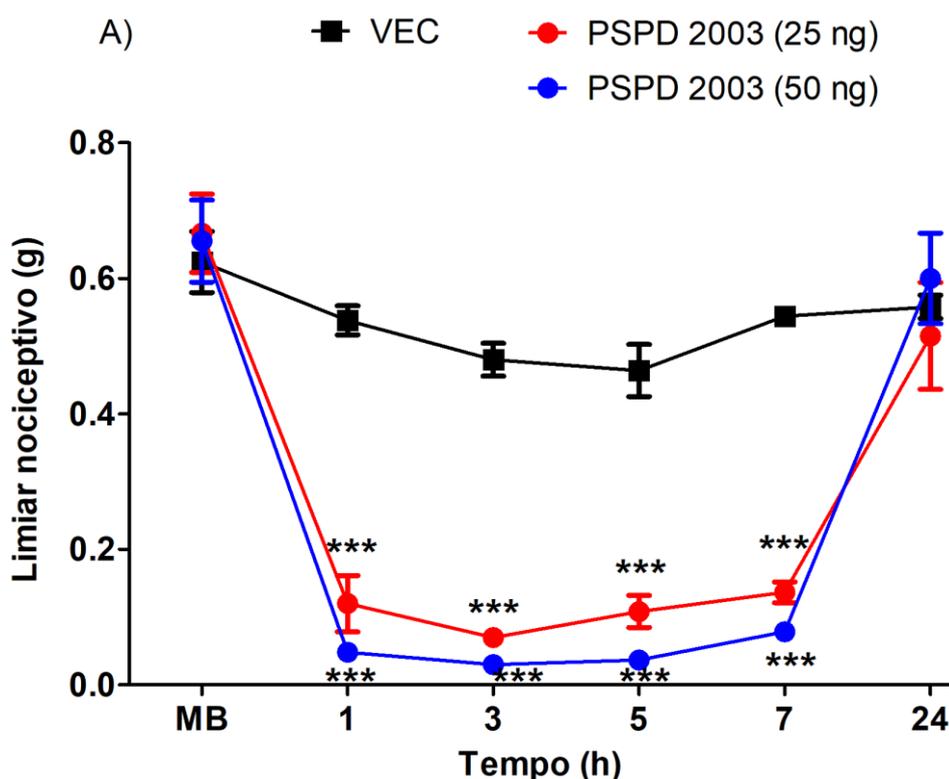
Fonte: Autor (2023).

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC) e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo PSPD 2002 (50 ng). MB: medida basal do limiar nociceptivo. Mino: minociclina. VEC: grupo veículo. A seta em verde indica a injeção intratecal do inibidor e a seta em azul a injeção do peptídeo.

5.1.7 PSPD 2003 (25ng) e (50ng)

Para concluir os experimentos comportamentais, avaliamos o efeito da injeção intratecal do PSPD 2003, sob o limiar nociceptivo mecânico dos animais de cada grupo, em duas diferentes doses. Para este experimento foram utilizados 18 animais divididos em 6 animais por grupo, sendo os grupos: veículo (VEC), PSPD 2003 (25ng) e PSPD 2003 (50ng). Após a administração do peptídeo observou-se que, tanto a menor dose (25ng) quanto a maior dose (50ng), promoveram a redução significativa do limiar nociceptivo entre a 1ª e a 7ª hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 13,00$) quando comparados ao grupo veículo (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Avaliação do efeito da administração intratecal do peptídeo 3 (PSPD 2003) nas doses (25ng) e (50ng).



Fonte: Autor (2023).

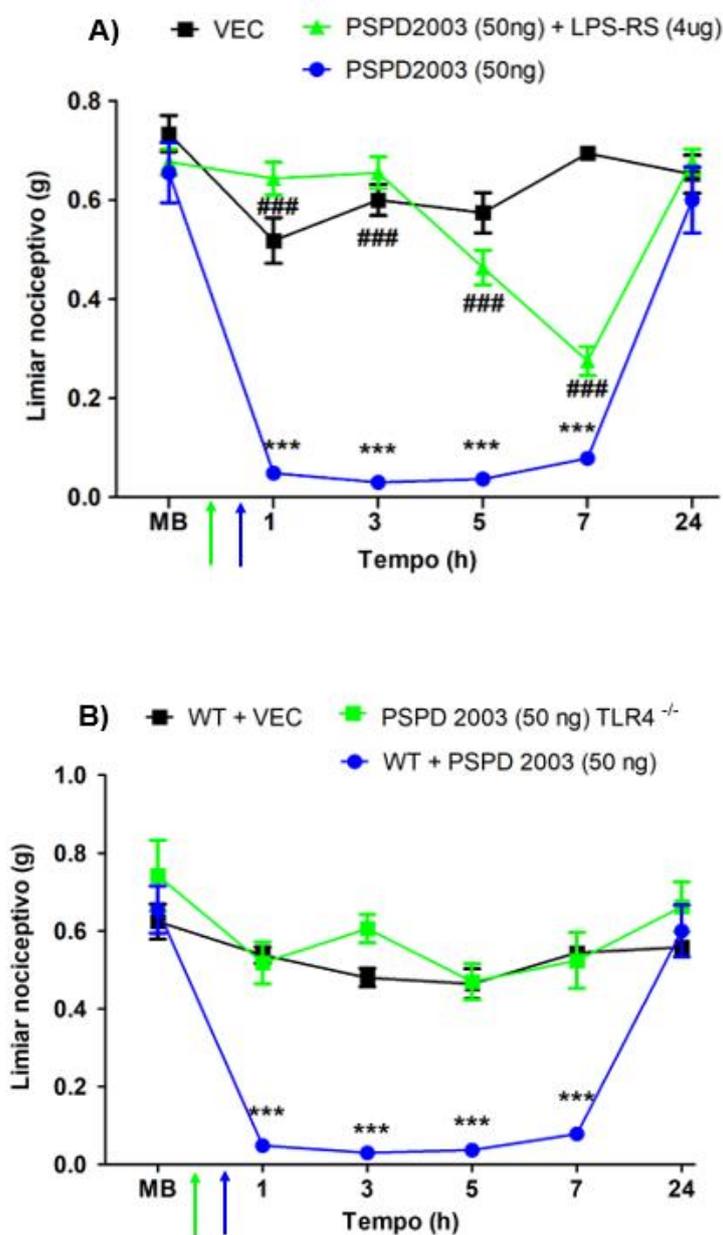
Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC). MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em azul indica a injeção intratecal do PSPD 2003 (50ng) e a seta vermelha indica a injeção na dose (25ng). A chave sobre as setas indica que a injeção de ambas as doses ocorreu no mesmo intervalo de tempo.

5.1.8 PSPD 2003: Avaliação da participação do receptor TLR4 espinhal

Assim como nos peptídeos anteriores, também foi avaliada a participação do TLR4 durante a nocicepção induzida pelo peptídeo 3 a partir da injeção do antagonista LPS-RS (4ug) 30 minutos antes da administração do peptídeo 3 na dose de 50ng. Os resultados mostram que o limiar nociceptivo foi reduzido, significativamente, no grupo tratado com PSPD 2003 (50ng) entre a 1^a e a 7^a hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 26,00$) em comparação com o grupo veículo. Porém, o grupo que recebeu o antagonista LPS-RS 30 minutos antes, apresentou uma reversão significativa da nocicepção desde a 1^a até a 7^a hora ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 26,00$) (Gráfico 8A).

O gráfico 8B mostra a comparação dos grupos veículo (WT + VEC), animais selvagens (WT + PSPD 2003 50ng) e animais *knock-outs* (PSPD 2003 50ng TLR4^{-/-}). Os resultados dos experimentos mostraram que o grupo WT + PSPD 2003 50ng induziu uma redução significativa no limiar nociceptivo mecânico dos animais nas horas 1, 3, 5 e 7 ($p < 0,001$; $F_{2,10} = 9,370$) quando comparado ao grupo controle (WT + VEC). Sugerindo que o TLR4 tenha participado ativamente durante a nocicepção induzida pelo peptídeo 3, o grupo PSPD 2003 50ng TLR4^{-/-} não apresentou redução significativa do limiar nociceptivo dos animais em nenhum dos tempos avaliados.

Gráfico 8 - Avaliação da participação do TLR4 na alodínia mecânica induzida pelo PSPD 2003 (50ng) através da injeção i.t. do antagonista LPS-RS (4ug) (A) e avaliação do limiar nociceptivo de animais TLR4^{-/-} tratados com PSPD 2003 (50ng) (B).



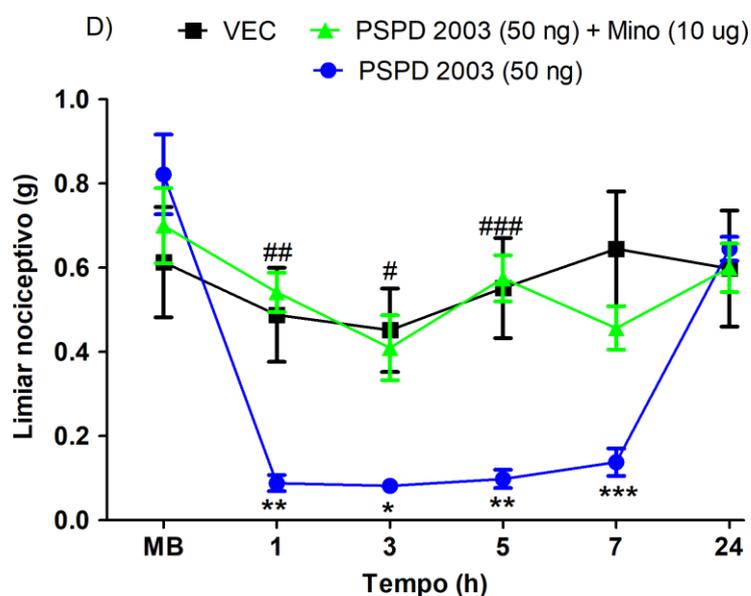
Fonte: Autor (2023).

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 6-5 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC), ### $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo PSPD 2003 (50ng) (A), *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo PSPD 2003 (50ng) TLR4^{-/-} (B). MB: medida basal do limiar nociceptivo. A seta em verde indica a injeção intratecal do antagonista e a seta em azul a injeção do peptídeo.

5.1.9 PSPD 2003: Participação de microglia espinal na nocicepção induzida pelo peptídeo

O envolvimento da micróglia durante a nocicepção está bem esclarecido na literatura e por isso investigamos se ela participa da nocicepção induzida pelo peptídeo 3. Ao avaliar o limiar nociceptivo dos grupos encontramos uma redução significativa induzida pela injeção do PSPD 2003 50ng nas horas 1 e 5 ($p < 0,01$; $F_{2,11} = 10,34$), hora 3 ($p < 0,05$; $F_{2,11} = 10,34$) e hora 7 ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 10,34$), em comparação com o grupo veículo. A administração do inibidor de micróglia (minociclina 10ug), 30 minutos antes da injeção do PSPD 2003 50ng, foi capaz de reverter a redução do limiar nociceptivo nas horas 1 ($p < 0,01$; $F_{2,11} = 10,34$), 3 ($p < 0,05$; $F_{2,11} = 10,34$) e 5 ($p < 0,001$; $F_{2,11} = 10,34$) quando comparado ao limiar nociceptivo do grupo veículo (VEC) (Gráfico D). Os resultados encontrados indicam que a micróglia participa da nocicepção induzida pelo PSPD 2003 (50ng) (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Avaliação do envolvimento da micróglia espinal pela administração i.t. do inibidor (minociclina 10ug) 30 minutos antes do tratamento com o peptídeo na dose de 50ng.



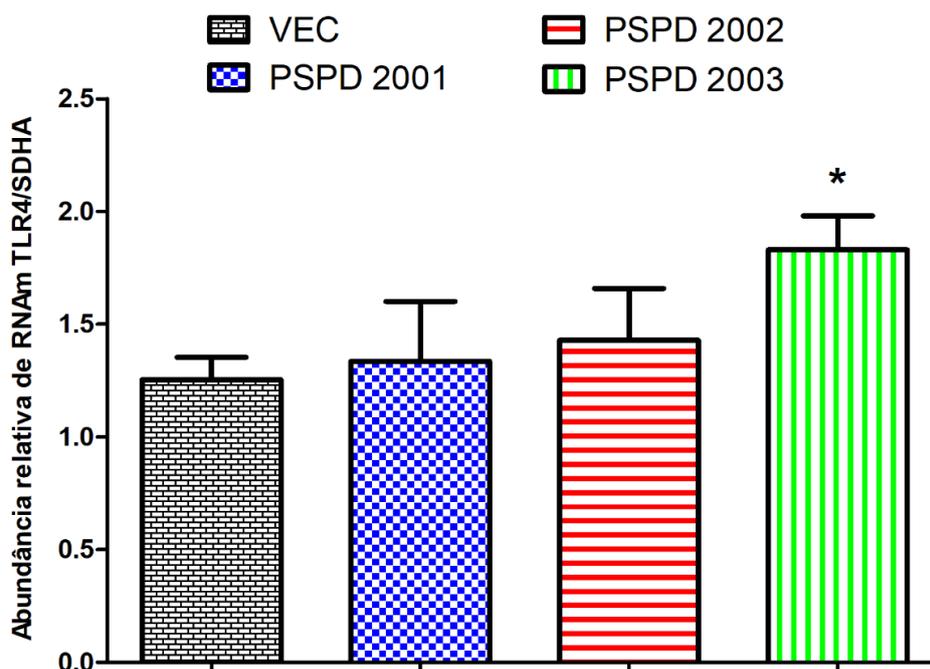
Fonte: Autor (2023).

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo veículo (VEC) e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo PSPD 2003 (50ng). MB: medida basal do limiar nociceptivo. Mino: minociclina. VEC: grupo veículo. A seta em verde indica a injeção intratecal do inibidor e a seta em azul a injeção do peptídeo.

5.2 ENVOLVIMENTO DE GENE RELACIONADO AO RECEPTOR TLR4 ESPINHAL DURANTE A NOCICEPÇÃO

Os resultados encontrados nos experimentos comportamentais até o momento indicam a participação do receptor TLR4 na neuromodulação da alodinia mecânica dos animais. Para verificar se a produção de genes que codificam essa proteína ocorria durante o processo de nocicepção, nós utilizamos a técnica de RT-PCR. O resultado encontrado nos mostra que houve aumento significativo na expressão de gene para TLR4 apenas no grupo tratado com PSPD 2003 (50ng) ($p < 0,05$; $F_{3,10} = 2,268$), enquanto nos grupos tratados com os outros peptídeos o aumento não foi estatisticamente significativo (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Avaliação da expressão gênica do receptor TLR4 na medula espinal durante a alodínia mecânica induzida pelos peptídeos.



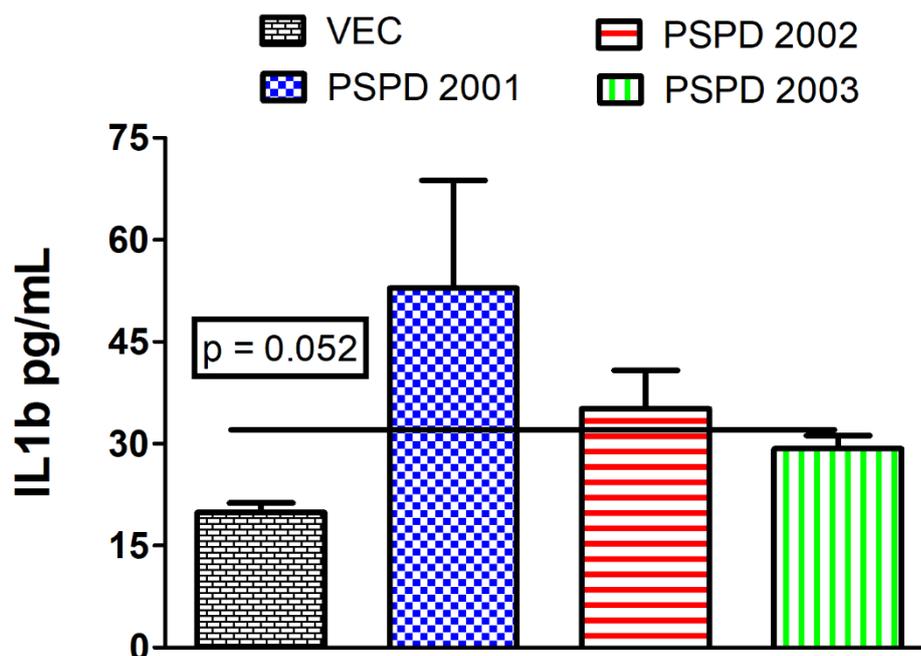
Fonte: Autor (2023).

Legenda: Expressão gênica de TLR4 na medula espinal durante a nocicepção pelos respectivos peptídeos. Os dados representam a média ± E.P.M. teste t student; * $p < 0,05$ indica significância estatística em relação ao grupo controle (VEC); $n=5$ por grupo. RNAm: do inglês *ribonucleic acid messenger*; TLR4: do inglês *Toll like receptor 4*; SDHA: do inglês *succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A*.

5.3 Avaliação do nível espinal da citocina IL-1 β durante a nocicepção

Sabendo que o receptor TLR4 é ativado após detecção de patógenos e que esse processo pode levar à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, a qual contribui para a alodinia mecânica e neuroinflamação do SNC (Grace *et al.*, 2014), nós verificamos se o nível de IL-1 β , poderia estar aumentado à nível espinal durante a nocicepção induzida pelos peptídeos. O gráfico 11 mostra que, apesar de não terem sido estatisticamente significativos os resultados, os dados encontrados com o PSPD 2003 (50ng) mostrou que o nível da citocina ficou muito próximo de apresentar diferença estatística ($p < 0,052$; $F_{3,18} = 1,643$) quando comparado ao grupo controle (VEC).

Gráfico 11 - Avaliação do nível da citocina pró-inflamatória IL-1 β na medula espinal durante a nocicepção induzida pelos peptídeos



Fonte: Autor (2023)

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da concentração de IL-1 β em picogramas por mililitro (pg/mL) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni, porém não foi encontrada diferença estatística entre os grupos quando comparados ao grupo controle (VEC).

6 DISCUSSÃO

É de comum conhecimento que a pandemia mundial causada pelo vírus da COVID-19 é devastadora. Os sintomas mais conhecidos até o momento são febre, problemas respiratórios, mialgias, artralgias, cefaléia, vômito, entre outros. Os elevados níveis de citocinas secretadas durante a síndrome inflamatória multissistêmica provocada pela Covid-19, pode, muitas vezes, ser fatal ao paciente, de modo que a resposta do hospedeiro aos processos inflamatórios é crucial na susceptibilidade às doenças mediadas pelo SARS-Cov2 (Tay *et al.*, 2020).

Nos últimos anos muitos estudos surgiram em torno dos mecanismos da COVID-19 para tentar elucidar como se desenvolvia a doença. Assim também aconteceu com o mecanismo da dor ocasionada pela SARS - CoV 2 e alguns autores encontraram que a mialgia é um sintoma comum observado em pacientes com COVID-19. A prevalência de mialgia varia muito entre os estudos, variando de 3,36% a mais de 64% (Tsai *et al.*, 2020) com uma prevalência estimada em cerca de 19,3% em pacientes infectados (Favas *et al.*, 2020).

Os estudos igualmente encontraram que mesmo os pacientes que não exigiram a hospitalização experimentaram inicialmente o agravamento de circunstâncias neuropáticas subjacentes pelo menos diversas semanas que seguem a infecção inicial, sugerindo que o agravamento da dor neuropática não se limita àqueles que estavam gravemente doentes (Attal *et al.*, 2021).

Assim, o objetivo do estudo foi de investigar a participação do receptor TLR4 em células da glia a nível espinal durante a nocicepção induzida pelos peptídeos da proteína Spike. O vírus responsável pela COVID-19 é composto por quatro proteínas principais, sendo a *Spike* uma delas (Lu *et al.*, 2020). Sabe-se que o receptor *toll-like* (TLR4) expresso na micróglia espinal e nos astrócitos possui uma função importante na regulação da sinalização da dor (Saito *et al.*, 2020) e, sob essa ótica, os resultados encontrados neste estudo até o presente momento sugerem que o receptor TLR4 é um alvo promissor para futuras pesquisas relacionadas aos mecanismos de dor e nocicepção causadas por infecções virais ou bacterianas.

Acrescenta-se que a forte interação do TLR4 com a proteína S do SARS-Cov2, sugere a presença de mecanismos desencadeadores de processos neurodegenerativos e que merecem ser melhor elucidados (Conte, 2021). Corroborando, Choudhury e Mukherjee (2020) demonstraram que há uma ligação

significativa da proteína S especialmente ao TLR4, a qual pode ser um dos fatores que resultam à cascata de citocinas e à neuroinflamação observada em pacientes graves com Covid-19.

Garcia *et al.* (2020) descrevem que ao receptor TLR4 foi atribuído um número cada vez maior de funções que estendem desde o reconhecimento de patógenos para identificação de danos teciduais e promoção do intrínseco “reparo de danos” na dor, distúrbios intestinais, respiratórios e vasculares. Justificando assim a escolha do TLR4 como alvo para a presente pesquisa, onde buscamos entender melhor os mecanismos dos peptídeos 1, 2 e 3 da porção *Spike* do vírus da SARS-CoV-2.

Porém, o potencial neuroinvasivo do SARS-CoV-2, juntamente com a capacidade de interagir fortemente com o TLR4 através da proteína S do SARS-CoV-2, sugere um papel intrigante para este receptor (Conte, 2021). Ainda segundo a autora, uma ativação prolongada e desregulada da sinalização TLR4, além da possível interação direta entre a proteína N do SARS-CoV-2 e α -SYN, pode prejudicar o mecanismo de controle de qualidade da proteína e a proteostase da célula hospedeira. Enfatizando, mais uma vez, a importância de se avaliar o papel da sinalização do TLR4 para a Covid-19.

Os resultados também sugerem que há participação do TLR4 a nível espinal durante a nocicepção induzida pelo PSPD 2001, 2002 e 2003. No entanto, os achados nos experimentos com os animais *knockout* para TLR4 mostraram que o limiar nociceptivo destes animais não sofreram alterações significativas causadas pelos peptídeos da SARS-Cov2. Essa resposta está de acordo com a afirmação de Tanga *et al.* (2005) onde, em ensaios *knockout* para expressão de TLR4 em ratos e culturas de células, encontraram uma atenuação da hipersensibilidade comportamental, diminuição da ativação glial e redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Com o andamento dos experimentos e a obtenção de resultados concretos e expressivos será possível contextualizar esses resultados com outros estudos e achados na literatura.

Quanto ao envolvimento do gene relacionado ao receptor TLR4 durante a nocicepção foi verificado que houve aumento significativo na expressão de genes para esse receptor apenas no grupo tratado com PSPD 2003 (50ng) não havendo diferença estatística entre os demais grupos. Teesalu *et al.* (2009) verificaram que o terminal c da subunidade S1 da proteína Spike gera uma sequência de aminoácidos chamada de “regra da extremidade c” (do inglês *C-end rule*) que podem se ligar aos receptores

NRP-1 e NRP-2 que, por sua vez, são receptores de membrana que regulam processos biológicos incluindo orientação axônica, angiogênese e permeabilidade vascular. Assim também, Moutal *et al.* (2021) demonstraram em seus estudos que a administração intratecal da proteína spike da SARS CoV 2 foi capaz de inibir a via de sinalização VEGF-A/NRP-1 e com isso induzir analgesia. Por esses achados, sugere-se que os grupos tratados com os PSPD 2001 (50ng) e PSPD 2002 (50ng) possam estar interagindo com outros receptores.

Os resultados supracitados se assemelham aqueles relatados em estudo apresentado por Shirato e Kizaki (2021) e por Olajide *et al.* (2022), uma vez que demonstram o envolvimento do TLR4 na indução de respostas pró-inflamatórias em macrófagos de camundongos pela subunidade S1 da proteína *Spike* do SARS-cov2. Zhao *et al.* (2021) também realizaram observações que corroboram a ligação do TLR4 à indução de inflamação em células THP-1. Segundo os autores, a proteína *Spike* é responsável pela ativação das vias de TLR4, induzindo respostas inflamatórias.

O TLR4 é um receptor imune inato encontrado na superfície celular, sendo responsável pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos, desencadeando a produção de interferons tipo I e de citocinas pró-inflamatórias no combate às infecções. Dessa forma, sua expressão é identificada tanto nas células do sistema imunológico como nas residentes de tecidos (Aboudounya; Heads, 2021). Nota-se que os interferons tipo I promovem a dor induzida por vírus através da ação nos neurônios sensoriais, onde as proteínas antivirais induzem uma resposta de sinalização distinta a qual aumenta a excitabilidade nos nociceptores (Barragan-Iglesias *et al.*, 2020), explicando, desse modo, os resultados encontrados quanto ao limiar de nocicepção no presente estudo.

É válido ressaltar, porém, que a ativação do TLR4 pode ser tanto benéfica como prejudicial para o corpo durante a infecção viral (Aboudounya; Heads, 2021). A sinalização do TLR4 é fundamental para a secreção das citocinas antivirais IFN- β , responsável pelo controle da infecção viral (Riad *et al.*, 2011). Por outro lado, a ativação do TLR4 pode ser utilizada pelo vírus SARS-Cov2 para aumentar a expressão de ACE2, facilitando a entrada do patógeno nas células (Aboudounya; Heads, 2021).

A microglia compreende cerca de 5 a 12% das células do sistema nervoso central e está distribuída de forma heterogênea (Lawson *et al.*, 1990) e originam-se dos monócitos derivados da medula que migram durante a fase perinatal (Nakajima &

Kohsaka, 2001). A interação entre as células da glia tem sido estudada no contexto do entendimento de mecanismos envolvidos na nocicepção e estudos têm demonstrado o importante papel de micróglia na iniciação e manutenção da dor crônica em diferentes regiões do SNC responsáveis pelo processamento da dor, como a medula espinal (Cobianchi *et al.*, 2014; Milligan; Watkins, 2009). A microglia expressa uma ampla gama de receptores, incluindo receptores toll-like receptors (TLRs), uma subfamília de receptores de reconhecimento de padrões que reconhecem patógenos invasores e estímulos endógenos prejudiciais para induzir respostas imunes inatas e adaptativas (Kawai *et al.*, 2010). Está bem descrito na literatura o papel do TLR4 em células da glia, participando da neuromodulação da dor neuropática à nível medular (Akira; Takeda, 2004; Chen, 2018; Marrone *et al.*, 2017).

Ao avaliar a participação da micróglia espinal na nocicepção induzida pelos peptídeos da proteína *Spike* (PSPD 2001, 2002 e 2003) foi demonstrado que há uma participação da micróglia espinal durante a nocicepção induzida por esses peptídeos. As micróglia são atores centrais na manutenção da homeostase do sistema nervoso central e na resposta inflamatória (Andrade *et al.*, 2021).

Olajide *et al.* (2022) demonstraram em seu estudo que a subunidade S1 da proteína *Spike* SARS-COV2 recombinante ativou a micróglia BV-2, sendo esse mecanismo observado pelo aumento na expressão proteica de Iba-1, expressa, principalmente, pelo aumento da ativação das células da micróglia. Nesse contexto, sabe-se que a ativação da micróglia BV-2 aumenta a liberação de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , os quais são características da neuroinflamação e são, possivelmente, resultantes da ativação do TLR4.

O aumento da liberação dessa citocina pró-inflamatória (IL-1 β) ocorre como resposta imunológica e desencadeiam os sintomas como febre, tosse, mialgia e coriza (Li *et al.*, 2020). Essa citocina pró-inflamatória também contribui para o desencadeamento da dor, a nível periférico e central. A nível periférico, elas estimulam a liberação de PGE₂ via macrófagos e monócitos, os quais irão facilitar a despolarização do impulso nociceptivo até o sistema nervoso central (Hopkins, 2003; Milligan; Watkins, 2009).

Já a nível central, a citocina é liberada pelas células microgliais e estimulam uma gama de substâncias e neurotransmissores que irão facilitar a transmissão resposta nociceptiva (Milligan; Watkins, 2009), justificando, assim, as respostas

encontradas no presente estudo, em que foi percebido a participação da micróglia no limiar nociceptivo dos camundongos.

Segundo McFarland *et al.* (2021), embora até o momento não tenham sido apresentados estudos dedicados à análise de como o vírus SARS-Cov2 pode impactar diretamente a hipersensibilidade nociceptiva, a extensa hiperinflamação sistêmica observada na COVID-19 tem o potencial de contribuir para a sensibilização desses nociceptores. Ainda, com base nos resultados encontrados e nas evidências sugeridas pela literatura, percebe-se que o impacto da tempestade de citocinas também deve ser considerado um fator impulsionador de neuropatias após a infecção pelo SARS-Cov2, contribuindo para o desenvolvimento de dores crônicas posteriores.

Por fim, indica-se que os achados do presente estudo são interessantes, considerando os papéis desempenhados pela ativação microglial e o subsequente aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios e no consequente surgimento dos sintomas encontrados durante a infecção causada pelo SARS-Cov2, como a dor.

7 CONCLUSÃO

Os resultados indicam a participação do TLR4 e micróglia na redução do limiar nociceptivo induzida pelos peptídeos da porção Spike da SARS COV-2. Os resultados sugerem que os peptídeos da proteína Spike ativam o receptor TLR4 expressos em micróglia, aumentando o nível da citocina pró-inflamatória IL-1 β através do PSD 2003 e contribuindo para o desenvolvimento da dor. Mesmo assim, experimentos futuros serão necessários para aprofundar a investigação dos mecanismos envolvidos como a participação do TLR4, envolvimento da micróglia, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ABOUDOUNYA, M. M.; HEADS, R. J. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 may bind and activate TLR4 to increase ACE2 expression, facilitating entry and causing hyperinflammation. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 14, p. 8874339, 2021. doi: 10.1155/2021/8874339. PMID: 33505220; PMCID: PMC7811571.
- AHMED, M. U. *et al.* Neurological manifestations of COVID-19 (SARS-CoV-2): a review. **Front Neurology**, [S.l.], v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00518>.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, [S.l.], v. 4, n. 7, p. 499–511, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri1391>.
- ALMEIDA, T. F. *et al.* Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. **Brain Research**, [S.l.], v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, 2004.
- AMIRIAN, E. S. Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: current evidence and implications for public health. **International Journal of Infectious Diseases**, [S.l.], v. 95, p. 363–370, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.057>.
- ANDRADE, E. G. *et al.* Microglia fighting for neurological and mental health: on the central nervous system frontline of covid-19 pandemic. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S.l.], v. 15, 2021.
- ATTAL, N. *et al.* Potential for increased prevalence of neuropathic pain after the COVID-19 pandemic. **Pain Reports**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. e884, 2021.
- BEHRENDT, R. *et al.* Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, [S.l.], v. 22, p. 4-27, 2016.
- CHAN, J. F. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, [S.l.], v. 9, p. 221-236, 2020.
- CHEN, G. *et al.* sex-dependent glial signaling in pathological pain: distinct roles of spinal microglia and astrocytes. **Neuroscience Bulletin**, [S.l.], v. 78, n. 1, p. 98–108, 2018.
- CHEN, L. *et al.* RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. **Emerging Microbes & Infections**, [S.l.], v. 9, p. 313-319, 2020.
- CHEN, R. *et al.* The spatial and cell-type distribution of SARS-CoV-2 receptor ACE2 in human and mouse brain. **BioRxiv**, [S.l.], v. 11, p. 573095, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.030650>.

- CHOLERIS, E. *et al.* A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.l.], v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001.
- CHOUDHURY, A.; MUKHERJEE, S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARSCoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. **Journal of Medical Virology**, [S.l.], v. 92, n. 10, p. 2105–2113, 2020.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain. **Annual Review Neuroscience**, [S.l.], n. 32, p. 1–32, 2009.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S.l.], v. 13, p. 167-170, 1980.
- DESANTANA, J. M. *et al.* Definição revisada de dor pela Associação Internacional para o Estudo da Dor: conceitos, desafios e compromisso. **Iasp**, Washington, p. 1–8, 2020.
- DESFORGES, M. *et al.* Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans. **Advances in Experimental Medicine Biology**, [S.l.], v. 807, p. 75–96, 2014. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1777-0_6.
- DESFORGES, M. *et al.* Human coronaviruses and other respiratory viruses: underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? **Viruses**, [S.l.], v. 12, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.3390/v12010014>.
- ELISEI, L. M. S. *et al.* Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. **Inflammopharmacology**, [S.l.], v. 28, n. 6, p. 1537-1551, 2020.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **COVID-19 situation update for the EU/EEA and the UK, as of week 50**. [S.l.]: ECDC, 2020. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/cases-2019-ncov-eueea>. Acesso em: 21 fev. 2021.
- FAVAS, T. T. *et al.* Neurological manifestations of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of proportions. **Neurological Science**, [S.l.], v. 41, n. 12, p. 3437-3470, 2020.
- FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Methods Mol Biology**, [S.l.], v. 1282, p. 1-23, 2015.
- GRACE, P. M. *et al.* Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, [S.l.], v. 14, n. 4, p. 217–231, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3621>.

GRANET, R. **The enemy within**: how SARS-CoV-2 uses our own proteins to infect our cells. [S.l.: s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.cas.org/resources/cas-insights/drug-discovery/covid-19-spike-protein>. Acesso em: 15 nov. 2023.

GUY, C. A.; FIELDS, G. B. Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin681 bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry. **Methods in Enzymology**, [S.l.], v. 289, p. 67-83, 1997.

HARAPN, B. N.; YOO, H. J. Neurological symptoms, manifestations, and complications associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19). **Journal Neurology**, [S.l.], v. 268, n. 9, p. 3059-3071, 2021. doi: 10.1007/s00415-021-10406-y.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, [S.l.], v. 181, p. 271-280, 2020.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Legal Medicine**, [S.l.], v. 5, p. S45-57, 2003.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **European Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 67, n. 2-3, p. 313-316, 1980.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? **Pain**, [S.l.], v. 154, n. SUPPL. 1, p. S10-S28, 2013.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, [S.l.], v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Semin Immunology**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 24-32, 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. **Nat Immunology**, [S.l.], v. 11, p. 373-384, 2010.

KLAASSEN, N. *et al.* Universal retention standard for peptide separations using various modes of high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1588, p. 163-168, 2019.

KONG, E. *et al.* Glycometabolism reprogramming of glial cells in central nervous system: novel target for neuropathic pain. **Front Immunology**, [S.l.], v. 13, p. 861290, 2022. Doi: 10.3389/fimmu.2022.861290.

LACAGNINA, M. J. *et al.* Toll-like receptors and their role in persistent pain. **Pharmacology and Therapeutics**, Houston, v. 184, p. 145-158, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.006>.

LAWSON, L. J. *et al.* Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, [S.I.], v. 39, n. 1, p. 151-170, 1990.

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, [S.I.], v. 47, n. 2, p. 173–180, 2020.

LEONARDI, M.; PADOVANI, A.; McARTHUR, J. C. Neurological manifestations associated with COVID-19: a review and a call for action. **Journal of Neurology**, [S.I.], v. 267, n. 6, p. 1573-1576, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09896>.

LETKO, M. *et al.* Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nat Microbiology**, [S.I.], v. 5, p. 562-569, 2020.

LI, J. Y. *et al.* The epidemic of 2019-novel-coronavirus (2019-nCoV) pneumonia and insights for emerging infectious diseases in the future. **Microbes Infections**, [S.I.], v. 22, n. 2, p. 80-85, 2020.

LIU, Y. C. *et al.*, COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomed Journal**, [S.I.], v. S2319-4170, n. 20, p. 30044-5, 2020.

LOVELL, N. *et al.* Characteristics, Symptom Management, and Outcomes of 101 Patients With COVID-19 Referred for Hospital Palliative Care. **Journal Pain Symptom Manage**, [S.I.], v. S0885-3924, n. 20, p. 30211-16, 2020.

LU, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet**, v. 395, p. 565-574, 2020.

LU, O. F. *et al.* Deprotection reagents in Fmoc solid phase peptide synthesis: moving away from piperidine? **Molecules**, [S.I.], v. 21, n. 11, p. 1542, 2016.

MARRONE, M. C. *et al.* TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. **Nature Communications**, [S.I.], v. 8, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms15292>.

MCFARLAND, A. J. *et al.* Neurobiology of SARS-CoV-2 interactions with the peripheral nervous system: Implications for COVID-19 and pain. **Pain Reports**, [S.I.], v. 6, n. 1, 2021.

MEI, J. *et al.* Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. **Science Reports**, [S.I.], v. 8, n. 1, p. 3256, 2018.

MELZACK, R.; WALL, P. D. A gate control system modulates sensory input from the skin before it evokes pain perception and response. **Pain mechanisms: a new theory**, [S.I.], v. 150, n. 3699, p. 971–979, 1965.

MIKA, J. *et al.* Importance of glial activation in neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, [S.I.], v. 716, n. 1–3, p.106–119, 2013.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neuroscience**, [S.l.], v. 10, p. 23-36, 2009.

MORSE, J. S. *et al.* Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. **Chembiochemistry**, [S.l.], v. 21, p. 730-738, 2020.

MOUTAL, A. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein co-opts VEGF-A/neuropilin-1 receptor signaling to induce analgesia. **Pain**, [S.l.], v. 162, n. 1, p. 243-252, 2021.

NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 130, n. 2, p. 169-175, 2001.

OAKLANDER, A.L. Chronic pain. **ACP Medicine**, [S.l.], p.1-19, 2011.

OLAJIDE, O.A. *et al.* SARS-Cov-2 spike glycoprotein s' induces neuroinflammation in BV-2 microglia. **Molecular Neurobiology**, [S.l.], v.59, p.445-458, 2021.

OXFAM INTERNATIONAL. **Dignity not destitution**. [S.l.: s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.oxfam.org/en/research/dignity-not-destitution>. Acesso em: 15 fev. 2021.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives of Pharmacology and Therapeutics**, [S.l.], v. 229, n. 2. p. 327-336, 1977.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Forced swimming in rats; hypothermia, immobility and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 57, p. 431-436, 1979.

RAJA, S.N. *et al.* The revised International Association for the 82 Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [S.l.], v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

SAITO, O. *et al.* Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E2 and TNF. **British Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 60, n. 7, p. 1754-1764, 2010.

SANTOS, L. M. O. *et al.* Bronchial responsiveness in an elastase-induced mouse model of emphysem. **Respir Physiol Neurobiology**, [S.l.], v. 194, p. 9-14, 2014.

SHIRATO, K.; KIZAKI, T. SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. **Heliyon**, [S.l.], p. e06187, 2021.

SILVA, V. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. **Brain Behavior and Immunity**, [S.l.], v. 45, p. 109-117, 2015.

- SONCINI, R. *et al.* Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neurosci Letters**, [S.I.], v. 516, p. 114-118, 2012.
- SNEDDON, L. U. Comparative physiology of nociception and pain. **Physiology**, [S.I.], v. 33, n. 1, p. 63–73, 2018.
- STEINER, A. A. *et al.* The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. **Journal Physiology**, [S.I.], v. 589, p. 2415-2431, 2011.
- STEINMAN, L. Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. **Journal of Clinical Investigation**, [S.I.], v. 118, n. 11, p. 3557-3563, 2008.
- STERU, L. *et al.* The Tail Suspension Test: a New Method for Screening Antidepressants in Mice. **Psychopharmacology**, [S.I.], v. 85, p. 367-370, 1985.
- TAY, M. Z. *et al.* The trinity of covid-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature**, [S.I.], v. 20, p. 363-374, 2020.
- TEESALU, T. *et al.* C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. **Proc Natl Acad Science**, [S.I.], v. 106, n. 38, p. 16157-16162, 2009.
- TSAI, S. T *et al.* The neurologic manifestations of coronavirus disease 2019 pandemic: a systemic review. **Front Neurology**, [S.I.], v. 11, 2020.
- VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Tropical Medicine and International Health**, [S.I.], v. 25, n. 3, p. 278-280, 2020.
- XIE, P. *et al.* Severe COVID-19: A review of recent progress with a look toward the future. **Frontiers Public Health**, [S.I.], v. 8, 2020.
- ZHAO, E. *et al.* dexmedetomidine alleviates CCI-induced neuropathic pain via inhibiting HMGB1-mediated astrocyte activation and the TLR4/NF- κ B signaling pathway in rats. **Neurotoxicity Research**, [S.I.], v. 38, n. 3, p. 723–732, 2020.
- ZHAO, Y. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR4. **Cell Research**, [S.I.], v. 31, p. 818-820, 2021.
- ZHOU, S. *et al.* CT Features of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia in 62 Patients in Wuhan, China. **American Journal of Roentgenology**, USA, v.214, p.1287-1294, 2020.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. GLIA: A novel drug discovery target for clinical pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.I.], v. 2, n. 12, p. 973–985, 2003.
- WESSELY, S. *et al.* Postinfectious fatigue: prospective cohort study in primary care. **Lancet**, London, v. 345, p. 1333-1338, 1995.

ANEXO I

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TLR4 NA NOCICEPÇÃO, COMPORTAMENTO DOENTIO E ALTERAÇÕES REPIRATÓRIAS INDUZIDAS POR PEPTIDEOS DA PORÇÃO SPIKE DA SARVS-COV2 EM CAMUNDONGOS**, registrada com o nº **0010/2021**, sob a responsabilidade de **Giovane Galdino de Souza**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/04/2021 a 01/03/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / C57bl/6j	204	204	0	Biotério central da unifal

Alfenas, 07 de Agosto de 2023

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG