



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIA BORGES PAES LEMES

**ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE ATP MEDIADA POR PANX1 E
EXOCITOSE NO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL: EFEITO SOBRE A
NOCICEPÇÃO E HIPERALGESIA**

CAMPINAS

2021

JULIA BORGES PAES LEMES

**ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE ATP MEDIADA POR PANX1 E
EXOCITOSE NO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL: EFEITO SOBRE A
NOCICEPÇÃO E HIPERALGESIA**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Doutora em Biologia Funcional e
Molecular na área de Fisiologia.*

Orientador: PROF DR. CARLOS AMILCAR PARADA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA JULIA BORGES PAES LEMES, E
ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR
CARLOS AMILCAR PARADA.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L543e Lemes, Julia Borges Paes, 1992-
Estudo da liberação de ATP mediada por Panx1 e exocitose no gânglio da raiz dorsal : efeito sobre a nocicepção e hiperalgesia / Julia Borges Paes Lemes. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dor. 2. Gânglios espinhais. 3. Adenosina trifosfato. 4. Hiperalgesia. 5. Exocitose. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of ATP release mediated by Panx1 and exocytosis on dorsal root ganglion : effect on nociception and hyperalgesia

Palavras-chave em inglês:

Pain

Ganglia, Spinal

Adenosine triphosphate

Hyperalgesia

Exocytosis

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Amanda Ferreira Neves

Cassia Regina da Silva

Gisele Picolo

Luana Fischer

Data de defesa: 20-08-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2212-6803>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4730969051411543>

Campinas, 20 de agosto de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Dra. Amanda Ferreira Neves

Dra. Cássia Regina Silva

Dra. Gisele Pico

Dra. Luana Fischer

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia.

*Dedico este trabalho ao meu Tio Alexandre e ao meu
Primo Pablo que foram levados pela Pandemia. Que
toda dor se transforme em esperança.*

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas**, ao **Instituto de Biologia**, ao **Departamento de Biologia Estrutural e Funcional** e à **Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular** pela estrutura e suporte concedidos durante o meu doutoramento;

Ao meu amigo e orientador **Prof. Dr. Carlos Parada**, pela confiança no meu trabalho, pela orientação e apoio científico. Obrigada por compartilhar comigo os desafios e alegrias durante este período da minha vida. Nunca esquecerei de todos os gestos, conversas e momentos vividos. Obrigada por ser esta pessoa generosa, atenciosa e acolhedora.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro para a realização do doutorado (Processo nº 2017/19105-8) e pela realização estágio no exterior (BEPE Processo nº 2019/15255-0);

À minha coorientadora, Profa. **Dra. Celina Lotufo**, pelas colaborações, discussões, incentivos e amizade. Que possamos continuar trabalhando juntas por muito tempo.

Ao técnico **César Bissoto** pela dedicação ao nosso laboratório e cuidado com os animais do biotério. À técnica **Dra. Catarine Nishijima** por toda ajuda nos experimentos, discussões e ideias. Pela paciência e carinho dado a mim durante todo o meu doutorado.

À **Prof. Dra. Sylvia Suadicani** e **Marcia Maldonado** pelo acolhimento em Nova Iorque e pela contribuição científica a este trabalho. Thank you very much!

À banca examinadora, **Profa. Dra Amanda Ferreira Neves**, **Profa. Dra Cássia Regina da Silva**, **Profa. Dra. Gisele Picolo**, **Profa. Dra. Luana Fischer**, **Dra. Elayne Vieira Dias**, **Dra. Louise Faggionato Kimura Vieira**, **Profa. Dra. Taís de Campos Lima**, pelo aceite do convite e pela avaliação da minha tese de doutorado.

Aos meus amigos do laboratório, **Nathalia, Kiko, Anna Lethícia, Cecília, Ana Carolina, Fabi, Tassia**, por deixarem meus dias mais leves, divertidos e felizes. Trabalhar ao lado de vocês deixa tudo mais colorido. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho e serão levados para resto da minha vida.

À **Dra. Juliana Ruas** e ao **Prof. Dr. Roger Castilho** pela paciência e ajuda nos ensaios de quantificação de ATP. Obrigada por me receber em seu laboratório.

Ao meu time de **Vôlei da UNICAMP-LAU** por me permitir tantos momentos alegres e divertidos. Vocês fizeram parte da minha jornada. Obrigada Voleibol por ser meu refúgio e proporcionar amizades incríveis.

Muito obrigada à minha mãe **Kátia** e à minhas irmãs **Carolina** e **Marina** que mesmo longe se fizeram presentes em minha vida. Obrigada por sorrir e chorar comigo. Vocês são meu porto seguro e meu alicerce.

Obrigada a minha família maravilhosa, **Pai, Primos, Primas, Tios, Tias e Avó** pelo apoio e amor. Meu orgulho e minha inspiração.

Ao meu marido e colega de trabalho, **Kauê**, por estar ao meu lado em todos os momentos, me ajudando a superar cada desafio. Obrigada pela parceria e carinho. A realização deste trabalho teria sido mais difícil sem seu apoio. Você faz parte desta conquista.

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

RESUMO

A molécula de ATP (adenosina trifosfato) conhecida primordialmente como uma fonte de energia intracelular, atua como uma importante molécula sinalizadora no meio extracelular em diversos processos fisiológicos e patológicos do Sistema Nervoso. Nos últimos anos, essa molécula se destacou na transmissão da informação nociceptiva por interagir com os canais de membrana dos nociceptores, ocasionando a redução do limiar de ativação e modificando a excitabilidade neuronal. O gânglio da raiz dorsal (GRD) constitui um importante sítio de modulação da dor. Estudos apontam que o ATP é o principal mediador da comunicação entre neurônio e glia no GRD. A molécula de ATP pode ser liberada para o meio extracelular através da exocitose de vesículas e/ou por canais de membrana Panexina1 (Panx1). Ainda há poucos estudos sobre a sinalização mediada por ATP no GRD, o que impede a compreensão mais aprofundada dos mecanismos periféricos envolvidos na dor. Assim, o presente trabalho teve como objetivo compreender a liberação de ATP através dos canais Panx1 e da exocitose de vesículas no GRD e, estudar o efeito desta liberação sobre o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória, neuropática e nocicepção aguda de fibras C. Foram realizados experimentos comportamentais de dor utilizando inibidores farmacológicos para canais Panx1 e de exocitose injetados diretamente no GRD (L5) de ratos. Camundongos knockout Panx1 (KO) também foram usados em modelos de nocicepção e hiperalgesia. Ensaios histológicos e culturas primárias do GRD foram realizadas para o estudo da localização e quantificação dos níveis extracelulares de ATP, respectivamente. Nos ensaios de imunofluorescência do GRD (L5) observamos a presença de estoques de ATP no corpo neuronal de fibras A, fibras C e, em células gliais. Os canais Panx1 expressos em neurônios foram co-localizados com estoques de ATP. Nos ensaios *in vitro* com culturas primárias do GRD, a inibição da exocitose vesicular reduziu a liberação extracelular de ATP induzido pelo tratamento agudo com KCl, porém, o mesmo efeito não foi observado com a inibição de canais Panx1 nas células. O tratamento com a citocina IL-1 β também resultou no aumento dos níveis extracelulares de ATP, mas, não foi reduzido com a inibição da exocitose. O tratamento com capsaicina e PGE₂ em células do GRD não promove o aumento significativo de ATP extracelular. A inibição farmacológica ou genética de canais Panx1 resultou em uma diminuição significativa da hiperalgesia mecânica induzida pela injeção de carragenina na pata. Ademais, camundongos Panx1-KO não desenvolveram hiperalgesia mecânica com uma única injeção sistêmica de Paclitaxel e apresentaram uma resposta nociceptiva significativamente menor frente ativação de fibras C. Resposta semelhante foi observada em ratos pré-tratados com o inibidor para Panx1. A inibição farmacológica da exocitose de vesículas no GRD (L5) reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina, PGE₂ e IL-1 β . Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que canais Panx1 e, principalmente, o processo de exocitose de vesículas, no GRD, participam da hiperalgesia inflamatória e da nocicepção aguda de fibras C. Os novos achados indicam que no GRD existe, de fato, um processo de comunicação tão importante quanto as sinapses presentes no sistema nervoso central.

Palavras-chaves: dor, gânglio da raiz dorsal, ATP, Panx1, exocitose.

ABSTRACT

The ATP (adenosine triphosphate), primarily known as an intracellular energy source, play an important role as a signaling molecule on the extracellular environment under various physiological and pathological processes at the Nervous System. In recent years, ATP has stood out in the transmission of nociception by interacting with the membrane channels of nociceptors, reducing the activation threshold, and modifying neuronal excitability. The dorsal root ganglion (DRG) is an important site for pain modulation. Studies showed that ATP is the main mediator of communication between neurons and glia in DRG. The ATP molecule can be released to extracellular space through membrane channels called Panexin1 (Panz1) and/or by vesicle exocytosis. Despite this, there are still few studies on ATP-mediated signaling in DRG, which prevents a deeper understanding of the peripheral mechanisms involved in pain modulation. Thus, the present work aimed to understand the release of ATP through the Panx1 channels and by exocytosis of vesicles in the DRG. Also, to study the effect of this release on the development of inflammatory and neuropathic hyperalgesia, as well as the acute C-fiber nociception. Behavioral pain experiments were performed using pharmacological inhibitors for Panx1 channels and exocytosis directly in the DRG (L5) of rats. In addition, it was used transgenic mice with global Panx1 depletion (KO) to nociception and hyperalgesia models. Histological approach and DRG primary cell cultures were performed to study the localization and quantification of extracellular levels of ATP, respectively. In immunofluorescence assays of the DRG (L5), we observed the presence of ATP stocks in A fiber, C fibers neuronal soma and on glial cells. Panx1 channels expressed in sensory neurons were co-localized with ATP stocks. *In vitro* assays with DRG primary cultures, the inhibition of vesicular exocytosis reduced the extracellular release of ATP upon of acute treatment with KCl, however, the same effect was not observed with the inhibition of Panx1 channels in the cells. Treatment with the IL-1 β cytokine resulted in increased extracellular ATP release, which was not reduced by the exocytosis inhibition. Capsaicin and PGE₂ treatment on DRG cells did not induce a significant ATP release increase. The pharmacological or genetic inhibition of Panx1 channels resulted in a significant decrease in mechanical hyperalgesia induced by the injection of carrageenan into the paw. In addition, Panx1-KO mice did not development neuropathic pain with a single systemic injection of Paclitaxel and showed a lower nociceptive response by activating C fibers (capsaicin test). A similar response was seen in rats pretreated with the inhibitor for Panx1. Pharmacological inhibition of vesicle exocytosis on DRG (L5) also reduced the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan, PGE₂ and IL-1 β injections. Therefore, the data obtained in this work suggest that Panx1 channels and, mainly, vesicle exocytosis process participate on inflammatory pain and acute C-fiber nociception. Regarding pain signal transmission, our results indicate that there is, in fact, a communication process in DRG which is as important as the synapses present in the central nervous system.

Keywords: pain, dorsal root ganglion, ATP, Panx1, exocytosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinal sensorial de dor decorrente de uma lesão tecidual periférica.....	19
Figura 2: Gânglio da raiz dorsal.....	22
Figura 3: Método de injeção intraganglionar (i.gl.)	36
Figura 4: Teste de avaliação do limiar mecânico da pata: von Frey eletrônico.....	38
Figura 5: Neurônios e células gliais do GRD possuem estoques de ATP.....	39
Figura 6: Canais Panx1 são co-localizados com estoques intracelulares de ATP no GRD-L5.....	40
Figura 7: TRPV1 é co-marcado com células Quin ⁺ no GRD-L5.....	41
Figura 8: NF200 é co-marcado com células Quin ⁺ no GRD-L5.....	42
Figura 9: ATP é liberado por células do GRD após estimulação com KCl.....	43
Figura 10: ATP é liberado por células do GRD após tratamento com IL-1 β	44
Figura 11: A inibição farmacológica ou a deleção para Panx1 reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela Cg.....	47
Figura 12: A inibição farmacológica ou a deleção para Panx1 não reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE ₂	49
Figura 13: Quantificação dos níveis da proteína Panx1 em culturas primárias do GRD tratadas com PGE ₂	50
Figura 14: Inibição farmacológica de Panx1 no GRD reduziu a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina. Animais Panx1-KO apresentaram baixa resposta nociceptiva frente a capsaicina.....	51
Figura 15: Animais Panx1-KO não desenvolvem hiperalgesia mecânica após o tratamento com uma injeção de Paclitaxel.....	53
Figura 16: Camundongos fêmeas WT apresentam maior intensidade hiperalgésica na quinta hora após tratamento com Paclitaxel.....	54
Figura 17: Camundongos Panx1-KO também desenvolvem hiperalgesia crônica induzida por Paclitaxel.....	55
Figura 18: A exocitose de vesículas no GRD participa do desenvolvimento da hiperalgesia infamatória e da nocicepção.....	57

Figura 19: Avaliação comparativa do efeito anti-hiperalgésico do tratamento de Panx + Vac-1 na hiperalgisia induzida por carragenina, PGE ₂ e sobre a nocicepção aguda por capsaicina.....	59
Figura Sup. 1: Níveis de ATP extracelular sobre tratamento isolado dos inibidores Vac-1 e ¹⁰ Panx.....	70
Figura Sup. 2: Ensaio de MTT em culturas primárias do GRD.....	70
Figura Sup. 3: Avaliação do limiar mecânico basal da pata de ratos tratados com os inibidores.....	71
Figura Sup. 4: Avaliação do limiar mecânico basal da pata de camundongos WT e KO.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINES - antiinflamatórios não esteroidais

Anova - análise de variância

ATP - adenosina trifosfato

A β - fibras A beta

A δ - fibra A delta

Ca²⁺ - íons cálcio

CASK - *calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*

CCI - *chronic constriction injury*

CFA - Adjuvante Completo de Freund

Cg - carragenina

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CSGs - células satélites gliais

DMEM - Meio Eagle modificado de Dulbecco - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

EP - receptor para prostaglandina do tipo E

GFAP- Glial fibrillary acidic protein

GRD - gânglio da raiz dorsal

GT - gânglio trigeminal

i.gl. - intraganglionar

i.p. - intraperitoneal

i.pl. - intraplantar

i.t. - intratecal

IASP - International Association for Study of Pain (Associação Internacional para o Estudo da dor)

IL-1 β - interleucina 1 β

IL-6 - interleucina 6

kDa - quilodaltons

L5 - vértebra lombar 5

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

Nav 1.7 - Canal de Sódio dependente de Voltagem – Subtipo 1.8

Nav 1.8 - Canal de Sódio dependente de Voltagem – Subtipo 1.8

Nav 1.9 - Canal de Sódio dependente de Voltagem – Subtipo 1.9

NGF – fator de crescimento do nervo

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

Panx1 - Panexina 1

PFA - paraformoldeído

PGE₂ - prostaglandina do tipo E2

Quin - *Quinacrine*

SNC - sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

TNF α - fator de necrose tumoral α

TRKA - Receptor De Tirosina Quinase A

TRPV1 - Receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1

Vac-1 - *Vacuolin-1*

$\alpha\beta$ meATP - α,β -metileno ATP

Δ - delta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	Dor: aspectos fisiológicos.....	16
1.2.	Hiperalgisia inflamatória e neuropática	20
1.3.	Gânglio sensorial	21
1.4.	Comunicação intercelular no gânglio sensorial	23
1.5.	Sinalização mediada por ATP.....	25
1.6.	Panexinas	27
2.	OBJETIVO GERAL	29
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1.	Animais.....	29
4.2.	Drogas utilizadas.....	30
4.5.	Ensaio de marcação intracelular de ATP e Imunofluorescência.....	31
4.6.	Cultura primária do gânglio da raiz dorsal	32
4.7.	Quantificação de ATP extracelular em culturas primárias do GRD	32
4.8.	Ensaio de Viabilidade Celular	34
4.9.	Extração de proteína e Western Blot	34
4.10.	Inoculação de drogas pelo método de injeção direta no gânglio L5 de ratos	35
4.12.	Modelo animal de neuropatia induzida por Paclitaxel.....	37
4.13.	Teste do limiar nociceptivo mecânico da pata: von Frey eletrônico.....	37
4.14.	Análise estatística	38
5.	RESULTADOS	39
5.1.	Células do GRD apresentam estoques vesiculares de ATP	39
5.2.	ATP é liberado pelas células do GRD sob determinadas condições.....	42
5.3.	Panx1 participa do desenvolvimento da hiperalgisia mecânica induzida por Carragenina.....	45
5.4.	Canais Panx1 parecem não participar da hiperalgisia induzida pela PGE ₂	48
5.5.	Resposta nociceptiva de fibras C é dependente de canais Panx1.	50
5.6.	Animais Panx1-KO apresentam reduzida hiperalgisia com uma dose de paclitaxel	52

5.7. A exocitose de vesículas no GRD está envolvida no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória e na nocicepção pela capsaicina.	56
5.8. Canais Panx1 e a exocitose de vesículas no GRD parecem ocorrer de maneira dependente no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória	58
6. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÃO GERAL.....	69
9. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	70
10. REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO 1 - Certificado CEUA: 4566-1/2017.	89
ANEXO 2 - Certificado Adendo CEUA: 4566-1(A)/2019.	90
ANEXO 3 - Certificate IACUC: 00001131.	92
ANEXO 4 - Declaração de direitos autorais:	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor: aspetos fisiológicos

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável e angustiante que, na maioria dos casos, é resultante de uma lesão tecidual. Ela constitui um dos componentes essenciais na defesa corporal, funcionando como um alerta de perigo sobre a ocorrência de estímulos lesivos provenientes do meio externo ou do próprio organismo. O papel primordial da dor é fornecer um rápido aviso ao Sistema Nervoso Central para que este envie uma resposta motora rápida de esquiva ou recuo visando manter a integridade física do indivíduo. Nesse sentido, a dor é uma característica primitiva essencial para a sobrevivência. Em casos raros, como em condição de insensibilidade congênita, o indivíduo não apresenta a capacidade de percepção da dor, resultando em sérios problemas para sua saúde e, geralmente, esses indivíduos não ultrapassam a infância (Lent, 2010).

A dor é um fenômeno perceptivo, complexo, subjetivo e multidimensional. Ela envolve dimensões sensorial-discriminativa e afetivo-motivacional. O componente sensorial-discriminativo da dor se refere à percepção e detecção do estímulo nocivo quanto a sua intensidade, localização, duração, padrão temporal e qualidade. O componente afetivo-motivacional diz respeito ao componente emocional da dor, percebido como sofrimento (Julius & Basbaum, 2001). Assim, a dor vem acompanhada por uma forte experiência emocional de valência negativa, a qual é percebida de diversas maneiras por cada indivíduo e em diferentes condições. O aspecto biológico, fisiológico e os fatores sociais exercem influências sobre a percepção da dor. Atualmente, as pesquisas têm evidenciado a relação entre dor, estresse e depressão (Pagliusi et al., 2020; Piardi et al., 2020). Tais aspectos podem atuar significativamente nas vias sensoriais de dor, modulando o sinal nociceptivo e consequentemente modificando a sua percepção.

A dor possui um sistema sensorial próprio capaz detectar, transmitir e interpretar os estímulos nocivos. Este processo envolve diferentes estruturas, células, canais e moléculas que se interagem conforme determinadas condições fisiológicas e/ou patológicas (Basbaum e Jessell, 2000). As células especializadas na detecção do estímulo nocivo são denominadas de nociceptores. Eles consistem em neurônios sensoriais primários que são ativados por estímulos capazes de provocar danos ao tecido. Por este motivo, apresentam alto limiar de ativação que se diferem das demais classes de células nervosas sensoriais (Julius & Basbaum, 2001).

Os nociceptores são neurônios do tipo pseudounipolares apresentando dois ramos axonais, um braço se estende para periferia (pele, músculos, vísceras e outros órgãos) e o outro segue para

a medula espinhal (corno dorsal). As terminações nervosas dos nociceptores podem ser ativadas por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos e, em alguns casos, respondem à dois ou mais estímulos ao mesmo tempo (Basbaum e Jessell, 2000). Alguns deles apresentam uma ou mais camadas de mielina ao redor do axônio (denominadas de fibras A) que favorecem para uma condução mais rápida quando se comparado as fibras que não possuem a camada de mielina (denominadas fibras C). As fibras A se subdividem em 2 subtipos: A β e A δ . O tipo A β participa quase que exclusivamente de respostas táteis inócuas, enquanto que as fibras A δ à repostas mecânicas nocivas, tal como as fibras C (Basbaum e Jessell, 2000; Liu et al., 2001) [Tabela 1].

Tipo de fibra nervosa	Características	Velocidade	Função
Aβ	- Mielinizadas - Largo diâmetro	Alta	- Estímulos táteis - Propriocepção
Aδ	- Pouco mielinizada - Médio diâmetro	Média	-Nocicepção: Estímulos térmicos, mecânicos e químicos
C	- Não mielinizadas - Pequeno diâmetro	Lenta	-Nocicepção: Estímulos térmicos, mecânicos intensos e químicos

Tabela 1: Fibras sensoriais primárias: característica, velocidade e função. Adaptado do Livro “Cem bilhões de neurônios” - Roberto Lent, 2010.

As fibras A δ são finamente mielinizadas, de médio diâmetro (2,0 a 6,0 μm), com velocidade de condução média entre 5 e 30 m/s e correspondem aproximadamente a 13% das fibras de dor na pele. Esse tipo de fibra está associado a dor rápida e forte que levam informação de nociceptores térmicos ou mecânicos danificados (Basbaum e Jessell, 2000). As fibras C, não mielinizadas, são de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), com velocidade de condução menor (0,5 a 2 m/s) e correspondem a 87% das fibras condutoras da informação dolorosa presentes na pele. São responsáveis pela dor lenta e difusa (Brenneis et al., 2013; Julius & Basbaum, 2001; Millan, 1999) [Tabela 1]. A maioria dos nociceptores associados a fibra C são polimodais, respondendo a estímulos térmicos e mecânicos nocivos (Raja et al., 1988). Todavia, ela também respondem a estímulos químicos nocivos tais como a capsaicina, o ingrediente pungente presentes nas pimentas ardentes (Millan, 1999).

As fibras C podem ainda ser classificadas em duas subdivisões, de acordo com a sua função e expressão de receptores. A primeira refere-se a população peptidérgica que contém a substância P como neurotransmissor peptídico e expressa TrkA, o receptor tirosina-quinase, com

elevada afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF) (Snider & McMahon, 1998). A segunda população não expressa a substância P ou TrkA, mas pode ser marcado seletivamente com o α -D-Galactosil-isolectina (IB4) (Basbaum et al., 2009). Esta classificação funciona como um marcador molecular adicional para a identificação das células neuronais.

As fibras A δ se projetam para lâmina I e para lâmina V do corno dorsal da medula espinhal. Já as fibras A β , de baixo limiar e maior velocidade, se projetam para lâminas mais profundas como: III, IV e V. As fibras C se projetam mais superficialmente para lâmina I e II. Dessa maneira, a lâmina I e II está relacionada à respostas de estímulos nocivos, lâmina III e IV está associada a estimulação inócua e, lamina V recebem os dois tipos de estímulos (Basbaum et al., 2009).

No organismo existem também nociceptores que são chamados de silenciosos (*silent nociceptors*) que passam a responder a um novo tipo de estímulo quando sofrem um processo de sensibilização, em sua maioria, em resposta a uma lesão tecidual (Julius & Basbaum, 2001). Essas alterações refletem a expressão de receptores presentes na membrana dos neurônios sensoriais.

Os terminais nervosos dos nociceptores expressam em sua membrana canais iônicos voltagem-dependente e ligantes-dependente, tais como: TRPV1, TRPA1, Nav1.7, Nav1.8, e Nav1.9, os quais, são elementos essenciais para a transdução do estímulo nocivo. Devido a essa variedade de expressão molecular, uma mesma célula pode ser capaz de responder a múltiplos estímulos sensoriais e mediar resultados funcionais distintos (Pinho-Ribeiro et al., 2017).

A ativação desses canais iônicos desencadeia sinais elétricos que resultarão na liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos, como: glutamato, substância P e proteína associada ao gene da calcitonina (CGRP) (Millan, 1999). Esses mediadores ativam seus respectivos receptores nos terminais pós-sinápticos dos neurônios secundários, os quais, cruzam para o lado contralateral da medula espinhal e enviam projeções para porções superiores do sistema nervoso central, onde ocorre a percepção da dor. Um subconjunto desses neurônios de projeção transmite o sinal para o córtex via tálamo, informando a localização e intensidade do estímulo de dor. Outro grupo de neurônios projetam-se para córtex cingulado e insular através do tronco cerebral, o qual está relacionada ao componente emocional (desagrabilidade) da dor (Figura 1) (Basbaum et al., 2009).

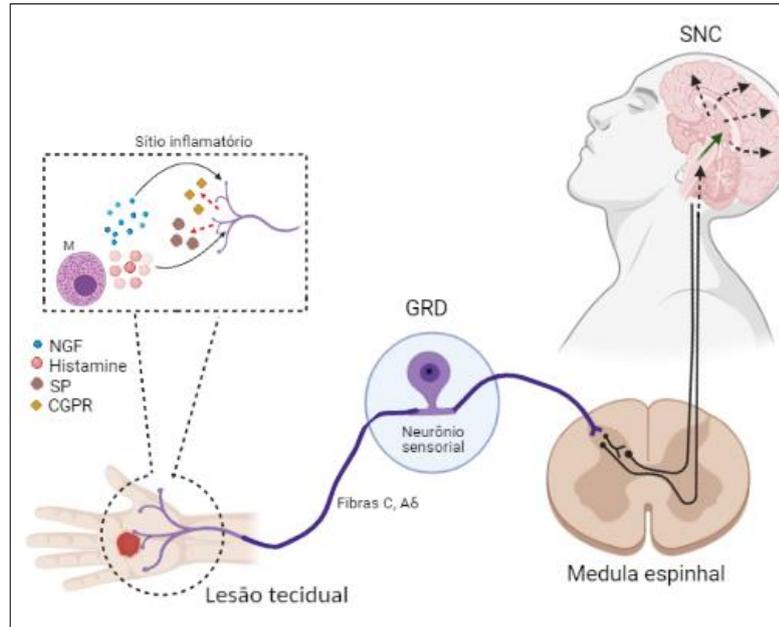


Figura 1: Sinal sensorial de dor decorrente de uma lesão tecidual periférica. Quando se há um dano tecidual, os nociceptores são ativados e liberam nos terminais periféricos substância P e CGRP. Isso resulta na degranulação de mastócitos que liberam histamina, excitando os nociceptores. Ocorre também um aumento da liberação de NGF pelo tecido que atua sobre o terminal nociceptivo. O estímulo é então detectado e encaminhado para o gânglio da raiz dorsal até o corno dorsal da medula espinhal. Neste local ocorre uma sinapse com interneurônios ou neurônios de segunda que cruzam a medula e acende para áreas superiores do SNC. No tálamo o sinal sensorial de dor é redistribuído por outras regiões do encéfalo. Fonte: autoria própria, esquema realizado pelo site Biorender.

Embora a dor apresente um papel protetivo, ela se torna prejudicial quando afeta significativamente o bem-estar do indivíduo, sendo então necessário o tratamento imediato da mesma. A dor pode ocorrer de forma aguda ou persistente resolvendo-se em minutos, horas ou dias, ou pode se estender por meses e até anos, tornando-se em um processo crônico. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) estima que 1 em cada 5 pacientes sentem dor e que 1 em cada 10 são diagnosticados com dor crônica a cada ano. Na clínica é frequente o uso de analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) para alívio da dor. Em casos de dor crônica utiliza-se o tratamento com opioides (Spray & Hanani, 2019). Entretanto, ainda existe uma alta procura de fármacos mais eficientes no alívio dos sintomas de dor e na melhora da qualidade de vida dos pacientes. As informações científicas a respeito dos mecanismos químicos e moleculares das diferentes drogas analgésicas rotineiramente utilizadas é escassa o que resulta, em muitos casos, em tratamentos inapropriados e pouco resolutivos.

1.2. Hiperalgisia inflamatória e neuropática

Os nociceptores quando excitados continuamente podem alterar sua função e responderem diferentemente à certos estímulos sensoriais. Em uma lesão tecidual, por exemplo, são liberados vários mediadores como: citocinas, substância P, NGF (fator de crescimento do nervo), ATP, bradicinina, serotonina e histamina (Figura 1). Esses mediadores podem atuar sobre os neurônios sensoriais primários promovendo alterações a nível celular e molecular (Cunha et al., 2005; Ferreira et al., 1988). Alguns estudos apontam que estímulos inflamatórios desencadeiam alterações fenotípicas nos neurônios sensoriais, como o aumento na expressão de alguns canais de sódio na membrana (England et al., 1996; Gold et al., 1996). Essas modificações resultam em um processo de sensibilização neuronal, isto é, a diminuição do limiar de excitabilidade neuronal. Logo, essas fibras passam a apresentar maior facilidade em serem ativadas frente a uma estimulação (Riedel & Neeck, 2001). Os neurônios sensibilizados podem também apresentar descargas espontâneas mesmo na ausência do agente causador da inflamação. Este estado sensibilizado dos neurônios é denominado de hiperalgisia ou alodinia (Linley et al., 2010).

A hiperalgisia é termo utilizado para referir-se ao aumento da sensação dolorosa provocada por um estímulo nocivo, enquanto alodinia refere-se a uma resposta dolorosa à um estímulo mecânico ou térmico que primariamente seja inócua (não nocivo). Já o termo nocicepção está relacionado à ativação da via nociceptiva, ou seja, ao disparo de potenciais de ação gerados por um estímulo sensorial. Neste último caso, não há redução do limiar ou facilitação da excitabilidade neuronal. Vale ressaltar que os processos de sensibilização (hiperalgisia e alodinia) envolvem também a ativação de via sensorial da dor, portanto, também envolve o processo de nocicepção (Deuis et al., 2017).

O sistema imunológico apresenta um papel significativo na sensibilização dos nociceptores em diferentes contextos. No modelo animal de dor inflamatória induzida pela carragenina, os neutrófilos migram para o tecido afetado e mantém a dor mediante a produção de citocinas e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Cunha et al., 2008). Além dos neutrófilos, os mastócitos também possuem uma estreita associação com os terminais nervosos dos nociceptores. Quando ativados, essas células desgranulam e liberam citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β , histamina e fator de crescimento do nervo (NGF) que, agindo sobre os receptores presentes na membrana do nociceptor, promovem a sensibilização sensorial da resposta de dor (Aich et al., 2015; Chatterjea & Martinov, 2015; Woolf et al., 1997). A citocina IL-1 β foi a primeira a ser descrita com função hiperalgésica (Ferreira et al., 1988). Ela atua sobre os nociceptores pela ativação de IL-1R1 que promove a fosforilação de p38 MAPK dos canais de sódio Nav1.8, gerando o aumento da formação

de potenciais de ação, os quais resultam em hiperalgesia mecânica (Binshtok et al., 2008). Além disso, IL-1 β aumenta a expressão de receptores TRPV1 dos nociceptores causando o aumento da sensibilidade à estímulos térmicos (Ebbinghaus et al., 2012).

Após a resolução da resposta imune, a dor tende a diminuir. Entretanto, em alguns casos em que a inflamação não é resolvida imediatamente ou mesmo após a cura da lesão desencadeadora da inflamação, têm-se um estado prolongado de hipersensibilidade denominado de dor crônica. Tal fato é dependente da plasticidade do sistema nervoso associada às alterações de pós-tradução e alterações dependentes da transcrição que resultam, em última estância, na modificação da via nociceptiva (Ronchetti et al., 2017).

Dentre as dores classificadas como dor crônica, encontra-se a neuropatia. Ela acomete uma vasta porcentagem da população mundial, tendo parte dela representada por pacientes em tratamento de câncer (Jensen et al., 2011; Seretny et al., 2014). Nesta categoria, os quimioterápicos promovem lesões que abrangem todo o eixo neurosensorial da dor causando um desequilíbrio do sistema nervoso (Yan Li et al., 2018; Meacham et al., 2017). Estímulos sensoriais são interpretados de maneira incorreta, o que pode acarretar em sensações dolorosas espontaneamente (Meacham et al., 2017). Os tratamentos utilizados atualmente para a resolução da dor neuropática são frequentemente ineficazes por apresentarem, em sua maioria, alvos inespecíficos além de resultar em efeitos colaterais que prejudicam significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Finnerup et al., 2015). Ainda não estão totalmente claro os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática, o que limita as estratégias terapêuticas (Yan Li et al., 2018).

Dentre as drogas quimioterápicas comumente utilizadas na clínica encontra-se o Paclitaxel. Este composto atua primordialmente sobre as unidades dos microtúbulos das células, impedindo a formação do fuso e interrompendo a divisão celular (Gornstein & Schwarz, 2014). No entanto, os pacientes em tratamento com Paclitaxel relatam dormência, formigamento, dor espontânea e dor provocada por estímulos mecânicos e frios, em suas mãos e pés (Dougherty et al., 2004). Dados recentes demonstraram que a neuropatia periférica induzida por Paclitaxel pode persistir por meses ou anos após o término do tratamento e afeta de 44% a 98% dos pacientes (Dougherty et al., 2004; Seretny et al., 2014).

1.3. Gânglio sensorial

Os principais locais em que a dor pode ser modulada antes de ser transmitida para a medula e retransmitida às regiões corticais no SNC são os gânglios sensoriais. Nos últimos anos, essa estrutura tem se destacado como um importante sítio de processamento de informações sensoriais

e, por esse motivo, é foco de interesse em várias pesquisas na área de dor (Berta et al., 2017; Lemes et al., 2018; Neves et al., 2020; Pagliusi et al., 2020).

Os corpos ou soma dos neurônios sensoriais primários estão localizados no gânglio trigeminal (GT) ou gânglio da raiz dorsal (GRD). Ambos fazem parte do sistema nervoso periférico (SNP) e participam da transdução do estímulo nocivo. O GT está localizado na base do crânio e apresenta a maioria dos neurônios sensoriais que inervam a cabeça, face e dentes. Suas projeções se encaminham para o tronco encefálico ou para regiões superiores da medula espinal (Capra & Dessem, 1993; Erzurumlu et al., 2010). Os GRDs estão localizados perto da entrada das raízes dorsais da medula espinal e inervam a maior parte do corpo (tronco e membros). O ramo axonal longo se estende para a periferia e forma terminações sensoriais na pele, músculo, vísceras e outros órgãos. O ramo curto entra pelo corno dorsal da medula espinal, onde realiza sinapse com neurônios de segunda ordem ou com interneurônios (Lieberman, 1976).

Os corpos neuronais do GRD encontram-se envolvidos por uma camada de células denominada de células satélites gliais (CSGs) que, em conjunto, formam uma bainha (ou envelope) ao redor de cada neurônio sensorial, resultando em unidades individuais (Hanani, 2005) (Figura 2). Entre estas unidades pode ser encontrado uma estreita camada de tecido conjuntivo que é majoritariamente observada em animais experimentais jovens. Na fase adulta, essas unidades encontram-se separadas por outra camada de células gliais. O número de CSGs envolvendo cada neurônio está relacionada com o volume do mesmo, que vai de encontro com uma das funções primordiais exercida pela glia, o de suporte metabólico. Porém, essa proporção pode ser alterada sob determinadas condições, como por exemplo durante uma lesão do nervo (axotomia), em que, o número de células satélites gliais ao redor do neurônio lesado no GRD é aumentado significativamente (Hanani, 2005).

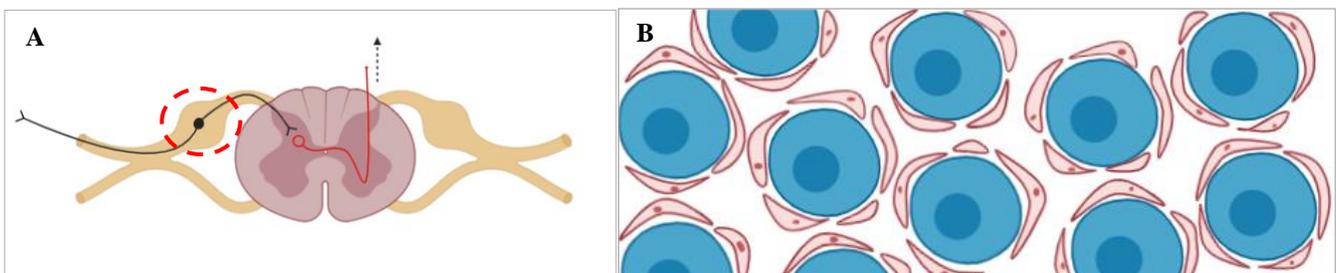


Figura 2: Gânglio da raiz dorsal. A- O GRD está localizado próximo ao corno dorsal da medula espinal. Nele está presente o corpo celular do neurônio sensorial. O ramo curto axonal se estende em direção ao corno dorsal da medula e o ramo longo encaminha-se para a periferia. B- Em azul os corpos de neurônios sensoriais envolvidos por um envelope de células laminares denominadas de células satélites gliais (representada em cor rosa).

Fonte: autoria própria, esquema realizado pelo site *Biorender*.

As CSGs compartilham diversas características com os astrócitos como a expressão de GFAP (Glial fibrillary acidic protein) e diversos transportadores para neurotransmissores (Hanani, 2005; Jasmin et al., 2010; Takeda et al., 2009). Entretanto, estudos ultraestruturais mostraram que as CSGs apresentam morfologia laminar e são um tipo distinto de célula glial (Pannese, 1981). O papel dessas células no gânglio vai além do suporte nutricional, estudos atuais demonstram que as CSGs promovem a liberação de diversas moléculas capazes de ativar receptores neuronais, facilitando e/ou aumentando sua despolarização (Hanani, 2005). Tal fato comprova a participação dessas células no processamento e modulação do sinal sensorial de dor.

Na maior parte do SNC as células neuronais são protegidas por uma barreira de células endoteliais que em conjunto com os astrócitos e pericitos formam a barreira hematoencefálica. Essa barreira semipermeável previne que alguns solutos atravessem para o meio extracelular atingindo os neurônios do SNC. No gânglio sensorial, entretanto, essa barreira não existe e com isso substâncias presentes na circulação sistêmica podem atingir o gânglio sensorial (Arvidson, 1979; Azzi et al., 1990). Esta característica é favorável para a elaboração de medicamentos com efeito analgésico, visto que, fármacos de ação periférica podem atuar sobre as células do gânglio e promover alívio do sintoma de dor sem interferir ou atuar sobre o sistema nervoso central. Isto previne os efeitos colaterais causados pelos fármacos de ação central, como ocorre com os analgésicos opioides: morfina, tramadol, fentanil, dentre outros.

Conforme mencionado, os neurônios envolvidos na detecção do sinal de dor são do tipo pseudounipolar. Em função disso, conclui-se que não existam sinapses no interior do gânglio sensorial onde está presente o corpo neuronal. Todavia, as células satélites gliais bem como os corpos dos nociceptores expressam uma variedade de receptores para neurotransmissores e mediadores, inclusive para mediadores inflamatórios como IL-1 β , TNF- α e prostaglandinas (Dublin & Hanani, 2007; Hanani, 2005). Assim, supõe-se uma transmissão do tipo não-sináptica ocorrendo no GRD que participa na transdução do sinal nocivo (Devor, 1999).

1.4. Comunicação intercelular no gânglio sensorial

Embora os estudos de neurociência tenham focado na transmissão sináptica, a transmissão não-sináptica corresponde também a um fenômeno importante e extremamente predominante no sistema nervoso de mamíferos. Neste tipo de transmissão, as moléculas são liberadas para o meio extracelular de maneira rápida podendo alcançar e agir sobre células adjacentes (secreção parácrina), ou ainda podem atuar sobre a própria célula que liberou a molécula (secreção autócrina) (Carvalho et al., 2019). Em gânglios sensoriais, pelo fato de não apresentar sinapses, a transmissão

não-sináptica é particularmente expressiva e é considerada o principal mecanismo de comunicação intercelular. Estudos atuais sugerem a ação de neurotransmissores pela via não-sináptica no processamento do sinal nocivo, bem como na sensibilização neuronal (Amir & Devor, 1996; Du et al., 2017; Oh & Weinreich, 2002).

No gânglio da raiz dorsal, o espaço entre os neurônios e as células satélites é relativamente estreito favorecendo a troca de moléculas. A comunicação neurônio-glia ocorre geralmente de forma bidirecional, ou seja, moléculas liberadas pelo neurônio sensorial atuam sobre as células satélites circunvizinhas e o mesmo ocorre no sentido inverso (Gu et al., 2010; Suadicani et al., 2010; Takeda et al., 2009). Existe também troca de moléculas entre células satélites de uma mesma unidade ou de unidades vizinhas (Hanani, 2005). Frequentemente, se utiliza o termo *cross-talk* para designar estes tipos de interação entre células.

No gânglio sensorial ocorre também o fenômeno de *cross-excitation*, ou também chamado de *cross-depolarization*, em que, neurônios que não sofreram nenhum tipo de lesão ou interferência passam a ser ativados. Devor e Wall em 1990 observaram que neurônios do GRD são despolarizados quando neurônios vizinhos são ativados, tal fato foi visto em modelo de lesão do nervo em animais. Posteriormente, outros trabalhos investigaram os mecanismos responsáveis por este fenômeno de amplificação do sinal, e foi verificado a participação das junções comunicantes (*gap junctions*) durante a difusão do sinal sensorial de dor em gânglios sensoriais (Spray & Hanani, 2019). Esses canais conectam duas membranas de células opostas facilitando a continuidade citoplasmática e, portanto, permitindo a comunicação entre elas. Em um trabalho com axotomia do nervo ciático foi observado o aumento da expressão de *gap junctions* entre as células satélites gliais do GRD que favoreceu a diminuição do limiar mecânico da pata dos animais (Pannese et al., 2003). No modelo de nocicepção aguda induzido pela injeção intraplantar de capsaicina e formalina, o tratamento com o inibidor de gap junctions no GRD-L5, resultou na diminuição da resposta nociceptiva em ambos os modelos de dor (Lemes et al., 2018).

Além da participação das gap junctions nos processos de comunicação intercelular do gânglio sensorial, diversas outras moléculas liberadas podem intermediar a comunicação neurônio-glia, glia-neurônio e glia-glia, dentre elas: substância P, glutamato, CGRP, citocinas, endotelinas, óxido nítrico e ATP (Takeda et al., 2009). Fortes evidências sugrem a participação desses mediadores em diferentes modelos de dor. No gânglio trigeminal, animais submetidos à inflamação periférica apresentaram o aumento da liberação de substância P (Matsuka et al., 2001; Takeda et al., 2005). Já no modelo de dor crônica de constrição do nervo ciático (CCI) em ratos, houve um aumento significativo da expressão de glutamato no GRD que resultou em consequências negativas

sobre o limiar nociceptivo dos animais lesionados (Kung et al., 2013). Ainda, em modelo de dor neuropática, a inibição da produção de óxido nítrico reduziu a sensibilização periférica dos animais (Choi et al., 1996).

Nos últimos anos, a molécula de ATP emergiu como o mediador protagonista da interação entre neurônios e células satélites nos gânglios sensoriais em processos que envolvem nocicepção e a hiperalgesia (Y. Chen et al., 2008; Huang et al., 2013; Suadicaní et al., 2010). Em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, foi observada a liberação de ATP em culturas primárias do GRD quando fibras neuronais do tipo C eram ativadas. Essa liberação resultou na ativação das células satélites gliais (Lemes et al., 2018). Em um estudo de Zhang e colaboradores (2007), a estimulação elétrica de neurônios do GRD promoveu a liberação de ATP que atuou sobre as células satélites gliais através da ativação de receptores P2X7.

1.5. Sinalização mediada por ATP

A molécula de ATP (adenosina trifostato) é bem conhecida na biologia como uma fonte de energia intracelular, no entanto, já se sabe que seu papel vai além da função energética. O ATP atua nos espaços extracelulares como uma molécula sinalizadora participando de diversos processos do sistema nervoso central e periférico (G. Burnstock, 1995). Apesar deste conceito atualmente estar claro entre os estudiosos, a característica do ATP como mediador de sinal demorou a ser aceita pela comunidade científica. Foi a partir de 1970 que o pesquisador Burnstock finalmente estabeleceu o estudo da transmissão purinérgica (Dahl et al., 2015). Desde então, um número exponencial de estudos tem surgido sobre o papel do ATP como uma molécula sinalizadora em condições fisiológicas e patológicas como, por exemplo, elemento chave de doenças inflamatórias crônicas, doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos (Abbracchio et al., 2006; Cao et al., 2013; Makoto Tsuda et al., 2013).

No SNP, a molécula de ATP se mostra importante para sinalização da dor. Foi visto que a injeção intraplantar de $\alpha\beta$ meATP em animais promove a excitação dos neurônios sensoriais primários, comportamento espontâneo de dor, hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (Geoffrey Burnstock, 2006; Hamilton et al., 1999; M. Tsuda et al., 2000). Em culturas primárias do GRD foram encontrados estoques de ATP no interior de vesículas que se localizavam próximas nas margens do soma neuronal. Esses estoques foram observados predominantemente em neurônios de pequeno e médio diâmetro, ou seja, naqueles neurônios responsáveis pela transdução de estímulos nocivos (Jung et al., 2013; Shin et al., 2012).

Para que o ATP exerça seu papel sobre a célula-alvo é necessário que ele se ligue ao seu receptor correspondente, os receptores purinérgicos. Esses receptores encontram-se abundantemente expressos em diversos tipos celulares e são classificados em 2 tipos, com base em sua estrutura bioquímica, farmacologia e seu mecanismo de ação (Lustig et al., 1993; Ralevic & Burnstock, 1998). Os receptores ionotrópicos (P2X) são formados por subunidades individuais codificadas por sete genes distintos, designados por P2X1 a P2X7 (North, 2002; Roberts et al., 2006). Quando esses canais são ativados pela ligação do ATP forma-se um poro permeável a íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Já os receptores metabotrópicos (P2Y) encontram-se acoplados a proteínas Gi/G0 ou Gq/G11 e apresentam-se em 8 subtipos P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14 (Abbracchio et al., 2006).

Ambos os tipos de receptores purinérgicos são expressos nos gânglios sensoriais, sendo encontrados no soma neuronal, células satélites e, também, nos terminais axonais de neurônios do GRD e células de Schwann (Grubb, 1999; Hanani, 2005; Kobayashi et al., 2005). Diversos trabalhos têm mostrado a participação dos receptores P2X na sensibilização de nociceptores e na liberação de mediadores inflamatórios (Ding et al., 2000; Oliveira et al., 2009; Prado et al., 2013). Recentemente, um estudo demonstrou que os receptores P2X7 expressos nas células satélites gliais do GRD são importantes para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória periférica e para liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Neves et al., 2020). O receptor P2X3 também se destaca por participar em processos de dor e inflamação (Ambalavanar et al., 2005; Teixeira et al., 2010).

Existem várias maneiras do ATP ser liberado para o meio extracelular no sistema nervoso, dentre elas podemos destacar 4: 1. fusão com a membrana; 2. mediado por canais; 3. exocitose e 4. panexinas (Dahl, 2015). O primeiro mecanismo ocorre em condições patológicas onde há a ruptura da membrana da célula decorrente da morte celular programada (apoptose). Este processo pode ocorrer em consequência de um trauma, lesão, inflamação severa ou até mesmo causado por uma doença neurodegenerativa. O segundo mecanismo refere-se ao envolvimento de canais de membrana como as *gap junctions*. Foi visto que a inibição farmacológica desses canais reduz significativamente a liberação de ATP para o meio extracelular (Fields & Ni, 2010). O terceiro mecanismo ocorre frequentemente nos terminais pré-sinápticos onde o ATP é co-liberado com neurotransmissores clássicos, como a acetilcolina ou norepinefrina. Neste contexto, as moléculas de ATP permanecem estocadas em vesículas que são posteriormente liberadas pelo processo de exocitose, o qual, é dependente da entrada de íons Ca^{2+} . As proteínas responsáveis pelo empacotamento do ATP em vesículas são denominadas de VNUT (transportador nucleotídeo vesicular) (Masuda et al., 2016).

A liberação de ATP por exocitose não é exclusivo para sinapses, recentemente, foi verificado a expressão de VNUT no corpo de neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (Jung et al., 2013). A estimulação elétrica dos neurônios do GRD promove a liberação de ATP através da exocitose de vesículas que é dependente de íons Ca^{2+} (X. Zhang et al., 2007). Todavia, restam poucas informações a respeito do papel da liberação de ATP pela via da exocitose em processos de nocicepção e hiperalgesia periférica, é escasso os dados tanto *in vivo* e quanto *in situ* sobre este assunto. O quarto mecanismo de liberação do ATP ocorre por meio de canais de membrana chamados Panexinas (Dahl, 2015).

1.6. Panexinas

As panexinas são uma família de proteínas integrais de membrana expressa em vertebrados, e que se encontra amplamente distribuída nos diferentes tipos celulares. Atualmente são conhecidos três membros: Panexina1 (Panx1), Panexina2 (Panx2) e Panexina3 (Panx3). Esses canais possuem quatro domínios transmembrana α -helicoidais, duas alças extracelulares com dois resíduos de cisteína e, uma alça intracelular. Na porção voltada para o citoplasma apresenta-se um grupamento terminal amino e carboxila (Penuela et al., 2013).

Esta família de proteínas foi descoberta inicialmente por Panchin e colaboradores no ano de 2000 devido à sua sequência homóloga com às proteínas *gap junctions* de invertebrados e por compartilhar características funcionais com as *gap junctions* de vertebrados. Por esse motivo, elas foram inseridas dentro do grupo das conexinas (Penuela et al., 2013). Apesar de existir tais semelhanças, as panexinas não formam um canal intercelular em membranas opostas, elas constituem em um canal transmembrana único (Sosinsky et al., 2011). No presente trabalho, o foco de estudo foi a Panexina 1 (Panx1). Este canal está expresso em diversos tecidos de ratos, camundongos e humanos, podendo ser encontrado no coração, músculo esquelético, pele, pulmão e fígado. No sistema nervoso foi verificada a expressão de RNAm para Panx1 no cerebelo, córtex, retina, hipocampo, bulbo olfatório, neurônios e células gliais (Baranova et al., 2004; Bruzzone et al., 2003).

Os canais Panx1 podem ser ativados por meio de estimulação mecânica, cálcio intracelular, alta concentração de potássio extracelular, ativação de receptores purinérgicos e pela ativação de receptor glutamatérgico (NMDA) (Bao et al., 2004; Devor, 1999; Isakson & Thompson, 2014; Santiago et al., 2011). Quando ele é ativado forma-se um poro na membrana permitindo a passagem de pequenas moléculas, sendo a molécula de ATP a principal dentre elas. Esta liberação tem sido associada com processos de sensibilização neuronal pelo fato de canais Panx1 estarem ligados aos

componentes do inflamassoma (Locovei et al., 2006; Santiago et al., 2011; Silverman et al., 2009). No sistema nervoso central, trabalhos recentes evidenciam a participação Panx1 em processos patológicos como isquemia, neuroinflamação e epilepsia (Decosterd & Woolf, 2000; Silverman et al., 2009; Thompson et al., 2006, 2008).

Fortes indícios têm destacado o papel de Panx1 também na sensibilização periférica. No trabalho de Zhang e colaboradores (2015) foi observado um aumento de expressão de Panx1 no GRD em animais submetidos a lesão do nervo, e isto contribuiu significativamente para o aumento da sensibilidade mecânica na pata de ratos. No gânglio trigeminal, utilizando o modelo de dor crônica orofacial, foi constatado o aumento da expressão de Panx1 em termos moleculares e funcionais em camundongos tratados com CFA na pele submandibular. Com a deleção genética específica para Panx1 em neurônios e, principalmente em células satélites, houve a redução significativa da hipersensibilidade periférica, bem como a diminuição da liberação de ATP, caspase-1 e IL-1 β (Hanstein et al., 2016).

Os canais Panx1 também estão fisicamente e funcionalmente associados aos receptores purinérgicos. Em ensaios histológicos de imunoprecipitação foi observada a co-localização de Panx1 com receptores P2X2, P2X3, P2X4 e P2X7 em diversos tipos de células (Dahl, 2015). Em alguns trabalhos mostraram também que a associação Panx1-P2X7 exerce função importante na propagação de ondas de cálcio (Scemes et al., 2007) e inflamação (Pelegriin & Surprenant, 2009).

Conforme as informações descritas até este agora, foi possível constatar que a sinalização de ATP pela via não-sináptica exerce influência sobre a transmissão e modulação do sinal sensorial de dor. No entanto, existem poucos trabalhos que abordam os mecanismos de liberação de ATP no GRD e o impacto deste processo sobre a sensibilização neuronal. Dessa maneira, o presente estudo apresenta elevada importância para a pesquisa básica e clínica, pois, fornece informações moleculares relevantes para a elaboração de novos alvos farmacológicos para o tratamento da dor.

2. OBJETIVO GERAL

Compreender o papel do ATP liberado pelos canais Panexina1 e pela exocitose de vesículas, no gânglio da raiz dorsal, sobre o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória, neuropática e sobre a nocicepção aguda de fibras C.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar a distribuição dos estoques de ATP nos diferentes tipos de celulares do gânglio da raiz dorsal.
- ✓ Estudar a localização de canais Panx1 no GRD (L5) e a co-localização com ATP.
- ✓ Quantificar o ATP extracelular de células do GRD pré-tratadas com o inibidor de canais Panx1 e de exocitose sob a estimulação com KCl, Capsaicina, PGE₂ e IL-1 β .
- ✓ Avaliar a participação de Panx1 na hiperalgesia inflamatória periférica induzida pela carragenina, PGE₂ e, na nocicepção induzida pela capsaicina, utilizando animais Panx1-KO ou por meio da inibição farmacológica no GRD (L5).
- ✓ Analisar a expressão da proteína Panx1 em culturas primárias do GRD tratadas com PGE₂.
- ✓ Avaliar a participação da exocitose de vesículas no modelo de hiperalgesia inflamatória periférica induzida carragenina, PGE₂, IL-1 β e, na nocicepção induzida por capsaicina, por meio da inibição farmacológica no GRD (L5).
- ✓ Avaliar a inibição conjunta de canais Panx1 e da exocitose de vesículas, no GRD, sobre o modelo da carragenina, PGE₂ e capsaicina.
- ✓ Avaliar a participação dos canais Panx1 no desenvolvimento da neuropatia induzida pelo quimioterápico Paclitaxel utilizando animais Panx1-KO.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos e camundongos. Os ratos foram adquiridos com quatro semanas de idade pelo CEMIB da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Até o início dos testes, os ratos foram mantidos no biotério do Laboratório de Estudos da dor (Departamento de Biologia Funcional e Estrutural) em salas com temperatura e luminosidade controladas e, acesso livre à água e ração. Para os experimentos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* foram utilizados ratos adultos machos da espécie Wistar com idade entre 6 a 7 semanas e, peso aproximadamente de 200-250 gramas. Os procedimentos experimentais foram analisados e

aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNICAMP nº 4566-1/2017, 4566-1(A)/2017 (Anexo 1 e Anexo 2).

Os camundongos foram adquiridos durante a realização do estágio no Exterior BEPE-2019/15255-0 (Anexo 4) na faculdade Albert Einstein College of Medicine, de Nova Iorque, Estados Unidos da América. Foram usados camundongos transgênicos homozigotos com deleção global de Panexina1 (Panx1^{tm1a(KOMP)Wtsi}). Esta linhagem foi gerada pela KOMP (*Knockout Mouse Project*) utilizando animais C57BL/6 com inserção de um “*cassete*” no primeiro *intron* de Panx1. Esta sequência foi designada para gerar um alelo nulo para Panx1 através de um *splicing* o que resulta na interrupção da expressão do RNA mensageiro para Panx1 (Hanstein et al., 2013). Nestes animais, a deleção do canal ocorre em todos os tipos celulares. Os animais usados como controle dos experimentos foram os camundongos C57BL/6 selvagens (wildtype) que não apresentavam nenhuma alteração genética. A genotipagem da progênie dos animais foi realizada pelo PCR da cauda usando os *primers* específicos (Santiago et al., 2011).

Para os ensaios comportamentais e para as culturas de células do gânglio da raiz dorsal foram utilizados camundongos machos ou fêmeas (KO e/ou WT) com peso aproximadamente de 35-45 g. Todos os estudos utilizaram protocolos aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* IACUC - *Protocolo 00001131* (Anexo 3).

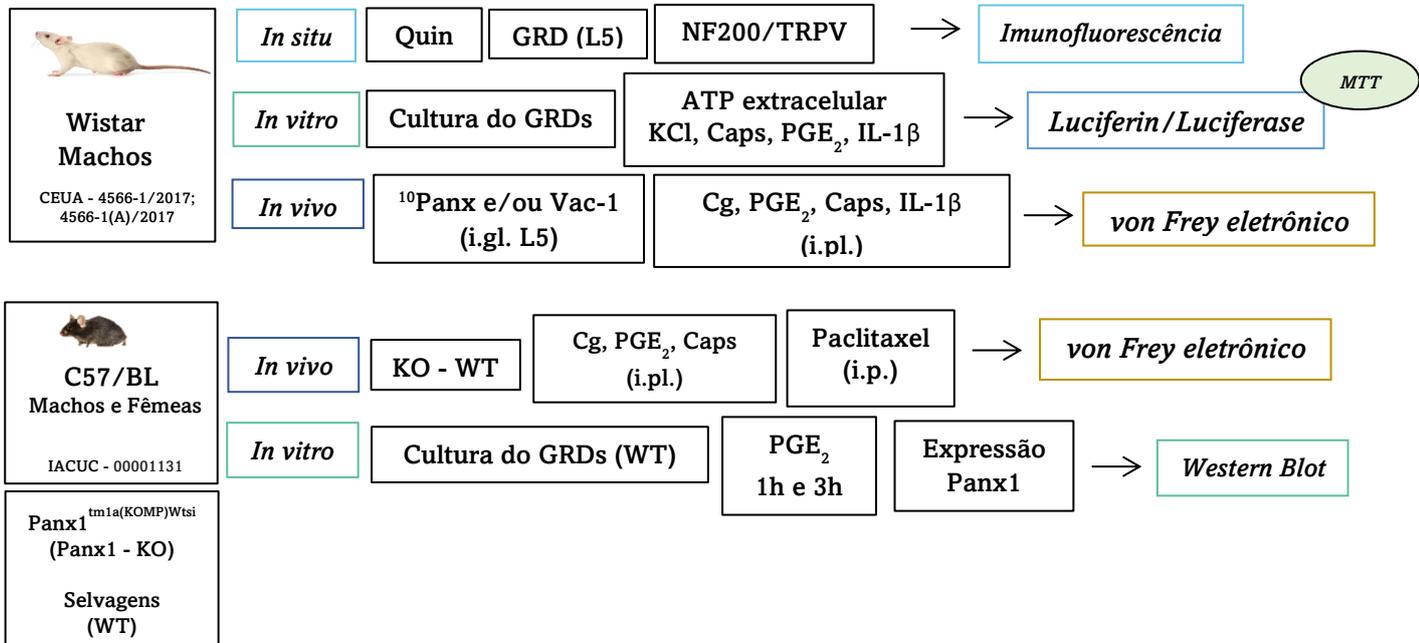
4.2. Drogas utilizadas

- ¹⁰Panx (Tocris - 3348) → peptídeo inibidor de Panexina1.
- Capsaicina (Sigma - M2028) → agonista de TRPV1.
- IL-1β (R&D System) → citocina.
- Paclitaxel (Cayman - 33069-62-4) → quimioterápico.
- PGE₂ (Sigma - P5640) → eicosanoide do grupo das prostaglandinas.
- *Quinacrine* (Cayman - 15041) → marcador fluorescente de estoques de ATP.
- *Vacuolin-1* (Cayman - 351986-85-) → inibidor de exocitose.
- λ-Carragenina (Sigma - 9064-57-7) → polissacarídeo para indução de dor inflamatória.

4.3. Anticorpos utilizados

Anticorpo primário	Anticorpo secundário
Anti-TRPV1 (R&D System); AF3066; Goat; Policlonal	Anti-goat (Thermofischer); A11058; Donkey; Policlonal; 594-Vermelho
Anti-NF200 (SIGMA); SAB420081; Mouse; Monoclonal	Anti-mouse (Life tech.); A10036; Donkey; Policlonal; 546-Vermelho
Anti-Panx1 (Alomone); ACC234; Rabbit; Policlonal	Anti-rabbit (Invitrogen); A21207; Donkey; Policlonal; 594-Vermelho

4.4. Delineamento experimental



4.5. Ensaio de marcação intracelular de ATP e Imunofluorescência

Primeiramente, para avaliar a presença de vesículas contendo ATP no gânglio da raiz dorsal de ratos, foi utilizado o indicador fluorescente *Quinacrine*, o qual foi injetado nos ratos por meio da injeção intratecal (i.t.) na concentração de 100 μM (protocolo adaptado de Belai e Burnstock, 1994). Esta via de administração permite a inoculação de drogas sobre canal da medula espinal, dentro do espaço subaracnóideo. Para a realização da injeção i.t., os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano (2,5%), tricotomizados na região dorsal e posicionados em decúbito ventral. Utilizando uma agulha hipodérmica (26G - 0,45 x 13 mm) foi feita uma inserção sobre

espaço subaracnóideo na região mediana entre as vértebras L5 e L6. O reflexo da cauda indica o local correto da injeção. Imediatamente após o reflexo, foi injetado o volume de 10 µl de solução de *Quinacrine*. A escolha desta via de administração se deve a sua distribuição, esta injeção permite que a droga atinja o gânglio da raiz dorsal L5 de ambos os lados, direito e esquerdo.

Posteriormente, os animais foram eutanasiados e os gânglios coletados. As amostras foram colocadas em PFA 4% por 24 horas. No dia seguinte, os gânglios foram imersos em “tissue-tek” e cortadas em criostato (cortes de 14 µm). As lâminas contendo os cortes do GRDs (L5) seguiram para o protocolo convencional de imunofluorescência: bloqueio com BSA 2%, incubação com anticorpo primário *overnight* e incubação com anticorpo secundário. Foram feitas 3 diferentes marcações moleculares, receptores TRPV1 (marcação para neurônios de pequeno diâmetro), NF200 (marcação para neurônios médios e grandes) e canais Panx1 (Panexina1). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-TRPV1(1:200, goat policlonal; R&D System), anti-NF200 (1:600, mouse, policlonal; SIGMA) e anti-Panx1 (1:300, rabbit policlonal; Alomone). Os anticorpos secundários foram: anti-goat 594, anti-mouse 546, anti-rabbit 594.

4.6. Cultura primária do gânglio da raiz dorsal

As culturas primárias do GRD foram realizadas conforme protocolo descrito por Linhart e colaboradores (2003). Os ratos ou camundongos WT foram anestesiados com 2.5% de Isofurano e, em seguida eutanasiados por decapitação. Os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica foram removidos (16 a 20 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram então dissociadas por incubação em solução colagenase 0,5 % a 37°C por 60 minutos e, depois, por 10 minutos em solução Hank's contendo 0,1 % de tripsina. Após a dissociação enzimática, os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de streptomina. Em seguida, as células foram dissociadas mecanicamente com uma pipeta de vidro e cultivadas em placas (96 ou 12 poços) cobertas com Poly-D-Lisina e Laminina. As culturas foram mantidas por 48 horas em estufa a 5% CO₂ (37 °C) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, com troca do meio de cultivo a cada 24 horas. As culturas provenientes dos camundongos WT foram usadas para tratamento *in vitro* de PGE₂ e realização do *Western Blot*. Já as células do GRD provenientes de ratos foram usadas para o ensaio de quantificação extracelular de ATP e para o ensaio de viabilidade celular (MTT).

4.7. Quantificação de ATP extracelular em culturas primárias do GRD

Os ensaios de quantificação de ATP foram realizados em colaboração com o Laboratório de Bioenergética e de Neurodegeneração Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com auxílio do professor Dr. Roger Castilho e da Dra. Juliana Ruas. Em nosso estudo utilizamos o kit de quantificação de ATP CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (G7570-Promega). Esse método permite a quantificação de moléculas de ATP por meio da reação *Luciferin-luciferase*. A reação resulta na emissão de luz que é proporcional ao número de moléculas de ATP. Para a normalização dos dados é usado uma curva padrão de ATP (0, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 nM).

As células do GRD de ratos foram tratadas com Capsaicina (5 μ M) e KCl (50 mM) por 2 minutos; IL-1 β (0,1 pg/ μ l) por 3 horas; ou PGE₂ (3 μ M) por 5 minutos. O inibidor de canais Panx1 (¹⁰Panx, 100 μ M) e o inibidor de exocitose (*Vacuolin-1*, 30 μ M) também foram aplicados às células previamente aos estímulos mencionados. A incubação com os inibidores teve duração de 20 minutos, a 37 °C. Após o período dos tratamentos, utilizando uma pipeta multicanal, os sobrenadantes da cultura de todos os grupos foram transferidos ao mesmo tempo para a placa de leitura (greiner-bio-one 655083) que continha 50 μ l do reagente *Glo* (reagente responsável pela reação *Luciferin-luciferase*). A placa foi mantida no escuro durante 15 minutos e posteriormente encaminhada ao para a leitura no equipamento *Luminometer Microplate Reader (SpectraMax)*. Foram realizadas leituras antes da estimulação e após a estimulação de cada poço. Ao final do ensaio, foi feita uma leitura adicional para avaliação do ADP. Nesta última etapa foi adicionado a cada amostras 50 μ l do mix: NDK (10 U/mL, Sigma) mais dCTP (100 μ M, invitrogen). O mix fornece o fosfato ao ADP presente nas amostras, convertendo-o em ATP. Sendo assim, os dados apresentados referem-se ao ATP extracelular total liberado pelas células do gânglio da raiz dorsal (ATP + ADP) nas diferentes condições avaliadas. Vale ressaltar que todos as substâncias administradas na cultura foram diluídas em meio *Buffer* (NaCl 152 mM; KCl 2 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM; HEPES 10 mM; glicose 10 mM) para manter a sobrevivência das células durante todo o experimento.

Após a coleta dos sobrenadantes, os poços contendo as células foram lavados 2x com meio e mantidos banhados com DMEM na estufa até o término do experimento. Então, as células aderidas na placa foram removidas e tiveram sua proteína extraída, utilizando tampão RIPPA e coquetel de inibidores de protease. A quantificação da proteína foi feita pelo método de *Bradford* (Ernst & Zor, 2010), e os dados foram usados para a normalização final do resultado.

4.8. Ensaio de Viabilidade Celular

Para certificar de que os tratamentos utilizados no ensaio de quantificação de ATP nas culturas do GRD não estariam afetando a viabilidade celular, realizamos o ensaio de MTT (Mosmann, 1983; Präbst et al., 2017). Este ensaio avalia a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade, baseado na redução de um sal de tetrazólio amarelo (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio ou MTT) a cristais roxos de formazan. As células metabolicamente ativas contêm enzimas oxidoredutase dependentes de NADPH que reduzem o MTT a formazan (Berridge & Tan, 1993). A solução colorida resultante desta reação é quantificada pela absorbância (540 nm).

Em nosso ensaio de MTT utilizamos culturas primárias do GRD de ratos de 48 horas, conforme protocolo já descrito anteriormente. As células foram colocadas em placa de 96 poços, sendo 10.000 células plaqueadas por poço. Os tratamentos foram realizados separadamente: IL-1 β 0.1 pg/ μ l por 3 horas e KCl 50 mM por 2 minutos. Poços para controle negativo (tratamento com DMSO) e controle positivo (Buffer) também foram executados para análise final do resultado.

4.9. Extração de proteína e Western Blot

As culturas primárias do GRD de camundongos (selvagens) foram submetidas ao tratamento *in vitro* de PGE₂ (5 μ M) por 1 ou 3 horas, ou seu veículo (DMEM). O intuito deste ensaio foi avaliar se o tratamento com PGE₂ em células do GRD causaria alterações na expressão de canais Panx1 nas células.

Após cada tratamento, os poços foram lavados 2x e adicionou-se 50 μ l de tampão lise para realizar a remoção das células da placa. A dissociação completa foi feita pelo sonicador (2 ciclos/5 segundos). Em seguida, foi feita a quantificação da proteína de cada amostra pelo Kit de quantificação de proteína BCA. As amostras de culturas do GRD foram, então, separadas por eletroforese em gel acrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Após bloqueio (leite desnatado 2%, Sigma), a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal Rabbit anti-Panx1 (ThermoFisher, Rockford, IL USA) na concentração de 1:200, *overnight*. No dia seguinte, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário e revelada no fotodocumentador.

4.10. Inoculação de drogas pelo método de injeção direta no gânglio L5 de ratos

Para a inoculação de drogas no GRD de ratos foi utilizado o método de injeção direta previamente descrita por Ferrari e colaboradores (2007). Este método permite verificar o efeito de drogas ou agentes apenas sobre os neurônios nociceptivos primários e células satélites no sistema nervoso periférico, eliminando a ação de neurônios medulares (secundários). A injeção é realizada no interior do gânglio da raiz dorsal referente a vértebra lombar 5 (L5-direita) onde possuem a maioria dos corpos celulares de neurônios nociceptivos primários que inervam a porção central da pata, local onde foram administrados os agentes químicos para indução da dor.

Para a realização da injeção intraganglionar (i.gl.), os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (2,5%), tricotomizados na região dorsal na altura das cristas ilíacas e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, de modo que sua região lombar fique hiperfletida. A 1,5 cm lateralmente à coluna vertebral, cerca de 0,5 cm em direção caudal, a uma linha imaginária passando pelas bordas rostrais das cristas ilíacas, foi inserida uma cânula-guia (agulha hipodérmica) com o objetivo de facilitar a penetração da agulha gengival na pele dos animais. A agulha gengival foi então inserida através da cânula-guia, em direção ao espaço intervertebral entre a quinta e a sexta vértebra lombar, até que o processo ósseo lateral vertebral seja atingido. Com movimentos finos a agulha atinge o GRD-L5 direito e, assim, ocorre um reflexo característico da pata ipsilateral, indicando a penetração da ponta da agulha no gânglio da raiz dorsal do quinto nervo espinhal lombar (Figura 3). Após encontrar o local desejado, foi injetado o volume de 5 µl de solução de ¹⁰Panx (inibidor de canais Panx1) e/ou de *Vacuolin-1* (bloqueador de exocitose vesicular). Foram utilizadas diferentes concentrações visando avaliar o efeito anti-hiperalgésico máximo das drogas. Para ¹⁰Panx as concentrações foram: 30, 50, 100, 500 µM (diluída em Salina) e para *Vacuolin-1* foram: 1, 15, 30, 50, 100 µM (diluído em Salina + 0,1 % DMSO). As doses foram definidas conforme trabalhos anteriores (Y. Zhang et al., 2015; Zou et al., 2015). O procedimento total para cada administração teve duração de aproximadamente 10 a 15 min até a recuperação do estado consciente dos ratos.

Após 30 minutos da injeção intraganglionar, os animais receberam a injeção intraplantar (pata traseira direita) de carragenina, PGE₂, IL-1β ou capsaicina. Em seguida, foram direcionados ao equipamento von Frey eletrônico para avaliação do limiar mecânico da pata traseira.

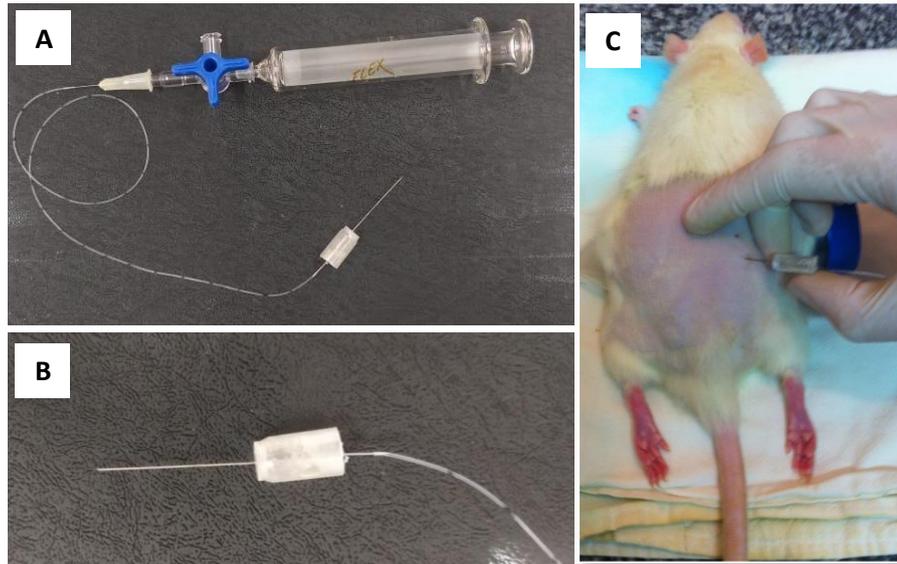


Figura 3: Método de injeção intraganglionar (i.gl.). A- Material utilizado para a realização da injeção no GRD-L5: agulha gengival-cateter-válvula triway-seringa de vidro B- Rato sob anestesia recebendo a droga via i.gl. (gânglio L5-direito). Fonte: autoria própria.

4.11. Injeção intraplantar de drogas

A injeção intraplantar (i.pl) consiste na administração de drogas no tecido intradérmico da região plantar central da pata de animais. Essa região é escolhida para indução de estímulos dolorosos pois ela possui as terminações nervosas de neurônios nociceptivos advindos do gânglio da raiz dorsal (majoritariamente de L4, L5, L6).

Nesse trabalho foram usados 4 agentes químicos para indução do estímulo doloroso periférico: **λ -carragenina** - Cg (diluído em salina), **Prostaglandina E₂** - PGE₂ (diluído salina + 2% etanol), **Interleucina 1 beta** - IL-1 β (diluído em salina) e **Capsaicina** - Caps (inicialmente diluída em 10 mM de etanol e posteriormente diluída em solução salina). Em nosso estudo, a carragenina foi injetada na pata direita traseira na concentração de 100 μ g/50 μ l para ratos (Cunha et al., 2008) e 100 μ g/25 μ l para camundongos (Henriques et al., 1987). A concentração de PGE₂ injetada na pata traseira dos ratos de foi de 100 ng/50 μ l e nos camundongos de 90 ng/25 μ l (Villarreal et al., 2009). E concentração da citocina IL-1 β usada para injeção intraplantar em ratos foi de 1.0 pg/ μ l (Neves et al., 2020).

Para o teste da capsaicina, a concentração utilizada em camundongos foi de 10 μ g/25 μ l e de ratos 10 μ g/50 μ l. A avaliação comportamental desses animais foi realizada por um período total

de 5 minutos, sendo registrado como resposta nociceptiva o número de sacudidas (*flinches*) e de lambidas na pata tratada (Lemes et al., 2018).

4.12. Modelo animal de neuropatia induzida por Paclitaxel

Para a indução da neuropatia por quimioterápico em camundongos (Panx1-KO e WT) utilizamos dois protocolos: agudo, 1 única dose e crônico, 4 doses (adaptado de Atas et al., 2006). No protocolo agudo foi realizada uma única administração, em fêmeas e machos, pela via intraperitoneal (i.p.) de 2 mg/kg de paclitaxel ou veículo (Salina + DMSO 0.1%) sendo o volume final 1 ml. No protocolo crônico, camundongos fêmeas receberam 4 injeções sistêmicas de paclitaxel 2 mg/kg (i.p.) ou veículo (Salina + DMSO 0.1%), em dias alternados (dias 1, 3, 5 e 7). Em ambos os grupos de animais foi avaliado o limiar mecânico da pata direita e esquerda pelo teste de von Frey eletrônico.

4.13. Teste do limiar nociceptivo mecânico da pata: von Frey eletrônico

A avaliação da hiperalgesia mecânica na pata traseira dos animais foi realizada pelo método de von Frey eletrônico previamente descrito por Vivancos e colaboradores (2004). Este método utiliza o analgesímetro eletrônico que é composto por um transdutor de pressão ligado a um cabo e conectado a um detector digital de força, o qual é expressa em gramas. Ao transdutor é adaptada uma ponteira Universal Tips 10 μ L (T-300, Axygen) que é aplicada em ângulo reto na região central da pata traseira do animal, com pressão gradualmente crescente. O estímulo é interrompido após a observação característica de retirada da pata ou *Flinch* (Figura 4). Foram utilizados o von Frey eletrônico das companhias *Insight®* e *Bioseb*.

Para cada animal foram feitas três medições por pata, em cada tempo avaliado. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação (após a administração/tratamento). Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas acrílicas, com assoalho formado por uma rede de malhas de arame. Para a adaptação do ambiente eles permanecem nas caixas por quarenta minutos antes da medição da pata.

Para o grupo de ratos tratados com a carragenina (100 μ g/50 μ l) ou veículo (NaCl 0,9%) foram realizadas medidas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após a injeção. Nos camundongos submetidos ao mesmo tratamento (Cg-100 μ g/25 μ l) realizaram-se medições em 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção intraplantar. Para o modelo de hiperalgesia mecânica induzida por PGE₂ (ratos e camundongos) e IL-1 β (apenas ratos), o von Frey foi realizado no tempo basal, antes de qualquer

tratamento e, 3 horas após a injeção intraplantar dos agentes. No grupo experimental paclitaxel, o qual foi realizado apenas em camundongos, a avaliação do limiar mecânico da pata foi feita no tempo basal, 1, 3, 5, 7 horas para o protocolo agudo e no protocolo crônico o von Frey foi realizado por um período total de 21 dias.

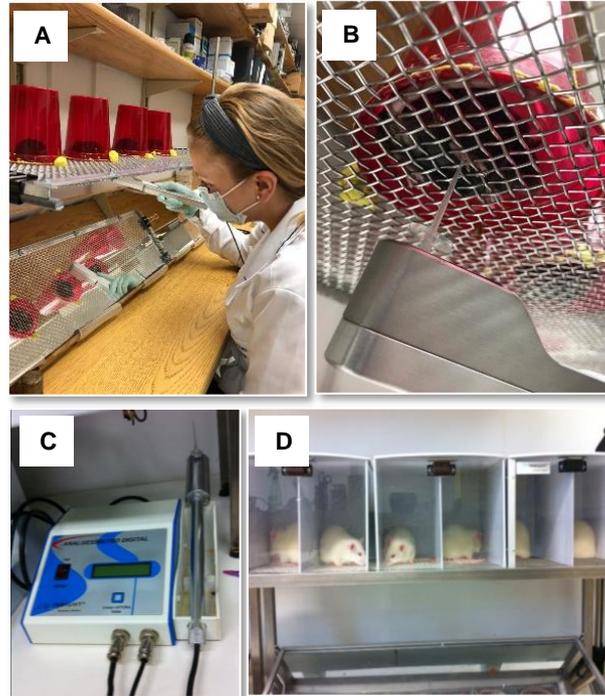


Figura 4: Teste de avaliação do limiar mecânico da pata: von Frey eletrônico. A- Experimentador realizando a estimulação mecânica na região central da pata do camundongo. B- Foto aproximada da ponteira em contato com a pata do animal. C- Analgesímetro digital que registra a força em gramas aplicada pela ponteira. D- Caixas acrílicas onde são colocados os animais para as medições do limiar mecânico da pata. *Fonte: autoria própria.*

4.14. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Nos ensaios comportamentais de dor, a análise foi realizada pelo teste ANOVA de uma via ou duas vias seguida do teste de múltiplas comparações Tukey, conforme o número de parâmetros comparados para cada experimento. Para as análises dos ensaios *in vitro* foi utilizado o Teste t. Os gráficos e as avaliações estatísticas de todos os dados foram realizados pelo software GraphPad Prism 8.0, tendo como nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Células do GRD apresentam estoques vesiculares de ATP

O objetivo deste ensaio foi investigar a localização dos estoques de ATP nas diferentes células presentes no gânglio da raiz dorsal. Inicialmente, avaliamos a localização citoplasmática da marcação por *Quinacrine* (indicador fluorescente de ATP) nos corpos de neurônios sensoriais.

As imagens obtidas em microscopia confocal demonstraram a presença de ATP em regiões próximas ao núcleo celular dos neurônios (Figura 5, setas brancas) e adjacentes à sua membrana plasmática (Figura 5, setas amarelas). Esta proximidade com a membrana indica que o ATP é uma forte candidata à molécula sinalizadora no ambiente extracelular do GRD. O mesmo indício é observado em relação as células gliais. Nessas células verifica-se uma evidente marcação de *Quin* por todo citoplasma, reafirmando a possível participação das células gliais na comunicação intercelular do GRD mediada por liberação de ATP (Figura 5, cabeça de setas). A identificação de neurônios e células gliais em cortes histológicos é feita pelo formato do núcleo, os neurônios apresentam o núcleo arredondado e o corpo celular de tamanho relativamente grande quando se comparado às células gliais, de calibre bem melhor e com morfologia celular alongada/delgada.

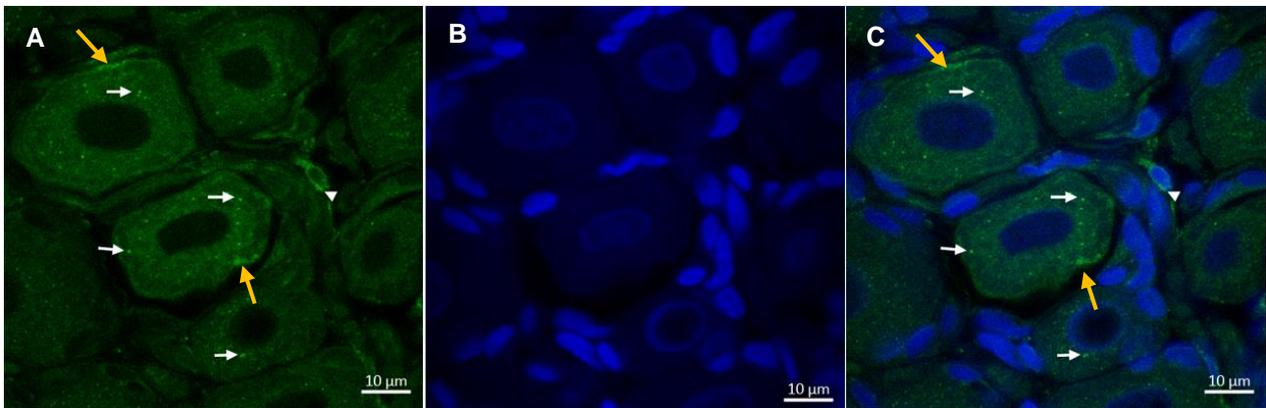


Figura 5: Neurônios e células gliais do GRD possuem estoques de ATP. A- Marcação por *Quinacrine*. As setas brancas indicam a presença de ATP distribuído pelo citoplasma do corpo celular de neurônios sensoriais e, a cabeça de seta indica ATP no citoplasma de células gliais. As setas amarelas referem-se à marcação de *Quin* localizadas próximas a membrana plasmática dos neurônios. **B-** Marcação nuclear por DAPI. Núcleos maiores referem-se aos neurônios sensoriais e núcleos menores e alongados referem-se as células gliais. **C-** *Merge* da marcação *Quin*/DAPI. Foto retirada em microscopia confocal na objetiva de 100x, GRD-L5 provenientes de ratos machos *naive*.

Trabalhos anteriores evidenciam o papel de Panx1 como canal liberador de ATP em diversos tipos celulares (Dahl, 2015). Visando a confirmação desta função no gânglio da raiz dorsal, analisamos a expressão de canais Panx1 nos cortes histológicos do GRD-L5 previamente marcados com *Quinacrine*. Em nosso ensaio, as células neuronais e não neuronais do GRD expressaram marcação para Panx1 e, em algumas localidades, ocorreram co-marcações com *Quinacrine* (Figura 6A e Figura 6D). Esta co-localização sugere uma relação entre os canais Panx1 expressos nas células do GRD com as moléculas de ATP.

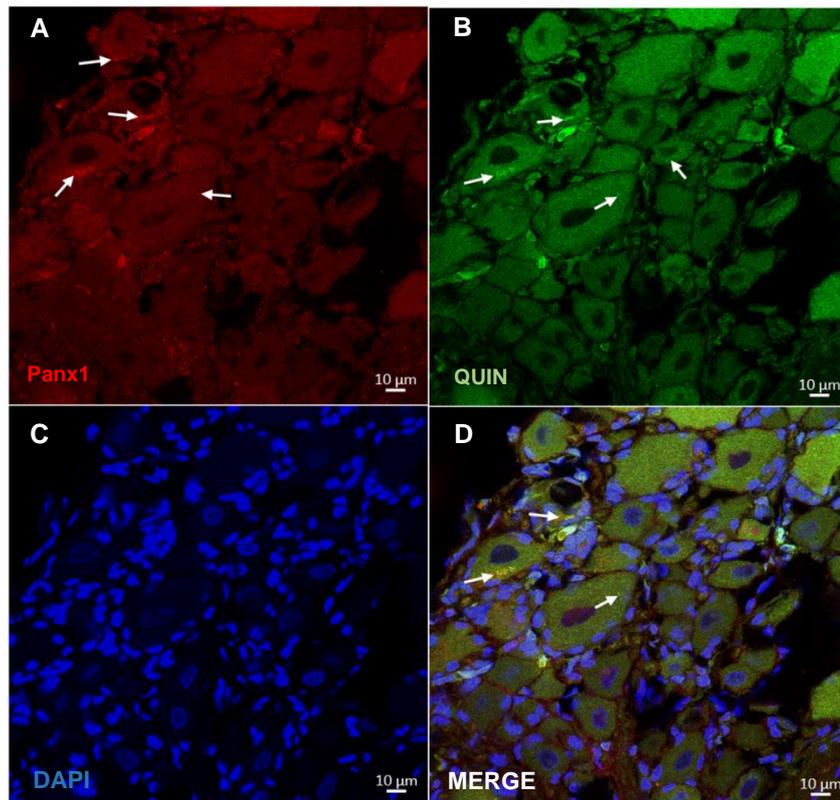


Figura 6: Canais Panx1 são co-localizados com estoques intracelulares de ATP no GRD-L5. A- Expressão de Panx1 em vermelho. As setas indicam a marcação de Panx1 nos corpos celulares de neurônios. B- Marcação por Quin. Presença de estoques de ATP no corpo celular de neurônios (pontos verdes fluorescentes indicados pelas setas). C- Marcação do núcleo por DAPI. D- *Merge* da marcação Quin/Panx1/DAPI. Células Panx1⁺ se co-localizam com a marcação dos estoques de ATP. Foto retirada em microscopia confocal, objetiva de 40x, GRD-L5 provenientes de ratos machos *naive*.

Posteriormente, visando identificar os estoques de ATP nos diferentes tipos de neurônios sensoriais do GRD, realizamos a imunomarcação de TRPV1 para detecção de neurônio do tipo C, e de NF200 para os neurônios do tipo A. Em nossas análises, observou-se co-marcação de células Quin⁺/TRPV1⁺ e Quin⁺/NF200⁺ (Figura 7D e Figura 8D). Deste modo, ambos os tipos de neurônios

sensoriais, mielinizados e não mielinizados, possuem estoques de ATP que podem ser liberados como molécula sinalizadora dentro do GRD.

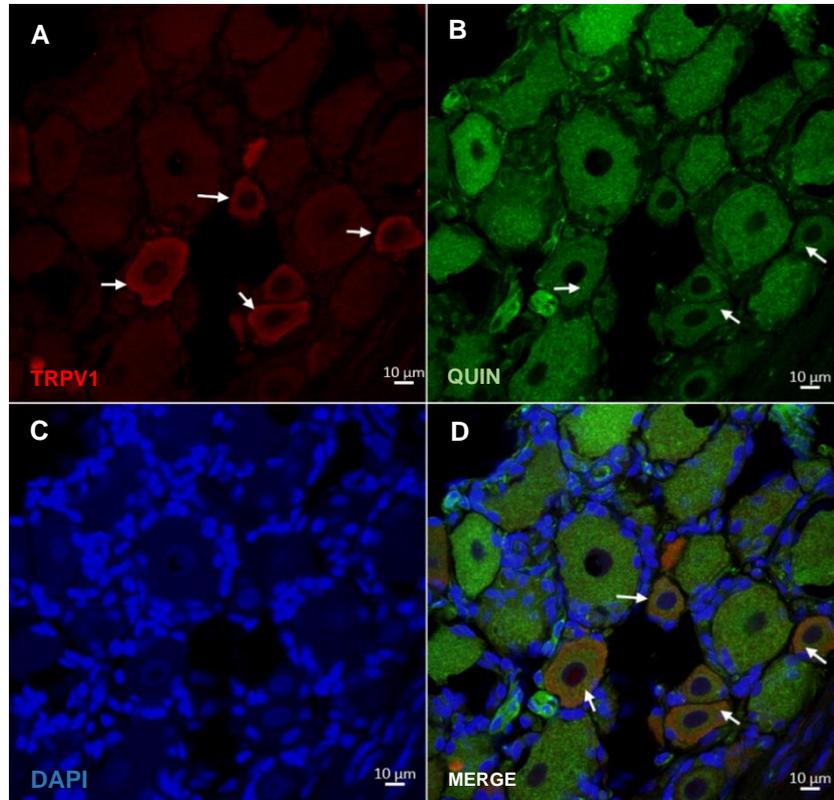


Figura 7: TRPV1 é co-marcado com células Quin+ do GRD-L5. **A-** Marcação em vermelho de TRPV1, corpos neuronais do tipo C. **B-** Marcação por Quin. Presença de estoques de ATP no corpo celular de neurônios (pontos verdes fluorescentes indicados pelas setas). **C-** Marcação do núcleo por DAPI. Núcleos maiores representam as células neuronais, núcleos menores e alongados referem-se as células gliais. **D-** Merge da marcação Quin/TRPV1/DAPI. Células TRPV1⁺ se co-localizam com a marcação dos estoques de ATP. Foto retirada em microscopia confocal, objetiva de 40x, GRD-L5 provenientes de ratos machos *naive*.

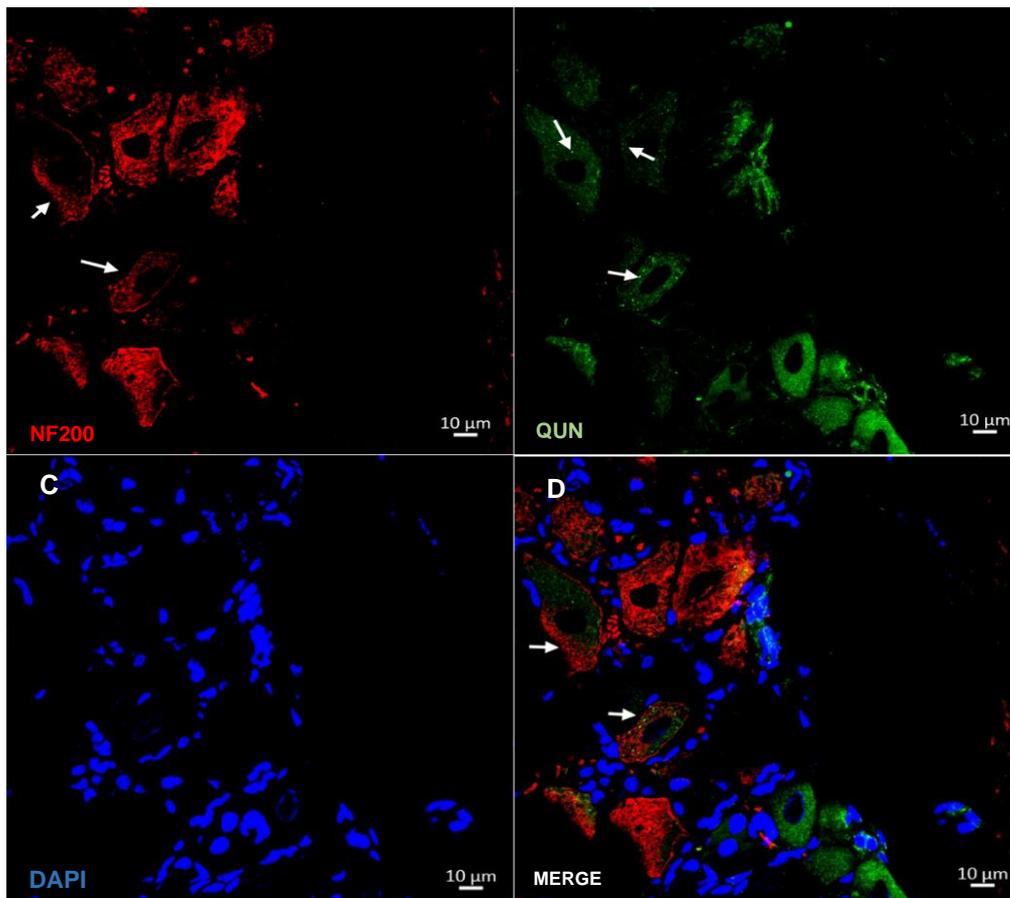


Figura 8: NF200 é co-localizado com células Quin⁺ no GRD-L5. A- Marcação em vermelho de NF200, corpos neuronais do tipo A. As células marcadas encontram-se indicadas pela seta. B- Marcação por Quin. Presença de estoques de ATP no corpo celular do neurônio (setas). C- Marcação por DAPI. Núcleos maiores representam as células neuronais, núcleos menores e alongados referem-se as células gliais. D- *Merge* da marcação Quin/NF200/DAPI. Algumas células NF200⁺ se co-localizam com a marcação Quin⁺. Foto retirada em microscopia confocal, objetiva de 40x, GRD-L5 provenientes de ratos machos *naive*.

5.2. ATP é liberado pelas células do GRD sob determinadas condições

Com intuito de uma avaliação mais concreta sobre a liberação de ATP pelas células do GRD, realizamos diferentes estimulações *in vitro* sobre as culturas primárias do GRD e, em seguida, quantificamos os níveis extracelulares de ATP através do ensaio de luminescência dado pela reação *Luciferin/luciferase*.

O tratamento agudo com a solução de KCl (50 mM) nas células promove um aumento significativo da liberação de ATP para o meio extracelular em comparação ao grupo não tratado (Figura 9A). Este aumento foi significativamente reduzido com o tratamento prévio do inibidor de

exocitose Vac-1 (30 μ M), mas não com o bloqueador de canais Panx1, 10 Panx 100 μ M (Figura 9B e Figura 9C). Este dado indica que a liberação de ATP pelas células do GRD induzido pelo KCl parece ocorrer predominantemente por exocitose e não por canais Panx1.

Diferentemente do efeito encontrado com o KCl, a administração de Capsaicina (5 μ M) nas culturas, não resultou em alterações significativas nos níveis de ATP extracelular em relação ao grupo controle (Figura 9D). Em contrapartida, o tratamento com a citocina IL-1 β (0.1 pg/ μ l), por um período de 3 horas, levou a um aumento exacerbado dos níveis de ATP (Figura 10A). Assim, com a finalidade de identificar a via pela qual o ATP estaria sendo liberado pelas células induzido pela citocina IL-1 β , realizamos o pré-tratamento com a Vac-1 (30 μ M) nas células. Curiosamente, em nossos resultados, não foi detectada diferença entre o grupo tratado apenas com a citocina e o grupo Vac-1 + IL-1 β (Figura 10B).

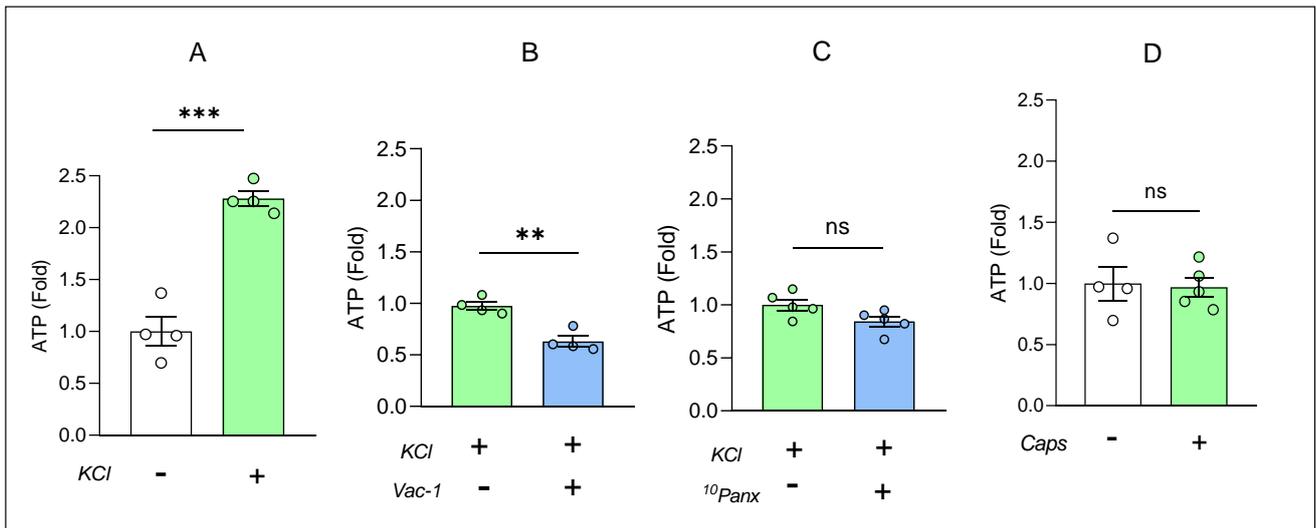


Figura 9: ATP é liberado por células do GRD após estimulação com KCl. **A-** Níveis extracelulares de ATP após tratamento com KCl (50 mM). O grupo tratado apresentou níveis de ATP significativamente aumentados em comparação ao grupo controle (*Buffer*). **B-** Níveis extracelulares de ATP após do tratamento com KCl (50 mM) e pré-tratamento com Vac-1 (30 μ M). A inibição de exocitose de vesículas nas células resultou na diminuição dos níveis de ATP induzido pelo KCl (50 mM). **C-** Pré-tratamento com 10 Panx (100 μ M) e estimulação com KCl (50 mM). A bloqueio de canais Panx1 não alterou os níveis de ATP extracelulares. **F-** Tratamento com capsaicina (5 μ M). A ativação do canal TRPV1 em corpos neuronais não aumentou significativamente os níveis de ATP extracelular em comparação com o controle (*Buffer*). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Teste t. **p<0.01, ***p<0.001.

Com o objetivo de promover um microambiente inflamatório e, conseqüentemente, induzir a sensibilização neuronal *in vitro*, administramos sobre as células do GRD a PGE₂ (3 µM). Conforme mostrado na Figura 10C, os níveis extracelulares de ATP não foram aumentados com o tratamento da PGE₂, o grupo controle e grupo tratado apresentaram níveis de ATP equivalentes.

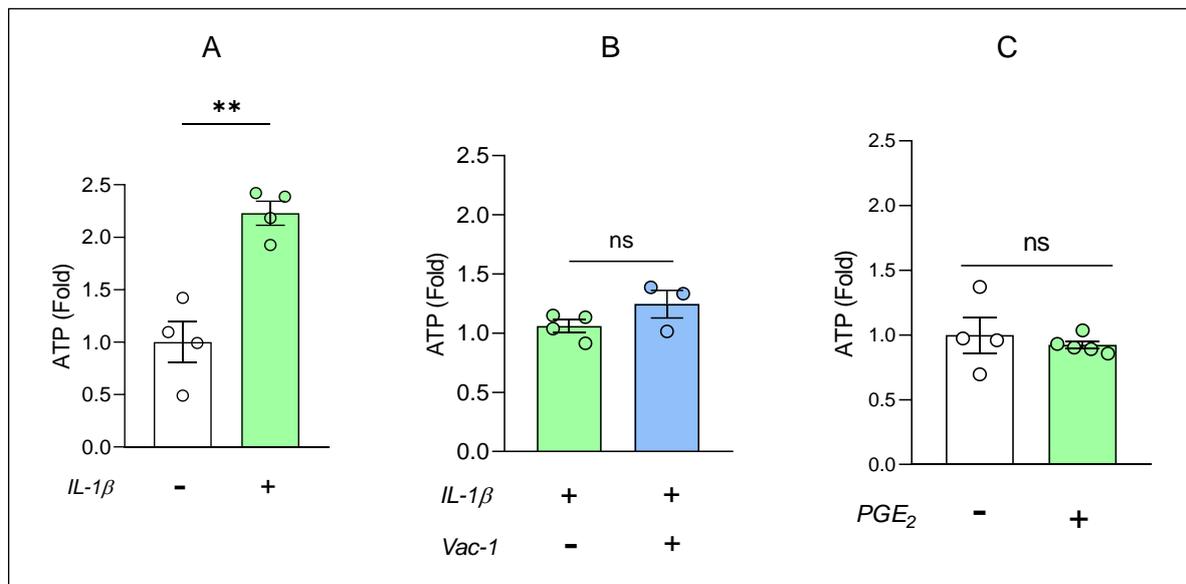


Figura 10: ATP é liberado por células do GRD após tratamento com IL-1β, mas não por PGE₂. **A-** Níveis extracelulares de ATP após tratamento com IL-1β (0,1 pg/µl). O tratamento com IL-1β por 3 horas resultou no aumento dos níveis de ATP em comparação ao grupo não tratado. **B-** Pré-tratamento com Vac-1 (30 µM; 20 minutos) seguido do tratamento com IL-1 β (0,1 pg/µl; 3 horas). A inibição de exocitose de vesículas nas células não resultou na diminuição dos níveis de ATP induzido pela citocina. **C-** Tratamento com PGE₂ (3 µM; 5 minutos). O grupo controle (*Buffer*) e tratado com a PGE₂ apresentaram níveis extracelulares de ATP equivalente, não houve diferenças significativas entre os grupos. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste t. **p<0.01.

Para validação dos nossos resultados, foi feita a administração isolada dos inibidores *Vacuolin-1* (30 µM) e ¹⁰Panx (100 µM) sobre as células do GRD com objetivo de excluir um possível efeito secundário dos inibidores. Os dados obtidos confirmaram que o tratamento isolado dos inibidores Vac-1 e ¹⁰Panx não promove, por si, o aumento dos níveis extracelulares de ATP (Figura suplementar 1). Ainda, para certificar de que o aumento do ATP liberado após o tratamento com IL-1β e de KCl não seria resultante do evento da apoptose, foi realizado ensaio de viabilidade celular (MTT) e verificou-se que, de fato, os tratamentos não promovem a morte das células do GRD (Figura suplementar 2).

5.3. Panx1 participa do desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida por Carragenina.

Posteriormente avaliamos a participação de Panx1, canais de liberação de ATP, no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória induzido por carragenina na pata, utilizando o peptídeo inibidor ¹⁰Panx diretamente no GRD-L5 direito. Pelo fato de não haver trabalhos anteriores relatando a administração deste agente em gânglios, decidimos inicialmente realizar um ensaio de dose-tempo-resposta sobre o modelo da carragenina, para a melhor compreensão do efeito farmacológico do inibidor. Assim, ratos machos foram submetidos ao tratamento intraganglionar (i.gl.) do inibidor ¹⁰Panx, em diversas doses, 30 minutos antes da injeção intraplantar de Cg (100 µg/50 µl, i.pl. direita). O limiar mecânico da pata dos animais foi mensurado pelo teste eletrônico von Frey na condição basal (anterior a qualquer tratamento) e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após a injeção na pata.

A injeção intraplantar de Cg na pata de ratos gerou uma hiperalgesia mecânica com duração de 6 horas, tendo seu ponto máximo hiperalgésico na terceira hora. Após 24 horas da injeção todos os grupos de animais retornaram ao seu limiar mecânico basal (Figura 11A). O pré-tratamento com ¹⁰Panx no gânglio da raiz dorsal (L5-direito) gerou um efeito anti-hiperalgésico sobre a carragenina, a partir da dose de 50 µM, em comparação ao seu grupo controle (veículo i.gl. + Cg i.pl.). Nas doses de 100 e 500 µM a redução da intensidade da hiperalgesia mecânica foi mais prolongada, tendo duração de 2 horas ou mais (Figura 11A).

Analisando os dados do von Frey eletrônico no tempo de 3 horas após injeção de Cg foi possível realizar a curva dose-efeito do inibidor ¹⁰Panx (Figura 11B e 11C). A concentração de 50 µM consistiu na dose sub-máxima apresentando ação anti-hiperalgésico significativo na terceira hora. Como forma de manter a seletividade do fármaco apenas à canais Panx1, esta concentração foi escolhida para os ensaios comportamentais posteriores.

Visando avaliar de forma mais ampla e clara a participação de canais Panx1 sobre a hiperalgesia inflamatória periférica induzida por carragenina, utilizamos camundongos C57/black geneticamente modificados com deleção global para Panx1 (KO-Panx1) e realizamos a injeção de carragenina (100 µg/25 µl). Os camundongos selvagens (WT) tratados na pata com Cg apresentaram hiperalgesia mecânica com duração de 5 horas. Já o grupo KO tratado apresentou um limiar mecânico na pata próximo aos valores dos grupos controles, WT e KO não estimulado (veículo i.gl. + veículo i.pl.). Somente na terceira hora após injeção intraplantar houve um aumento significativa da hiperalgesia mecânica do grupo KO-carragenina em comparação com o seu grupo

controle (KO-veículo). Entretanto, este aumento da intensidade de hiperalgesia foi ainda muito inferior em relação aos apresentados pelos animais WT-carragenina (Figura 11D e 11E).

Considerando que o tratamento prévio de ¹⁰Panx poderia causar uma alteração no limiar basal dos ratos em condições naive (não inflamatória), realizamos a injeção isolada do inibidor (¹⁰Panx 50 µM i.gl.) ou veículo (Salina i.gl.), sem nenhuma estimulação química na pata. A avaliação do limiar mecânico foi realizada pelo teste de von Frey eletrônico durante 120 minutos após a injeção intraganglionar. Os dados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o inibidor (¹⁰Panx 50 µM i.gl.) em comparação com grupo veículo (Salina i.gl.) (Figura suplementar 3A).

Em relação aos camundongos, o limiar basal dos animais knockout (KO) foi comparado com os animais wildtype (WT), também em condições *naive* (nenhum tratamento ou estimulação). O objetivo desta avaliação foi certificar de que os animais geneticamente modificados não apresentariam limiar mecânico basal da pata distinto dos animais selvagens. Os dados obtidos no teste de von Frey eletrônico demonstraram que não há diferença do limiar basal entre o grupo KO e WT em ambas as patas traseiras (Figura suplementar 4).

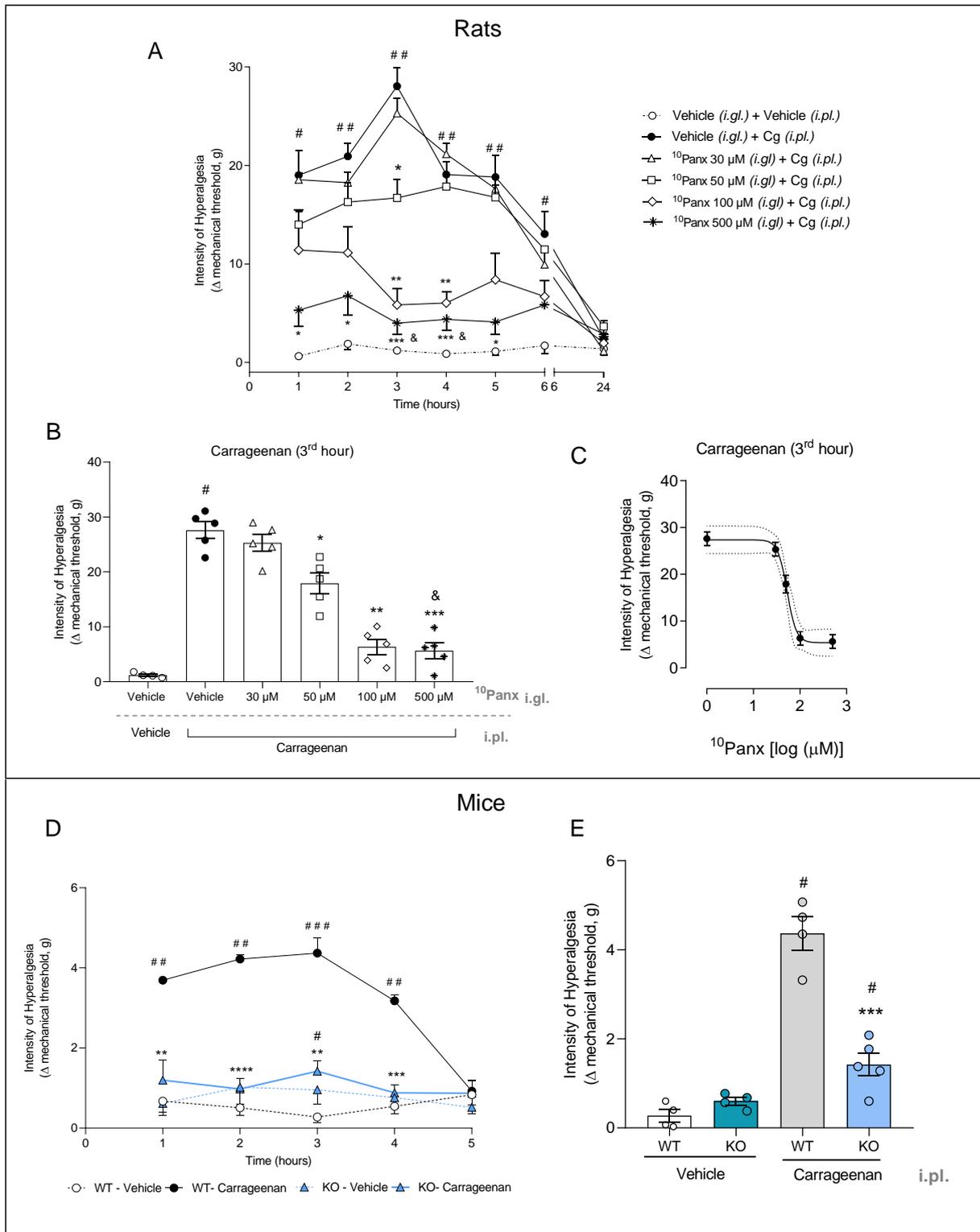


Figura 11: A inibição farmacológica ou a deleção para Panx1 reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela Cg.

A- Avaliação do efeito dose-temporal de 10^5 Panx em ratos machos estimulados com Cg na pata ($100 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, i.pl.). O pré-tratamento intraganglionar (i.g.l.) de 10^5 Panx reduziu significativamente a intensidade de hiperalgesia mecânica induzida pela Cg, a partir da dose de $50 \mu\text{M}$, $n=5$. **B-** Ponto máximo hiperalgésico da Cg (3^a hora). As doses 50 , 100 , $500 \mu\text{M}$ de 10^5 Panx foram significativamente menores comparado com o grupo veículo (i.g.l.) + Cg (i.pl.), $n=5$. **C-** Curva dose-resposta (Log da concentração da dose) na terceira hora, $50 \mu\text{M}$ representa a dose submáxima. **D-** Intensidade da

hiperalgesia mecânica na pata de camundongos machos tratados com Cg (100 µg/25 µL, i.pl.) ou veículo (Salina, i.pl.). O grupo KO-carragenina demonstrou uma intensidade muito menor do que o grupo WT-carragenina nos tempos de 1, 2, 3 e 4 (n=4). **E**- 3ª hora após Cg (100 µg/25 µL, i.pl.). O grupo KO-carragenina apresentou reduzida intensidade da hiperalgesia mecânica. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Tukey para **A e D**. ANOVA uma via para **B e E**. #p<0.5 em relação ao controle (veículo i.gl + veículo i.pl ou veículo WT/KO); *p<0,05 em relação ao grupo veículo i.gl + Cg i.pl. ou WT-Cg; &p<0,001 em relação a ¹⁰Panx 50 µM i.gl. + Cg i.pl.

5.4. Canais Panx1 parecem não participar da hiperalgesia induzida pela PGE₂

O modelo de injeção intraplantar de PGE₂ é muito utilizado para avaliar o processo de sensibilização neuronal periférica. Aplicamos este modelo em ratos pré-tratados com inibidor de Panx1 (¹⁰Panx, 50 µM/5 µl, i.gl.) no gânglio da raiz dorsal, 30 minutos antes do estímulo na pata de PGE₂ (100 ng/50 µl; i.pl.) e, avaliamos o limiar mecânico de retirada da pata pelo teste de von Frey eletrônico 3 horas após a injeção intraplantar.

Os dados obtidos nesta avaliação mostraram que não há diferença significativa em relação a intensidade de hiperalgesia entre o grupo tratado com o inibidor (¹⁰Panx i.gl. + PGE₂ i.pl.) e o grupo tratado com veículo no gânglio (veículo i.gl. + PGE₂ i.pl.), na terceira hora após a PGE₂. Ambos os grupos demonstraram um aumento da hiperalgesia mecânica equivalente após a administração de PGE₂ na pata, que foi significativamente maior que o grupo não estimulado (veículo i.gl. + veículo i.pl.) (Figura 12A). Este resultado sugere que os canais Panx1 presentes no gânglio da raiz dorsal parecem não participar da hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂.

Em camundongos, obtivemos resultados semelhantes. O grupo Panx1-KO tratado com PGE₂ (90 ng/25 µl; i.pl.) apresentou um aumento significativo da intensidade de hiperalgesia na terceira hora após a injeção, o qual, foi similar ao grupo WT tratado com PGE₂ (Figura 12B). Novamente, este dado sugere que os canais Panx1 não exercem influências sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂.

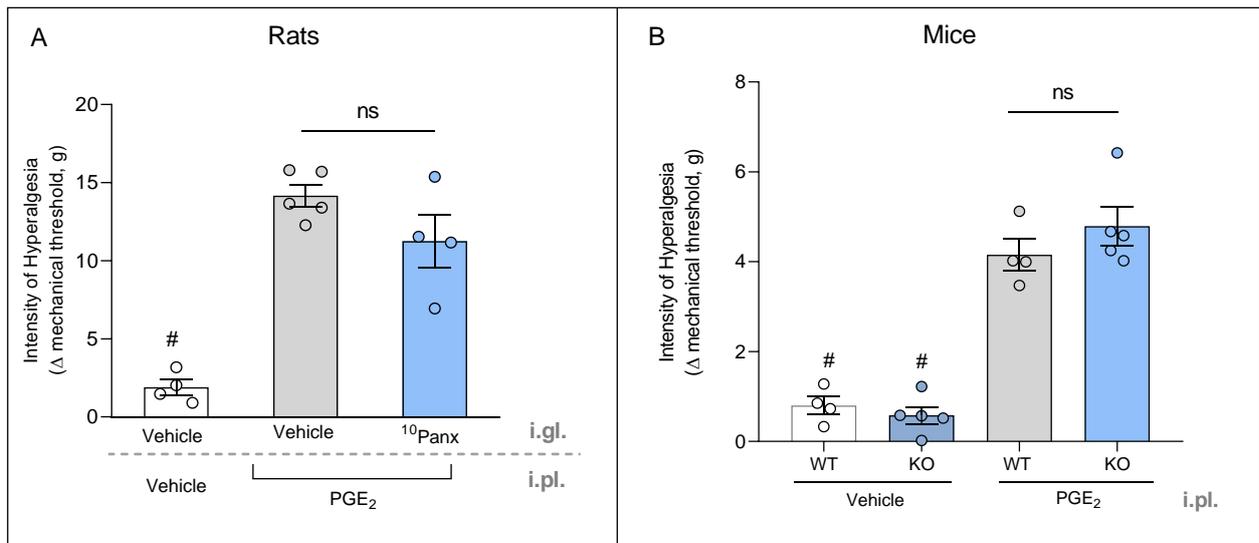


Figura 12: A inibição farmacológica ou a deleção para Panx1 não reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂. **A-** Intensidade da hiperalgesia mecânica na pata de ratos pré-tratados com ¹⁰Panx (50 μ M) ou veículo (Salina, i.g.l.) e estimulados com PGE₂ (100 ng/50 μ L, i.pl.). Não houve diferença significativa entre os grupos estimulados com PGE₂ na pata. **B-** Intensidade da hiperalgesia mecânica na pata de camundongos KO e WT tratados com PGE₂ (90 ng/25 μ L, i.pl.). Não houve diferença significativa entre o grupo WT-PGE₂ com o grupo KO-PGE₂. Os grupos controles (WT-veículo e KO-veículo) foram significativamente diferentes em relação aos grupos tratados. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. #p<0,001 em relação aos grupos tratados com PGE₂. ANOVA uma via.

Considerando os dados obtidos nos experimentos *in vivo* com ratos e camundongos decidimos avaliar o tratamento *in vitro* de PGE₂ sobre as culturas primárias do gânglio da raiz dorsal e investigar a expressão de canais Panx1 nessas células. Para isso realizamos 3 tipos de tratamentos: DMEM (meio de cultura padrão); PGE₂ 5 μ M com 1h de incubação e, PGE₂ 5 μ M por 3h. Após o término dos tratamentos, as células foram coletadas e processadas para avaliação de proteína através do método de Western Blot. Os dados obtidos nesta avaliação demonstram que não houve diferença significativa na expressão da proteína Panx1 (75 kDa) nas culturas tratadas com PGE₂ por 1 ou 3 horas em relação ao grupo controle, DMEM (Figura 13).

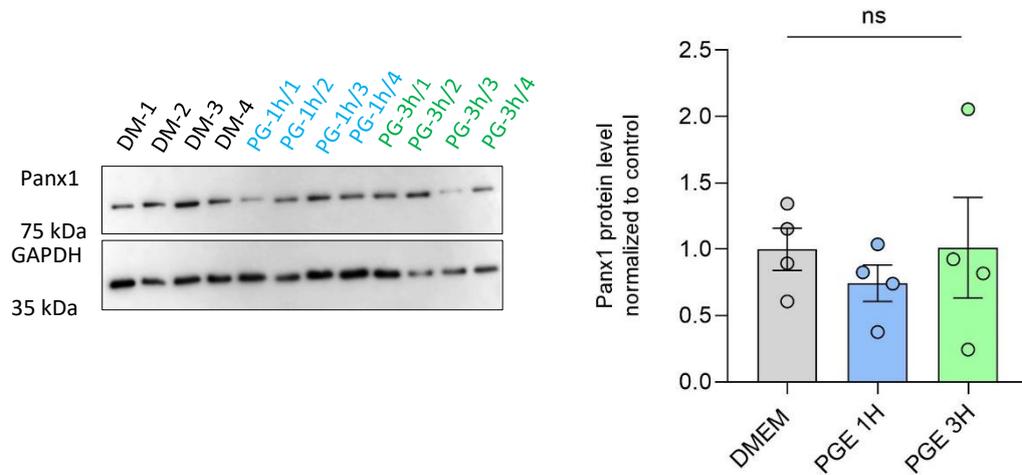


Figura 13: Quantificação dos níveis da proteína Panx1 em culturas primárias do GRD tratadas com PGE₂. Painel esquerdo: Immunoblot para Panx1 (bandas superiores- 75 kDa) e o controle GAPDH (bandas inferiores). Painel direito: gráfico de barras mostrando os níveis de expressão da proteína Panx1 em relação aos níveis do grupo controle (DMEM). O tratamento agudo de PGE₂ não alterou a expressão dos canais Panx1. Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados. ANOVA uma via. $p < 0,05$.

5.5. Resposta nociceptiva de fibras C é dependente de canais Panx1.

Para esta avaliação utilizamos o modelo de injeção intraplantar de capsaicina em ratos (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$) e camundongos (10 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$). Esse modelo foi proposto por Sakurada et al. em 1992 para o estudo de compostos que atuam sobre a dor neurogênica. A capsaicina é o componente pungente encontrado nas pimentas ardentes e quando injetado no tecido periférico induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos por ativar o canal TRPV1 (expresso em fibras C neuronais) (Caterina & Julius, 2001). A ativação deste canal causa a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa provocando uma sensação de dor aguda de queimação acompanhada de vasodilatação e inflamação local, seguida de hipersensibilidade ao calor (hiperalgesia térmica) e, em alguns graus, ao toque (hipersensibilidade mecânica) (JANCSÓ et al., 1967).

Assim como realizado nos ensaios anteriores, os ratos receberam o pré-tratamento de ¹⁰Panx (i.gl. 50 μM) 30 minutos antes da injeção intraplantar de Caps (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$). Em nossas análises, a resposta nociceptiva foi significativamente reduzida com a inibição de canais Panx1 no GRD-L5.

O grupo de animais tratado com o inibidor apresentou um menor número de sacudidas e lambidas na pata em comparação ao grupo controle (veículo i.gl. + caps i.pl.) (Figura 14A).

Em camundongos Panx1-KO, a injeção intraplantar de capsaicina (10 μ g/25 μ l) gerou uma resposta nociceptiva sútil, sendo próxima a zero. Ao contrário dos animais WT estimulados com a Caps que mostraram elevada resposta nociceptiva, entre 20 e 40 (Figura 14B).

Os resultados obtidos com a inibição farmacológica de Panx1 no gânglio da raiz dorsal em ratos juntamente com os dados obtidos com os animais transgênicos, indicam que ativação periférica de fibras C pela capsaicina parece depender, de alguma maneira, de canais Panx1.

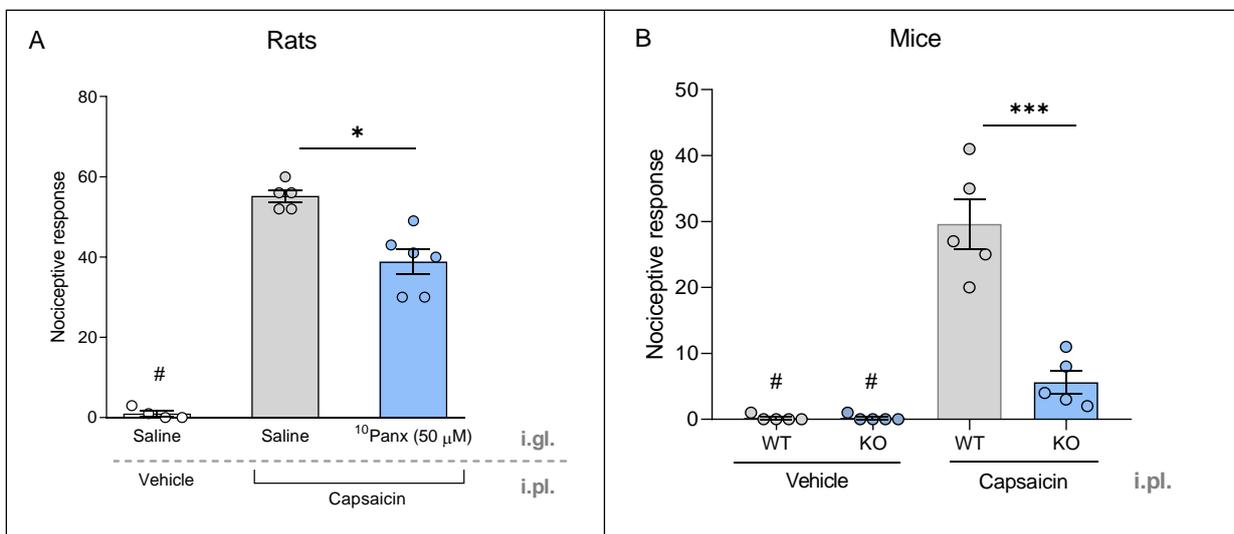


Figura 14: Inibição farmacológica de Panx1 no GRD reduziu a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina. Animais Panx1-KO apresentaram baixa resposta nociceptiva frente a capsaicina. A- Ratos pré-tratados com ¹⁰Panx (50 μ M, i.gl.) demonstraram uma resposta nociceptiva significativamente menor frente a capsaicina em comparação com o grupo tratado com veículo (Salina) no gânglio. O grupo controle veículo i.gl. + veículo i.pl. não apresentou resposta nociceptiva. **B-** Camundongos WT tratados com capsaicina intraplantar demonstraram um alto número de sacudidas (*flinches*) e lambidas, resposta não observada em camundongos KO-Panx1 tratados com capsaicina. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$; # $p < 0,001$ em relação aos grupos tratados com capsaicina ou WT-caps. ANOVA uma via.

5.6. Animais Panx1-KO apresentam reduzida hiperalgesia com uma dose de paclitaxel

O paclitaxel é um quimioterápico amplamente utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer. Vários estudos já demonstraram que um dos importantes efeitos deste medicamento é o desenvolvimento da dor neuropática que afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Desde então, o paclitaxel tem sido usado também em animais como modelo de dor neuropática.

Em nossos experimentos utilizamos dois protocolos de indução de dor neuropática por quimioterápico em camundongos Panx1-KO e em camundongos WT. O limiar mecânico da pata direita e esquerda de ambos os grupos experimentais foi avaliado pelo teste de von Frey eletrônico, sendo que no protocolo agudo, os tempos avaliados foram 1, 3, 5 e 7 horas após o tratamento e, no protocolo crônico, o von Frey foi realizado durante a fase de indução (7 dias iniciais) até 21 dias após a primeira injeção de paclitaxel.

Os dados comportamentais demonstraram que uma única injeção de paclitaxel foi capaz de induzir um aumento significativo na intensidade de hiperalgesia em camundongos WT em comparação aos animais que receberam o veículo (Salina + 0,1% DMSO i.p.), no tempo de 3 e 5 horas após o tratamento, tanto na pata direita quanto na pata esquerda (Figura 15A, 15B, 15C e 15D). Os pontos máximos de hiperalgesia em machos e fêmeas WT ocorreram na terceira e quinta hora, sendo que no tempo de 5h, as fêmeas apresentaram intensidade de hiperalgesia mecânica significativamente maior que os machos (Figura 16). No entanto, em ambos os sexos, o limiar basal foi restaurado 7 horas após o tratamento. Camundongos machos e fêmeas Panx1-KO tratados com uma dose de paclitaxel (2 mg/kg; i.p.) não desenvolveram hiperalgesia mecânica em todos os tempos avaliados. O limiar mecânico tanto da pata esquerda e quanto da direita desses animais se manteve similar ao basal (Figura 15A, 15B, 15C e 15D).

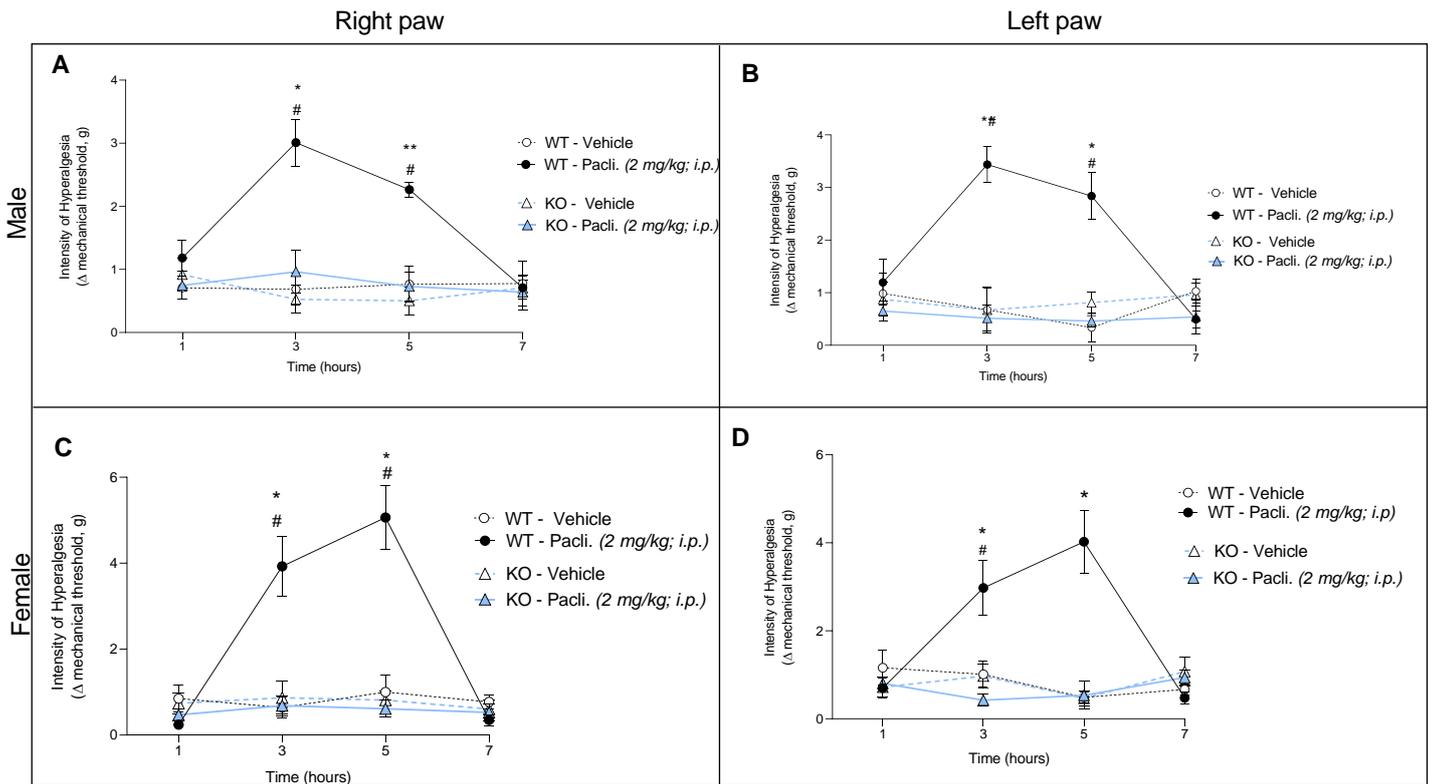


Figura 15: Camundongos *Panx1*-KO não desenvolvem hiperalgesia mecânica após o tratamento com uma injeção de Paclitaxel. A- Intensidade de hiperalgesia na pata direita de camundongos machos em 1, 3, 5, 7 horas após a injeção i.p de Paclitaxel. **B-** Intensidade de hiperalgesia na pata esquerda (macho) em 1, 3, 5, 7 horas após i.p. injeção de Paclitaxel. **C-** Intensidade de hiperalgesia na pata direita de camundongos fêmeas a 1, 3, 5, 7 horas após i.p. injeção de Paclitaxel **D-** Intensidade de hiperalgesia na pata esquerda (fêmea) em 1, 3, 5, 7 horas após i.p. injeção de Paclitaxel. Camundongos KO machos e fêmeas (KO-Paclitaxel- 2 mg/kg) não desenvolveram hiperalgesia mecânica durante todos os tempos avaliados, tanto na pata direita quanto na esquerda. Os camundongos selvagens tratados com paclitaxel desenvolveram hiperalgesia mecânica entre 3 e 5 horas após tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ para WT Pacli. vs KO Pacli; # $p < 0.05$ para WT Pacli. vs WT Veículo. ANOVA duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Tukey. $n = 5$.

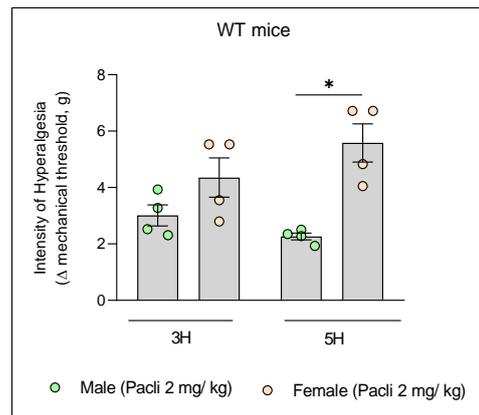


Figura 16: Camundongos fêmeas WT apresentam maior intensidade hiperalgésica na quinta hora após tratamento com Paclitaxel. No tempo de 5h fêmeas apresentaram maior intensidade hiperalgésica na pata direita comparada ao grupo macho sob mesmo tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA uma via, $p < 0,05$.

No protocolo crônico, a primeira injeção sistêmica de paclitaxel (2 mg/kg, i.p.) promoveu um aumento da intensidade de hiperalgesia mecânica nas fêmeas WT em comparação ao grupo WT tratado com o veículo (Salina + 0,1% DMSO i.p.), porém, no dia seguinte (dia 2) o limiar da pata retornou-se ao seu estado basal. A partir da segunda injeção, o limiar mecânico do grupo WT foi reduzido resultando em um aumento da hiperalgesia que perdurou por 21 dias. As fêmeas Panx1-KO não apresentaram hiperalgesia mecânica com a administração da primeira dose de paclitaxel, somente a partir da segunda administração houve um aumento significativo da hiperalgesia mecânica em relação ao seu grupo controle (Figura 17A e 17B). Porém, a intensidade de hiperalgesia dos animais KO tratados foi significativamente menor em comparação com o grupo WT, tanto na pata direita quanto na esquerda até próximo ao oitavo dia (Figura 17A e 17B). Após o período de 8 dias, a intensidade de hiperalgesia entre os animais WT e KO não foi diferente, indicando que os animais com deleção global de Panx1 também desenvolveram a dor crônica periférica bem como os selvagens.

A sensibilização mecânica causada pelo tratamento do quimioterápico nas duas patas ocorre de forma semelhante, mas não idênticas. É possível observar que em alguns tempos avaliados (Figura 17, 7º e 8º dia) existe uma variação na hiperalgesia mecânica entre a pata direita e esquerda. No entanto, o padrão hiperalgésico provocado pela neuropatia se manteve para o grupo KO e WT.

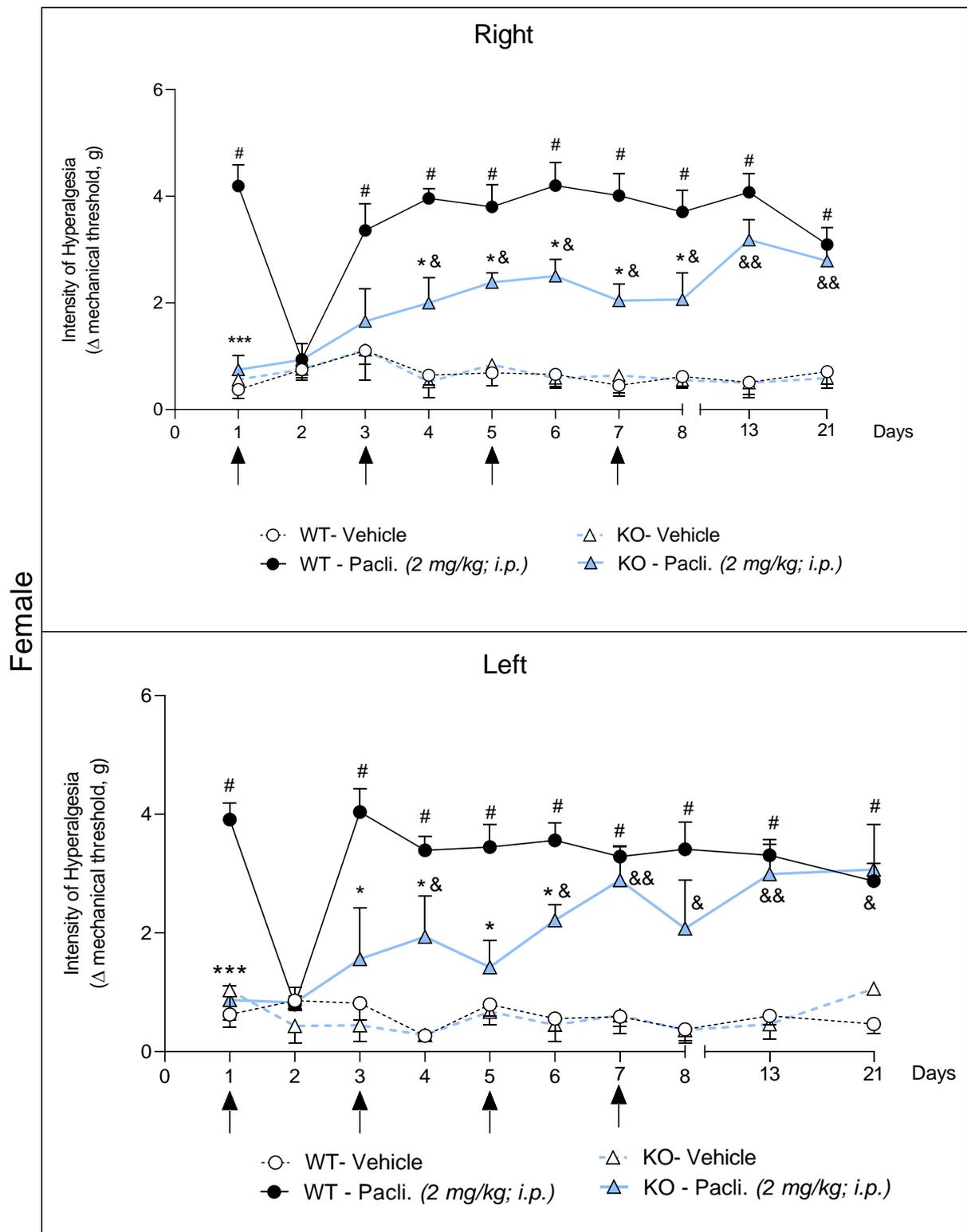


Figura 17: Camundongos Panx1-KO também desenvolvem hiperalgesia crônica induzida por Paclitaxel. A- Intensidade da hiperalgesia mecânica da pata direita de camundongos fêmeas por um período de 21 dias. **B-** Intensidade da hiperalgesia mecânica da pata esquerda de camundongos fêmeas por um período de 21 dias. As 4 injeções i.p de Paclitaxel ocorreram nos dias 1, 3, 5, 7. O grupo KO-Pacli. apresentou intensidade de hiperalgesia mecânica significativamente menor quando comparado ao grupo WT-Pacli, em ambas as patas durante o período de indução (1°

ao 7º/8º dia). No 13º- 21º os animais KO tiveram um aumento da hiperalgesia, sendo equivalente ao grupo WT-Pacli. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Tukey. #p<0.001 em relação a WT veículo; * p<0,05 em relação a WT Pacli.; & p<0,05 em relação a KO-Veículo. n = 6 para o grupo WT, n=4 para o grupo KO.

5.7. A exocitose de vesículas no GRD está envolvida no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória e na nocicepção pela capsaicina.

Sabendo que a molécula ATP pode ser liberada para o meio extracelular através da exocitose de vesículas, decidimos bloquear este processo *in vivo* diretamente sobre o gânglio da raiz dorsal utilizando o fármaco *Vacuolin-1* (Vac-1), previamente aplicado em nossos ensaios *in vitro*. Este inibidor impede a fusão dependente de cálcio das vesículas com a membrana plasmática e, portanto, impossibilita a liberação do conteúdo vesicular.

Os dados comportamentais da avaliação dose-resposta de Vac-1 mostraram que a partir de 30 µM o tratamento intraganglionar do inibidor apresentou efeito anti-hiperalgésico sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina i.pl. (Figura 18A). Este efeito, não foi crescente proporcionalmente com a dose, assim, o fármaco Vac-1 não apresentou o efeito dose-dependente (Figura 18B).

Todavia, os dados demonstram que a inibição da exocitose pela administração de Vac-1 no GRD-L5 reduz significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção de Cg na pata (Figura 18A e 18B). Resultado semelhante a este foi observado no modelo de hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de IL-1β 1.0 pg/µl e PGE₂ 100 ng/50 µl (Figura 18C e 18D).

No teste de nocicepção induzido pela capsaicina, o pré-tratamento com *Vacuolin-1* resultou na redução da resposta nociceptiva dos animais estimulados em comparação com o grupo controle (veículo i.gl. + capsaicina i.pl.) (Figura 18E), sugerindo que o processo de exocitose que ocorre no gânglio da raiz dorsal também participa da resposta nociceptiva de fibras neuronais do tipo C.

Como forma de controle, realizamos a injeção intraganglionar da droga Vac-1 isolada em ratos *naive* (não estimulados) e, os dados obtidos demonstraram que condições de não estimulação o inibidor não causa alterações significativas sobre o limiar mecânico da pata dos animais (Figura suplementar 3B).

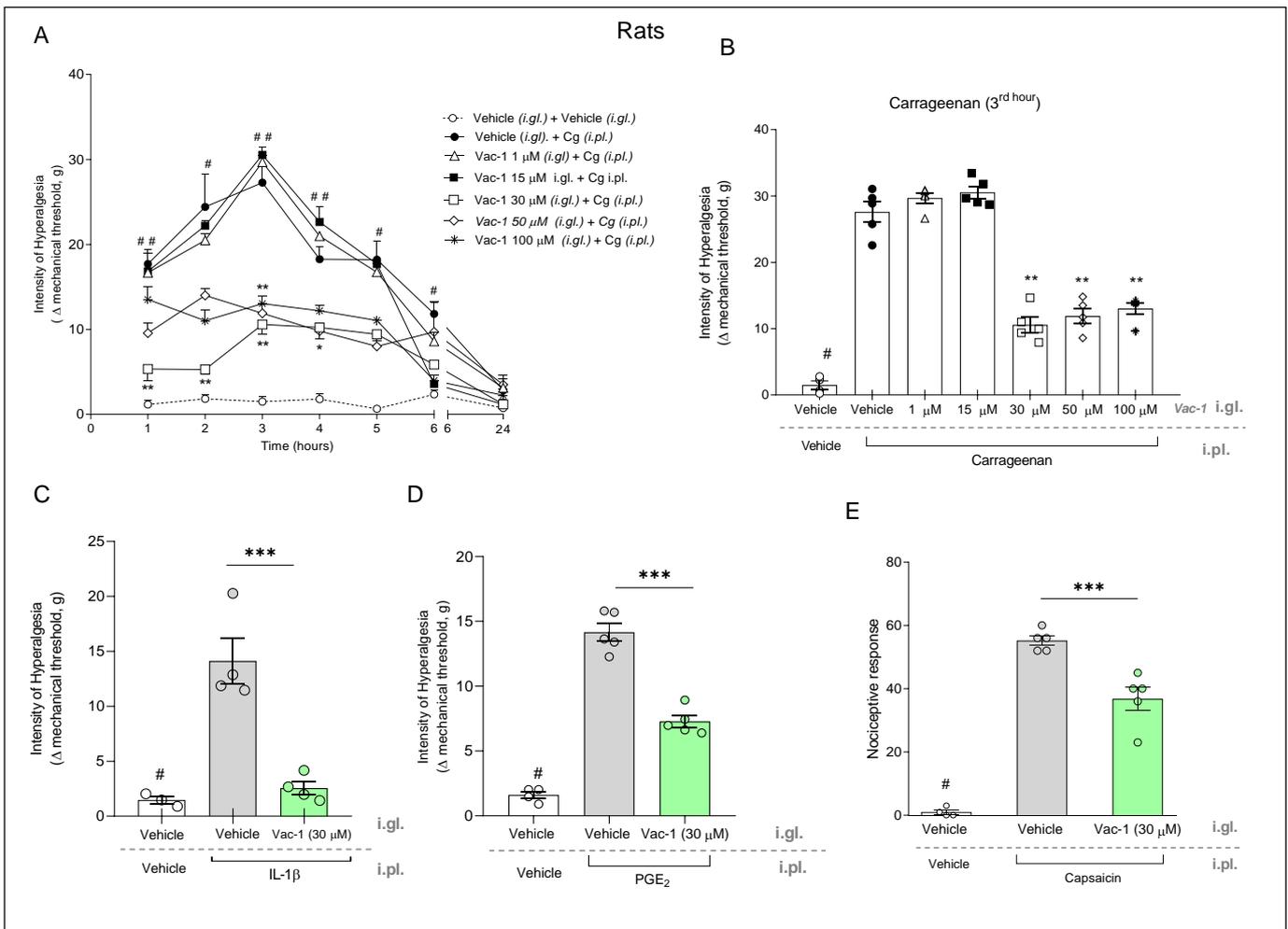


Figura 18: A excitose de vesículas no GRD participa do desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória e da **nociceção**. **A-** Avaliação do limiar mecânico da pata de ratos (Teste von Frey eletrônico) no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por Cg (i.pl. 100 μ g/50 μ L): efeito dose-temporal de Vac-1 (i.g.l.). O tratamento com Vac-1 no gânglio reduziu a intensidade de hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina, efeito observado a partir da dose de 30 μ M. n = 5. **B-** Avaliação da 3^a hora após injeção de carragenina na pata. As doses de 30, 50 e 100 μ M i.g.l de Vac-1 foram significativamente menores comparado com o grupo veículo (i.g.l.) + carragenina (i.pl). **C-** Avaliação do limiar mecânico da pata após injeção de IL-1 β . A administração intraplantar da citocina IL-1 β (1.0 μ g/ μ L) resultou em um aumento significativo da intensidade hiperalgésica que foi revertida com o pré-tratamento intraganglionar com Vac-1 (30 μ M). **D-** No modelo de hiperalgesia induzida pela PGE₂ (100 ng/50 μ l, i.pl.), o pré-tratamento com Vac-1 (30 μ M, i.g.l.) resultou em uma diminuição significativa na intensidade da hiperalgesia mecânica causada pela injeção intraplantar de PGE₂. **E-** Avaliação da resposta nociceptiva no teste da capsaicina. Ratos pré-tratados com Vac-1 (30 μ M, i.g.l.) demonstraram uma resposta nociceptiva significativamente menor frente a capsaicina em comparação com o grupo veículo i.g.l. + capsaicina i.pl. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Tukey para **A**. ANOVA uma via para **B, C, D** e **E**. *p<0.05, #p<0.001.

5.8. Canais Panx1 e a exocitose de vesículas no GRD parecem ocorrer de maneira dependente no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória

Após constatado que tanto canais Panx1 quanto o processo exocitose participam do processamento de sinais nociceptivos no gânglio da raiz dorsal, decidimos administrar os dois fármacos Vac-1 e ¹⁰Panx ao mesmo tempo no GRD-L5 de ratos. Os ratos foram tratados pela via intraganglionar com uma solução final de 5 µl contendo ¹⁰Panx (50 µM) mais *Vacuolin-1* (30 µM). Após 30 minutos do tratamento foi injetado na pata direita dos ratos a carragenina (100 µg/50 µL; i.pl.), capsaicina (10 µg/50 µl; i.pl.) ou PGE₂ (100 ng/50 µl; i.pl.). O limiar mecânico da pata foi avaliado pelo von Frey eletrônico 3 horas após a injeção de carragenina e PGE₂. A resposta nociceptiva do grupo da capsaicina foi avaliada durante 5 minutos, conforme protocolo já mencionado.

A inibição dos canais Panx1 somado com o bloqueio da exocitose, no modelo de hiperalgesia inflamatória por carragenina resultou, na terceira hora, em um efeito anti-hiperalgésico equivalente à administração isolada dos fármacos Vac-1 30 µM e ¹⁰Panx 100 µM. No entanto, o tratamento conjunto dos inibidores foi significativamente diferente em relação ao grupo tratado com ¹⁰Panx na dose de 50 µM (Figura 19A).

No modelo da hiperalgesia induzida por PGE₂, o tratamento de ambos os fármacos também não foi significativamente diferente em relação ao grupo tratado apenas com Vac-1 (Figura 15B). Como já mostrado nos resultados anteriores a inibição de Panx1 não altera a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂, portanto, neste caso o efeito anti-hiperalgésico observado no tratamento Vac-1 + ¹⁰Panx foi resultante somente da inibição da exocitose (Figura 19B).

Já no modelo da capsaicina o efeito anti-nociceptivo foi maior no grupo que recebeu o tratamento conjunto dos inibidores (¹⁰Panx + Vac i.gl; Caps i.pl.) em relação aos grupos tratados com os inibidores isolados (¹⁰Panx i.gl, Caps i.pl.; Vac i.gl, Caps i.pl.) (Figura 19C).

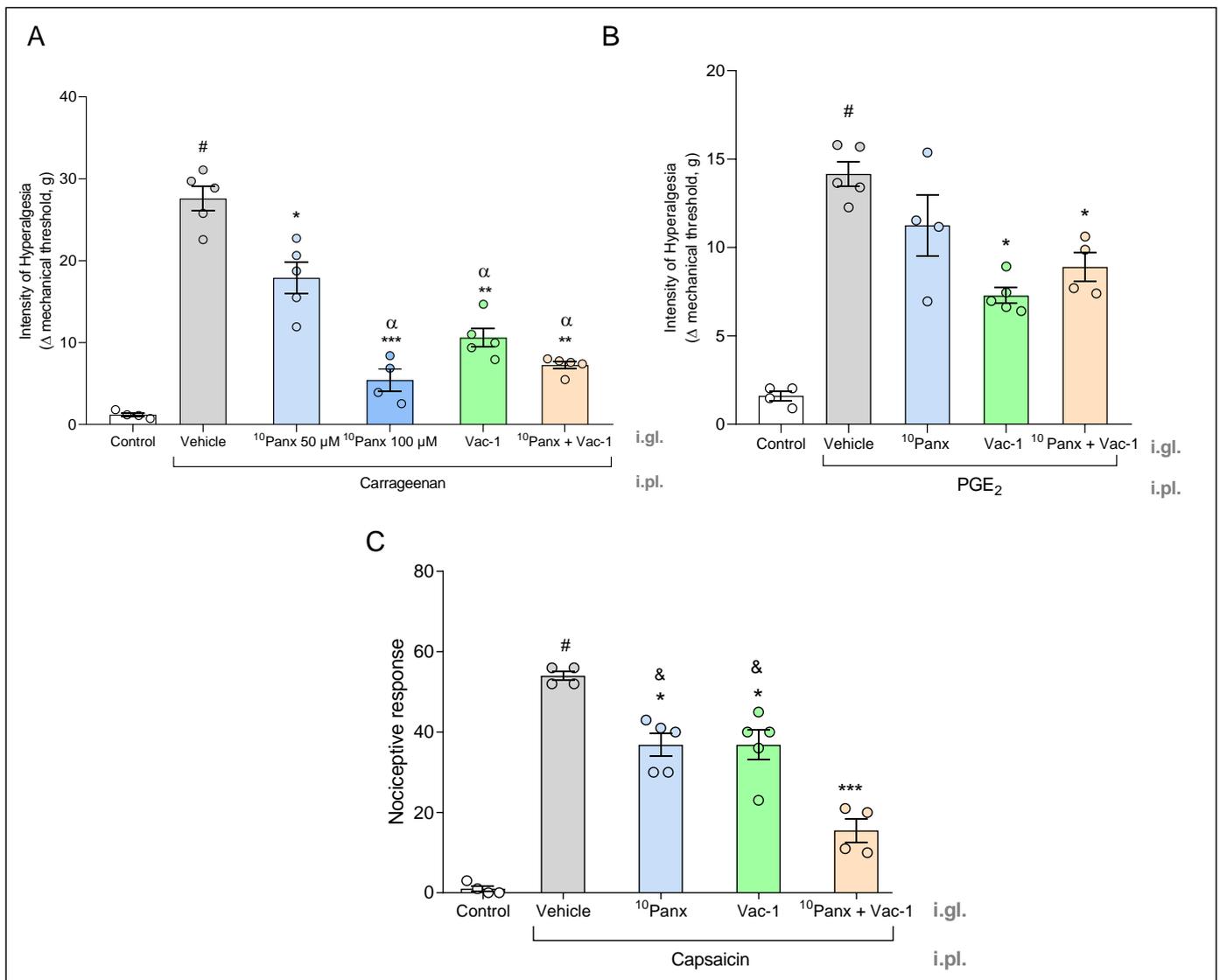


Figura 19: Avaliação comparativa do efeito anti-hiperalgésico de ¹⁰Panx + Vac-1 na hiperalgesia induzida por carragenina, PGE₂ e sobre a nocicepção aguda por capsaicina. A- Avaliação do limiar mecânico da pata dos ratos (von Frey eletrônico), na terceira hora após a carragenina (100 μg/50 μL, i.pl.). O tratamento intraganglionar com ¹⁰Panx (50 ou 100 μM) ou Vac-1 (30 μM) reduziram a hiperalgesia induzida pela Cg na pata. Não houve efeito cumulativo no tratamento com ambos os inibidores. **B-** Avaliação do limiar mecânico da pata de ratos (von Frey eletrônico), na terceira hora após a PGE₂ (100 ng/50 μL, i.pl.). O grupo pré-tratado no gânglio com ¹⁰Panx (50 μM) + Vac-1 (30 μM) e o grupo tratado apenas Vac-1 (30 μM) apresentaram uma intensidade de hiperalgesia equivalente, o qual foi significativamente menor que o grupo ¹⁰Panx (50 μM) e o grupo veículo. **C-** Resposta nociceptiva de ratos após a injeção da capsaicina (10 μg/50 μl, i.pl.). O grupo tratado com ¹⁰Panx (50 μM) + Vac-1 (30 μM) mostrou uma redução ainda maior sobre resposta nociceptiva em relação ao tratamento isolado dos inibidores. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA uma via. #p<0.001 em relação ao grupo controle; *p<0.05 em relação ao veículo i.gl + Cg i.pl.; αp<0.05 em relação a ¹⁰Panx 50 μM; & p<0,05 em relação a ¹⁰Panx + Vac-1; capsaicina.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o conceito de que os gânglios sensoriais consistem em uma estação do sistema nervoso periférico onde o sinal é retransmitido passivamente para porções centrais, passou a ser obsoleto e limitado. Com o aprimoramento dos estudos de eletrofisiologia e biologia molecular foi possível constatar que o gânglio é uma estrutura de processamento de sinais. Neste sentido, o gânglio da raiz dorsal (GRD) se tornou um protagonista no que se refere a eventos envolvidos na transmissão e modulação do sinal sensorial de dor. Uma variedade de trabalhos evidenciam a comunicação entre as células do GRD como elemento chave para a sensibilização neuronal (Gu et al., 2010; Huang et al., 2013). Dentre as moléculas liberadas durante esta comunicação, o ATP se destacou como uma das mais relevantes (Dahl, 2015; Gu et al., 2010; Hanani, 2012; Lemes et al., 2018; Neves et al., 2020). Ainda assim, é pouco compreendido os mecanismos pelos quais essa molécula é liberada e seu efeito sobre as células do GRD durante o processamento da dor.

Neste presente trabalho realizamos um estudo sobre localização de estoques intracelulares de ATP em tecido do gânglio da raiz dorsal L5 de ratos, a partir da marcação por *Quinacrine*. Este indicador fluorescente é usado em deferentes tipos celulares como marcador de vesículas lisossomais secretoras de moléculas de ATP (Forveille et al., 2019; Jung et al., 2013; Nishida et al., 2014; Pangršič et al., 2007). Em determinados ensaios, a intensidade da área de fluorescência emitida pelo marcador é parâmetro para a avaliação da liberação extracelular de ATP, estando a redução da intensidade intracelular de *Quinacrine* associada a maior liberação do conteúdo vesicular (Forveille et al., 2019; Geisler et al., 2013). Em culturas do GRD, foram verificadas comarcações de *Quinacrine* com LAMP1 (marcador vesículas lisossomais) localizadas próximo as margens dos neurônios sensoriais (Jung et al., 2013). Em nossas análises, obtivemos resultado semelhante. Adjacentes a membrana plasmática dos corpos de neurônios no GRD-L5 observamos a marcação de estoques de ATP, sugerindo a possível eminência da liberação desta molécula para o meio extracelular. Porém, também foram encontradas grandes quantidades de marcação por *Quinacrine* em toda extensão citoplasmática, incluindo regiões próximas ao núcleo. Esta marcação pode estar relacionada a áreas de alta produção de ATP advindas das mitocôndrias e/ou marcação de nucleotídeos associada à RNA, devido a presença da Ribose, a qual, é semelhante ao grupo pentose encontrada na unidade de Adenosina da molécula de ATP (Weisblum & De Haseth, 1972). Além das células neuronais, encontramos expressiva intensidade de fluorescência em células gliais do GRD-L5, possivelmente provenientes de células satélites gliais (CSGs). Apesar de não ter sido realizado a marcação específica para este tipo de célula, é característico das CSGs a formação de

uma bainha ao redor do corpo celular do neurônio em gânglios sensoriais (Hanani, 2005). Por este motivo, podemos sugerir que grande parte das células gliais marcadas em nossas imagens referem-se as células satélites gliais. É válido ressaltar que existem macrófagos residentes no GRD (Yu et al., 2020) e, portanto, algumas células gliais marcadas também podem estar relacionadas a estas células imunes.

Posteriormente, através do ensaio de imunomarcção, verificamos que os corpos celulares de neurônios do tipo C (TRPV1⁺) e do tipo A (NF200⁺) apresentam-se co-marcados com as células Quin⁺. Embora a expressão de ambos marcadores, ATP e tipo de fibra neuronal, não ocorra de maneira exclusiva, os dados obtidos confirmam o evento de sinalização mediada por ATP por neurônios do GRD. No trabalho de Jung e colaboradores (2013) foi observado a co-localização de VNUT (transportador nucleotídeo vesicular) e *Quinacrine* em neurônios do gânglio da raiz dorsal e, no ano seguinte, Nishida e pesquisadores (2014) demonstraram que VNUT está predominantemente expresso em neurônios do GRD de pequeno e médio diâmetro, indicando a participação de fibras nociceptivas na sinalização por ATP.

Conforme mencionado anteriormente, uma forma de liberação não-sináptica da molécula de ATP é através dos canais de membrana Panx1. Diversos trabalhos atribuem este papel à Panexina. Em células epiteliais das vias aéreas e em células do túbulo renal de humanos foi observado a co-localização de Panx1 com o sítio de liberação de ATP (Hanner et al., 2012; Ransford et al., 2009). Em nosso ensaio de imunofluorescência do gânglio da raiz dorsal, também foram encontradas co-localizações entre a expressão de canais Panx1 e estoques de ATP marcados por *Quinacrine*, no corpo neuronal próximo à membrana plasmática da célula. Isto sugere a possível liberação do ATP pelas células do GRD através destes canais. De forma a confirmar tal evento, realizamos a quantificação de ATP extracelular em culturas de células do GRD pré-tratadas com o inibidor seletivo de canais Panx1 (¹⁰Panx) seguida da estimulação com KCl.

A administração de KCl nas culturas primárias do GRD resultou em um rápido aumento dos níveis extracelulares de ATP, o qual, não foi significativamente reduzido com o pré-tratamento de ¹⁰Panx (100 µM). Por outro lado, a inibição da exocitose de vesículas pela incubação com *Vacuolin-1* (30 µM) foi capaz de reduzir este aumento, indicando que, sob altas concentrações extracelulares de K⁺, a via da exocitose parece ser mais atuante na liberação de ATP em células do GRD. Apesar de nossos ensaios não comprovarem efetivamente o papel de Panx1 como liberador de ATP após o tratamento com KCl, não está descartado a hipótese de que estes canais também estejam liberando ATP nas culturas, é possível que ambas as vias de liberação estejam funcionando ao mesmo tempo, porém, a via da exocitose ocorra de maneira mais proeminente encobrendo a

liberação por canais Panx1. Por isso, o nosso tratamento com $^{10}\text{Panx}$ não foi suficiente para promover uma redução significativa dos níveis de ATP. Já no caso de deleção do gene para Panx1, houve de fato uma menor liberação de ATP frente a estimulação extracelular de K^+ pelos astrócitos de animais KO em comparação às culturas contendo a expressão desses canais (Suadiciani et al., 2012).

Sabendo que o tratamento com KCl *in vitro* promove a despolarização de todas as células presentes na cultura, neurônios e células satélites gliais, decidimos aprimorar o ensaio para melhor identificação das células liberadoras de ATP presentes no GRD. Deste modo, utilizamos a capsaicina para estimular apenas neurônios que expressassem canais TRPV1, separando assim, uma classe de células. Anteriormente, foi observado pelo nosso grupo de pesquisa que a administração de capsaicina em culturas do GRD promove a despolarização de neurônios seguida do influxo de cálcio das CSGs por meio da ativação de canais P2X7, sugerindo uma comunicação neurônio-glia mediada pela molécula de ATP (Lemes et al., 2018). No entanto, em nosso ensaio de quantificação extracelular de ATP não foi detectada diferença significativa entre as células do GRD estimuladas com capsaicina e seu grupo controle. Considerando que apenas uma pequena porção de células presentes na cultura foi ativada pela capsaicina, possivelmente, a liberação de ATP desencadeada pela ativação dos canais TRPV1 não foi suficiente para ser detectada no método *Luciferin/luciferase*. Além disso, o processo de liberação de ATP ocorre de maneira rápida e em muitos casos momentâneos, imediatamente após ser liberada para o ambiente extracelular a molécula de ATP é hidrolisada tendo os seus constituintes reciclados pelas células tanto em condições fisiológicas quanto *in vitro* (Dahl, 2015). Por essas razões, não foi possível observar diferenças significativas dos níveis de ATP nas células tratadas com capsaicina.

A citocina IL-1 β é fator-chave na sensibilização dos nociceptores durante a resposta inflamatória. Ela é responsável por ativar as enzimas ciclooxigenases que irão produzir os agentes eicosanoides, como a prostaglandina E2 (PGE₂) (Cunha et al., 2005). No gânglio da raiz dorsal foi observado o aumento da expressão de COX e da liberação de prostaglandinas durante a inflamação do tecido periférico. Estes fatores estavam diretamente relacionados com o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica da pata dos animais (Araldi et al., 2013). Ainda, em estudos *in vitro*, células do GRD tratadas com IL-1 β apresentaram maior expressão do gene da COX-2 (Igwe et al., 2001). Recentemente, foi constatado também uma relação entre a ativação de receptores P2X7 (canal ativado por ATP) e a liberação de IL-1 β em cultura de células satélites gliais do GRD sobre a condição inflamatória por LPS (Neves et al., 2020). Os dados obtidos em nosso trabalho confirmaram esta relação. O tratamento isolado com IL-1 β (1.0 pg/ μl por 3 horas) nas culturas

primárias do GRD resultou em níveis significativamente elevados de moléculas de ATP no sobrenadante das células. Dados do ensaio de MTT confirmam que o tratamento com IL-1 β nas mesmas condições utilizadas para ensaio de *Luciferin/luciferase* não afeta a atividade celular e, portanto, o elevado nível de ATP encontrado após o tratamento com IL-1 β não é decorrente de morte ou lise celular. Esta liberação de ATP induzida pela citocina parece não ocorrer pela via da exocitose, posto que o pré-tratamento com Vac-1 não reduziu os altos níveis de ATP. Assim sendo, sugere-se que outras vias de liberação de ATP podem estar envolvidas durante a estimulação por IL-1 β , como os canais purinérgicos do tipo P2X ou panexinas.

Posteriormente, com intuito de verificar a ação do mediador inflamatório final sobre os níveis extracelulares de ATP, realizamos o tratamento de PGE₂ nas células do GRD. O grupo tratado com a prostaglandina não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle. Assim, os dados obtidos no ensaio *in vitro* sugerem que, durante a cascata inflamatória envolvendo a citocina IL-1 β , a liberação de ATP parece ocorrer anterior a liberação de PGE₂ desencadeada pela ação da COX-2 em células do GRD.

A administração de carragenina na pata de animais induz a liberação local de TNF- α que estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas, em última instância, promovem a síntese de PGE₂ causando a sensibilização neuronal e, por consequência, a hiperalgesia mecânica (Cunha et al., 2005; Ferreira et al., 1974, 1993). Trabalhos atuais demonstraram que a hiperalgesia induzida pela carragenina é dependente da ativação de receptores P2X3 expressos nos neurônios sensoriais (Oliveira-Fusaro et al., 2017) e P2X7 presentes nas células satélites gliais do GRD (Neves et al., 2020). Nosso trabalho evidenciou mais um componente relacionado ao desenvolvimento da hiperalgesia pela Cg, os canais Panx1. O pré-tratamento diretamente no GRD-L5 de ratos com o inibidor ¹⁰Panx, a partir da dose de 50 μ M, reduziu a intensidade hiperalgésica mecânica induzida pela administração intraplantar carragenina (100 μ g/50 μ l) na terceira hora. O aumento da dose do inibidor gerou um efeito dose dependente, tendo seu efeito máximo e mais duradouro na dose de 500 μ M. Camundongos Panx1-KO também apresentaram hiperalgesia significativamente menor que o grupo WT quando ambos foram estimulados com a carragenina, em todos os tempos avaliados. Dado isto, os canais Panx1 se confirmaram como novo componente envolvido na sensibilização neuronal inflamatória periférica atuando, possivelmente, através da sinalização via ATP juntamente com a ativação de canais purinérgicos. No sistema nervoso central, receptores P2X7 tem sido fisicamente e funcionalmente associados com canais Panx1 em processos envolvendo dor e inflamação (D. Ferrari et al., 2006; Khakh & North, 2012; North, 2002). Quando ativado, o receptor P2X7 leva à ativação de Panx1 por aumento de cálcio intracelular que, então,

induz a liberação de mais ATP. O aumento sustentado de ATP induz a formação do poro no receptor P2X7 que está envolvido na ativação de caspase-1 e liberação de IL-1 β (Pelegriin & Surprenant, 2009). Em um estudo com culturas de neurônios do gânglio trigeminal revelou-se que o complexo funcional P2X7-PANX1-P2X promove correntes internas bifásicas de longa duração nos neurônios e, a sinalização autócrina e/ou parácrina via ATP presente neste complexo parece contribuir para o mecanismo de dor na região orofacial (Inoue et al., 2021). Em conformidade a isto, animais KO para Panx1 apresentaram baixa liberação de ATP no gânglio trigeminal, assim como reduzida expressão de caspase-1 e IL-1 β , quando submetidos ao modelo de dor orofacial por CFA (Hanstein et al., 2016).

Ao contrário do observado no teste da carragenina, os canais Panx1 parecem não ter influência sobre o desenvolvimento da hiperalgesia induzida por PGE₂, visto que, o pré-tratamento com ¹⁰Panx no GRD de ratos não resultou em efeito anti-hiperalgésico sobre a injeção intraplantar de PGE₂ (100 ng/50 μ l). O mesmo foi observado em camundongos com deleção global para Panx1, em que, a redução do limiar mecânico da pata do grupo WT tratado com PGE₂ foi equivalente ao grupo KO também tratado. A ação da PGE₂ nas células alvo ocorre por meio da ativação de receptores prostanóides, EP1, EP2, EP3 e EP4. A ativação do receptor EP4 estimula a via AMPc/PKA, enquanto a estimulação de EP1 provoca a ativação de PKC. Nos nociceptores periféricos as cascatas EP4/PKA e EP1/PKC desempenham um papel importante no desenvolvimento da hiperalgesia (Sachs et al., 2009). Um estudo recente demonstrou que a PKA pode fosforilar canais de cálcio do tipo Cav 3.2, que são expressos em nociceptores e, dessa forma, contribuir para a sensibilização neuronal induzida pela administração intraplantar de PGE₂ (Sekiguchi et al., 2013). Nessa perspectiva, a injeção de PGE₂ na pata atua de forma distinta da carragenina pois elimina eventos que ocorrem previamente a liberação de prostaglandina como a sinalização via IL-1 β . A injeção de λ -carragenina mimetiza uma resposta inflamatória típica, promovendo o recrutamento de células leucocitárias, ativação da cascata inflamatória e, assim, a liberação da citocina IL-1 β (Cunha et al., 2005). Portanto, sugere-se que canais Panx1 estejam envolvidos em mecanismos dependentes de IL-1 β , mas não diretamente de prostaglandinas. Os resultados do ensaio *in vitro* com culturas primárias do GRD corroboram, em parte, com esta ideia, uma vez que os níveis de expressão da proteína Panx1 das células do GRD não foram significativamente diferentes com o tratamento de PGE₂ por 1h ou 3h.

Em relação a nocicepção induzida pela ativação de fibras C neuronais, Panx1 também parece estar envolvida. Os camundongos Panx1-KO apresentaram baixa resposta nociceptiva após a injeção de capsaicina. E o tratamento com o inibidor ¹⁰Panx pela injeção intraganglionar (GRD-

L5 direito) em ratos resultou em uma diminuição significativa da resposta espontânea de dor no teste da capsaicina. Esses dados sugerem que a ativação de receptores TRPV1 parece envolver, de alguma maneira, a participação de canais Panx1 presentes no GRD. Feldman-Goriachnik e Hanani (2021) verificaram que administração de capsaicina em culturas do GT e do GRD promove o aumento da atividade das células satélites gliais, a qual é reduzida com o tratamento *in vitro* do inibidor de canais Panx1 probenecide.

Uma limitação do uso de animais geneticamente modificados é a ocorrência de efeitos compensatórios na expressão e/ou função de outros canais não depletados, que podem promover alterações na fisiologia do animal e, deste modo, desencadear alterações no processamento de sinais sensoriais. No caso dos animais com deleção genética para Panx1 foi observado uma perda sensorial auditiva (J. Chen et al., 2018) e um aumento da expressão de canais Panx3 em fibras nervosas sensoriais da camada epitelial nasal de camundongos adultos (Whyte-Fagundes et al., 2018). Já em relação ao sinal gustativo, os animais Panx1-KO respondem normalmente a todos os tipos de sabores (Vandenbeuch et al., 2015). Contudo, estudos específicos sobre as modificações da fibra nociceptiva do tipo C envolvendo a transdução do sinal de dor, nesse tipo de animal, ainda não foram realizados. Nesse trabalho, evidenciou-se uma resposta espontânea de dor (nociceptiva aguda) demasiadamente baixa nos camundongos Panx1-KO em relação aos selvagens frente a estimulação com capsaicina, sugerindo uma provável alteração na expressão de canais em fibras C ainda que, os dados do von Frey basal não tenham indicado diferenças significativas entre KO e WT. O estímulo mecânico aplicado na pata dos animais durante o teste de von Frey estimula, em sua maioria, as fibras do tipo A δ , ou seja, aquelas responsivas aos estímulos mecânicos dolorosos (Basbaum et al., 2009).

Na clínica, cerca de 30% dos pacientes em tratamento com câncer desenvolvem a neuropatia periférica afetando seriamente a qualidade de vida dos mesmos (Gutiérrez-Gutiérrez et al., 2010). Os GRDs por estar localizado fora da barreira hematoencefálica e por serem densamente vascularizados por capilares fenestrados, são facilmente acessíveis aos compostos presentes na circulação, tornando os neurônios e as células satélites glias susceptíveis a ação das drogas quimioterápicas (Jimenez-Andrade et al., 2008). Observa-se o maior acúmulo dessas drogas nos gânglios sensoriais em comparação aos nervos periféricos (Cavaletti et al., 2001). Recentemente, foi demonstrado alterações persistentes na bioenergética mitocondrial de neurônios do GRD em decorrência do tratamento com paclitaxel (Duggett et al., 2017). Nesse projeto, os dados comportamentais obtidos no modelo de neuropatia induzida por quimioterápico sugere a participação de canais Panx1 no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica aguda. Uma única

injeção sistêmica de paclitaxel em camundongos Panx1-KO não promoveu a hiperalgesia mecânica na pata dos animais, ao contrário do grupo WT tratado que apresentou hiperalgesia em ambas as patas posteriores (direita e esquerda) por um período total de 6 horas. Analisando o tempo de 3 e 5 horas do grupo selvagem tratado com quimioterápico, foi possível observar que as fêmeas apresentam uma intensidade hiperalgésica significativamente maior em relação aos machos, na quinta hora. Isso pode estar relacionado a um papel funcional distinto dos canais Panx1 para cada macho e fêmeas. Algumas moléculas sinalizadoras exibem funções sexualmente dimórficas na dor inflamatória e neuropática, dentre elas o receptor Toll-like 4 (TLR4), proteína quinase ativada por mitogênio p38 (MAPK), BDNF e canais ativados por ATP como o P2X4 (Inyang et al., 2019; Luo et al., 2018; Rosen et al., 2017; Sorge et al., 2011; Taves et al., 2016; Mapplebeck et al., 2018). Tendo em vista o alto uso do paclitaxel no tratamento do câncer de mama em mulheres, esse novo achado abre discussões para futuras investigações envolvendo Panx1 na dor neuropática sobre os diferentes sexos.

Em contrapartida aos resultados obtidos no modelo agudo, no protocolo crônico de quatro injeções de paclitaxel (2 mg/kg) observa-se o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica tanto em animais WT quanto em animais KO. Porém, o grupo com deleção global para Panx1 apresentou uma intensidade hiperalgésica significativamente menor entre o período de 3 a 7 dias. Após este intervalo de tempo, o grupo KO teve um aumento de hiperalgesia, aproximando-se do limiar mecânico apresentado pelo grupo WT tratado. Assim, a não expressão de Panx1 não impediu a cronificação da hiperalgesia nos animais KO, apenas uma redução da sensibilização periférica induzida por paclitaxel durante fase inicial. Em um estudo recente foi demonstrado que o tratamento com o quimioterápico paclitaxel promove a migração de macrófagos para o gânglio da raiz dorsal e o aumento liberação local da citocina TNF- α , expressivamente nos dias 7 e 14 do protocolo crônico. Nesse mesmo período ocorre também o aumento da hiperalgesia mecânica da pata dos animais, a qual, foi revertida através da depleção de macrófagos (H. Zhang et al., 2016). Deste modo, sugerimos que durante a fase inicial do modelo de neuropatia por paclitaxel (7-14 dias) ocorre um processo inflamatório no GRD que parece envolver, em partes, a participação de canais Panx1. Esta ideia vai de encontro com os ensaios anteriores em que, a ativação de Panx1 parece depender de processos envolvendo inflamação e/ou liberação da citocina IL-1 β .

Mesmo que o foco do trabalho tenha sido o envolvimento dos canais Panx1 no desenvolvimento da neuropatia, é importante salientar que outros canais também participam do processo de cronificação da dor como, por exemplo, os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Já tem sido mostrado uma relação entre receptores NMDA com as panexinas no sistema nervoso

central relacionado à estados de epilepsia e hipóxia de neurônios hipocampais (Bravo et al., 2015). No sistema nervoso periférico, através do modelo animal de dor orofacial por transecção do nervo alveolar inferior, foi observado que a inibição de Panx1 por meio do tratamento com $^{10}\text{Panx}$ no gânglio trigeminal reduz a expressão da proteína NR1 (subunidade do canal NMDA), confirmando a relação entre Panx1 e receptores NMDA em processos de sensibilização neuronal (Yue-ling Li et al., 2021).

A concepção de que o corpo celular do neurônio é capaz de liberar neurotransmissores através de vesículas é assunto recente na literatura científica. Por muitos anos os estudos têm determinado a sinalização sináptica, que ocorre no terminal axonal, como o principal processo envolvido na transmissão do sinal sensorial. O nosso trabalho veio contrapor esta ideia e mostrar que a liberação não-sináptica que ocorre no interior do gânglio da raiz dorsal também se faz importante nesse processo. Até o presente momento, o inibidor de exocitose *Vacuolin-1* (Vac-1) foi utilizado em ensaio *ex vivo* do nervo ciático (Shin et al., 2012) e *in vitro* em culturas do GRD (Jung et al., 2013). Nesse trabalho, foi realizado pela primeira vez a administração *in vivo* de Vac-1 diretamente no GRD-L5 de ratos, previamente à estimulação com agentes inflamatórios na pata.

No modelo de hiperalgisia inflamatória por carragenina, o efeito anti-hiperalgésico promovido pelo inibidor de exocitose Vac-1 apresentou uma farmacodinâmica distinta quando se comparada ao peptídeo $^{10}\text{Panx}$. Na terceira hora após a carragenina, as doses de 30, 50 e 100 μM promoveram a redução da intensidade hiperalgésica mecânica de forma equivalente, o que sugere haver um efeito máximo na inibição da exocitose de vesículas, a qual, independe do aumento da dose aplicada, efeito “tudo ou nada”.

O tratamento com *Vacuolin-1* no GRD-L5 também reduziu de forma significativa a hiperalgisia induzida pela administração intraplantar de IL-1 β (1.0 $\text{pg}/\mu\text{l}$), PGE₂ (100 $\text{ng}/50 \mu\text{l}$) e a resposta nociceptiva pela injeção de capsaicina (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$). Considerando que Vac-1 inibe qualquer tipo de exocitose que esteja ocorrendo no local, não podemos dizer que apenas a liberação de ATP tenha sido inibida em nosso tratamento *in vivo*. Outras moléculas também liberadas pelo mecanismo da exocitose podem ter sido bloqueadas. Foi descrito previamente que a estimulação com KCl em cultura de neurônios do GRD promove a liberação extracelular de glutamato (Kung et al., 2013) e o tratamento com paclitaxel aumenta a liberação de substância P pelas células do GRD (Tatsushima et al., 2011). Logo, é possível que esses mediadores também tenham sido inibidos com o tratamento intraganglionar de *Vacuolin-1* e, por consequência, contribuído para o efeito anti-hiperalgésico. Todavia, estudos que realizaram a inibição ou depleção de canais P2X7 no GRD-L5 mostraram a redução da hiperalgisia induzida por CFA (Neves et al., 2020) e a

diminuição da resposta nociceptiva pela injeção de capsaicina na pata (Lemes et al., 2018), confirmando a liberação de moléculas ATP no GRD durante a sensibilização e nocicepção.

Para o fechamento das avaliações comportamentais decidimos administrar em conjunto os dois inibidores (¹⁰Panx e Vac-1) no gânglio da raiz dorsal (L5-direto) de ratos e, após 30 minutos, aplicar na pata ipsilateral a carragenina, PGE₂ e capsaicina, em grupos distintos. O intuito deste ensaio foi verificar se os canais Panx1 e o processo de exocitose estariam ocorrendo de forma sinérgica durante a nocicepção e hiperalgesia. Os dados obtidos indicaram que apenas no teste da capsaicina houve um efeito cumulativo, isto é, a inibição de canais Panx1 somado ao bloqueio da exocitose de vesículas no GRD reduziram ainda mais a resposta nociceptiva. Sugere-se então, que durante ativação de fibras C, os dois eventos ocorram independentemente.

Em conjunto, nosso estudo demonstrou pela primeira vez o envolvimento de canais Panx1 e o processo de exocitose em processos de dor inflamatória, neuropática e na resposta nociceptiva. Além disso, comprovou que ativação de células do GRD por KCl e a estimulação pela citocina IL-1 β promovem a liberação extracelular de ATP.

7. CONCLUSÕES DOS RESULTADOS

- ✓ No ensaio de imunofluorescência do GRD-L5 encontramos estoques de ATP distribuídos nos corpos de neurônios do tipo A e C bem como em células gliais.
- ✓ A expressão de canais Panx1 foram co-localizados com estoques de ATP em células do GRD-L5.
- ✓ A administração de KCl em culturas do GRD promove a liberação de moléculas de ATP pelo mecanismo de exocitose de vesículas.
- ✓ A citocina IL-1 β promove o aumento dos níveis extracelulares de ATP nas culturas do GRD.
- ✓ Canais Panx1 presente no GRD participa do desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina mas não pela PGE₂.
- ✓ Panx1 se mostra importante na resposta nociceptiva induzida pela capsaicina e na sensibilização periférica induzida por quimioterápico, apenas na fase aguda.
- ✓ No modelo de neuropatia crônica por paclitaxel, os camundongos Panx1-KO também desenvolvem dor crônica periférica apesar de apresentaram reduzida hiperalgesia mecânica na fase inicial.
- ✓ O processo de exocitose de vesículas que ocorre no GRD é importante para sensibilização periférica induzida pela carragenina, IL-1 β , PGE₂ e na nocicepção pela ativação de fibras C.

8. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho nos mostram um importante cenário sobre mecanismos moleculares que ocorrem no gânglio da raiz dorsal durante a transmissão do sinal nociceptivo e sensibilização neuronal. Está claro que existe uma comunicação não sináptica no GRD que é tão importante quanto as sinapses presentes no sistema nervoso central. Embora ainda sejam necessários estudos mais aprofundado sobre a sinalização de ATP, o presente trabalho demonstrou dois importantes componentes envolvidos na sensibilização periférica, canais Panx1 e exocitose de vesículas, que estão constantemente participando da liberação de ATP. Esses novos achados ampliam novas perspectivas sobre o papel do ATP como molécula sinalizadora no gânglio sensorial na transmissão sensorial de dor.

9. FIGURAS SUPLEMENTARES

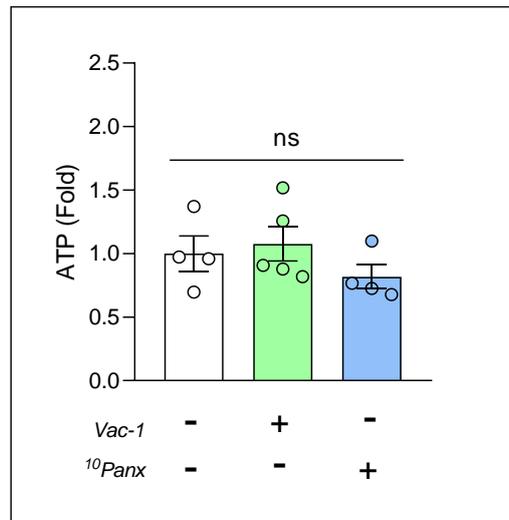


Figura Sup. 1: Níveis de ATP extracelular sobre tratamento isolado dos inibidores Vac-1 e ¹⁰Panx. As drogas Vac-1 (30 μ M) e ¹⁰Panx (100 μ M) não alteraram os níveis de ATP em relação ao grupo controle (*Buffer*). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA uma via. $p < 0.05$.

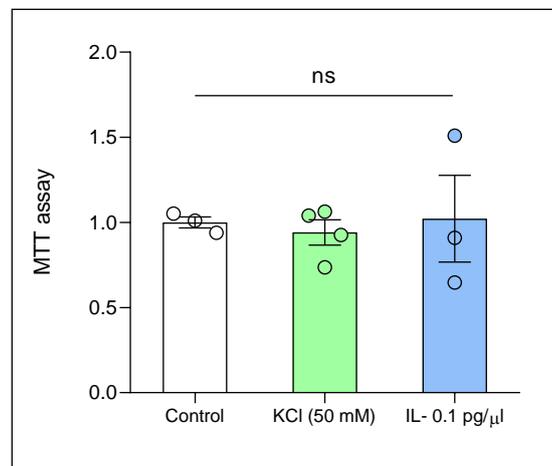


Figura Sup. 2: Análise de viabilidade celular em culturas primárias do GRD. Ensaio de MTT realizado em culturas de 48 horas tratadas com KCl (50 mM) por 2 minutos ou IL-1 β (0.1 pg/ μ l) por 3 horas. Não houve diferença quanto a viabilidade celular entre os grupos analisados. ANOVA uma via. $p < 0.05$.

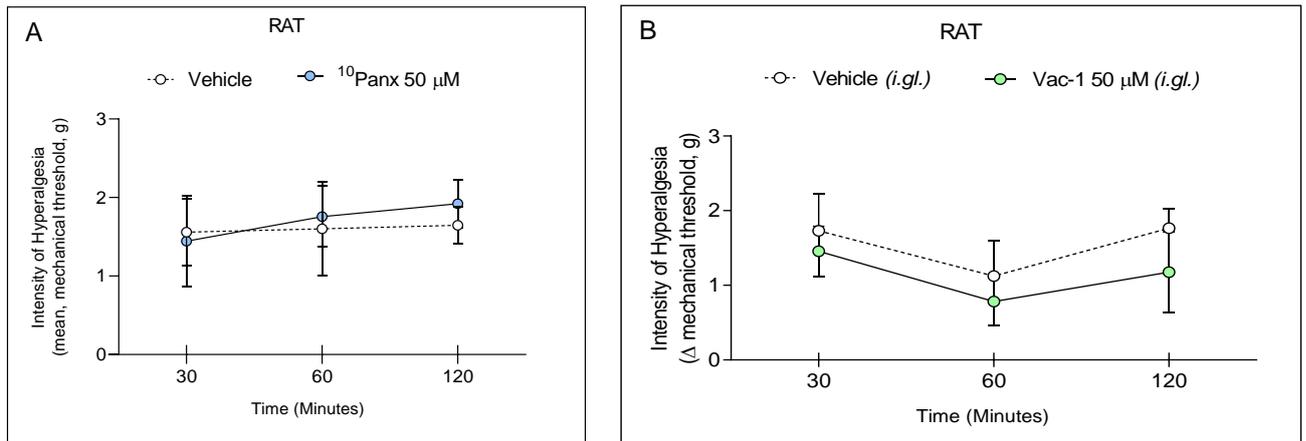


Figura Sup. 3: Avaliação do limiar mecânico basal da pata de ratos tratados com os inibidores. A- Intensidade de hiperalgesia mecânica da pata de ratos 30, 60 e 120 minutos após injeção i.gl. de veículo (Salina) ou 10Panx ($50 \mu\text{M}$). A- Intensidade de hiperalgesia mecânica da pata de ratos 30, 60 e 120 minutos após injeção i.gl. de veículo (Salina + 0,1% DMSO) ou Vac-1 ($30 \mu\text{M}$). Não há diferenças significativas no limiar mecânico entre os grupos em todos os tempos avaliados. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA duas vias seguida do teste de múltiplas comparações Tukey. ($n=4$). $p<0.05$.

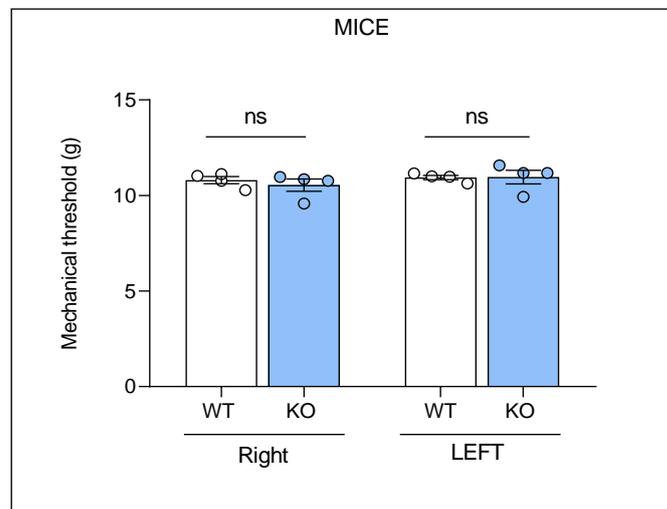


Figura Sup. 4: Avaliação do limiar mecânico basal da pata de camundongos WT e KO. Não houve diferença significativa entre limiar basal da pata de camundongos KO e WT, direita e esquerda. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA uma via. Camundongos ($n=4$; KO e WT). $p<0.05$.

10. REFERÊNCIAS

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., & Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281–341. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3>
- Aich, A., Afrin, L. B., & Gupta, K. (2015). Mast cell-mediated mechanisms of nociception. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29069–29092. <https://doi.org/10.3390/ijms161226151>
- Ambalavanar, R., Moritani, M., & Dessem, D. (2005). Trigeminal P2X3 receptor expression differs from dorsal root ganglion and is modulated by deep tissue inflammation. *Pain*, 117(3), 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.029>
- Amir, R., & Devor, M. (1996). Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *Journal of Neuroscience*, 16(15), 4733–4741. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-15-04733.1996>
- Araldi, D., Ferrari, L. F., Lotufo, C. M., Vieira, A. S., Athié, M. C. P., Figueiredo, J. G., Duarte, D. B., Tambeli, C. H., Ferreira, S. H., & Parada, C. A. (2013). Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3603–3608. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220668110>
- Arvidson, B. (1979). Distribution of intravenously injected protein tracers in peripheral ganglia of adult mice. *Experimental Neurology*, 63(2), 388–410. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(79\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(79)90134-1)
- Atas, A., Agca, O., Sarac, S., Poyraz, A., & Akyol, M. U. (2006). Investigation of ototoxic effects of Taxol on a mice model. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 70(5), 779–784. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2005.11.011>
- Azzi, G., Bernaudin, J. F., Bouchaud, C., Bellon, B., & Fleury-Feith, J. (1990). Permeability of the normal rat brain, spinal cord and dorsal root ganglia microcirculations to immunoglobulins G. *Biology of the Cell*, 68(1–3), 31–36. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(90\)90283-9](https://doi.org/10.1016/0248-4900(90)90283-9)
- Bao, L., Locovei, S., & Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive

- conduits for ATP. *FEBS Letters*, 572(1–3), 65–68.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.009>
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T. L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S., & Panchin, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, 83(4), 706–716.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.025>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Berta, T., Qadri, Y., Tan, P.-H., & Ji, R.-R. (2017). Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(7), 695–703. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1328057>
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G. J., Ji, R.-R., Bean, B. P., Woolf, C. J., & Samad, T. A. (2008). Nociceptors Are Interleukin-1 Sensors. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14062–14073.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008>
- Bravo, D., Maturana, C. J., Pelissier, T., Hernández, A., & Constandil, L. (2015). Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain. *Pharmacological Research*, 101, 86–93.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.016>
- Brenneis, C., Kistner, K., Puopolo, M., Segal, D., Roberson, D., Sisignano, M., Labocha, S., Ferreirós, N., Strominger, A., Cobos, E. J., Ghasemlou, N., Geisslinger, G., Reeh, P. W., Bean, B. P., & Woolf, C. J. (2013). Phenotyping the function of TRPV1-expressing sensory neurons by targeted axonal silencing. *Journal of Neuroscience*, 33(1), 315–326.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2804-12.2013>
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, H. (2003). Pannexins, a family

- of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(23), 13644–13649. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100>
- Burnstock, G. (1995). Current state of purinoceptor research. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, *69*(4), 231–242. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(94\)00043-U](https://doi.org/10.1016/0031-6865(94)00043-U)
- Burnstock, Geoffrey. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*, *27*(3 SPEC. ISS.), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.005>
- Cao, X., Li, L. P., Wang, Q., Wu, Q., Hu, H. H., Zhang, M., Fang, Y. Y., Zhang, J., Li, S. J., Xiong, W. C., Yan, H. C., Gao, Y. B., Liu, J. H., Li, X. W., Sun, L. R., Zeng, Y. N., Zhu, X. H., & Gao, T. M. (2013). Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nature Medicine*, *19*(6), 773–777. <https://doi.org/10.1038/nm.3162>
- Capra, N. F., & Dessem, D. (1993). Central connections of trigeminal primary afferent neurons: Topographical and functional considerations. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *4*(1), 1–52. <https://doi.org/10.1177/10454411920040010101>
- Carvalho, G. B., Mulpuri, Y., Damasio, A., & Spigelman, I. (2019). A Role for The P2Y1 Receptor in Nonsynaptic Cross-depolarization in the Rat Dorsal Root Ganglia. *Neuroscience*, *423*, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.09.038>
- Caterina, M. J., & Julius, D. (2001). The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annual Review of Neuroscience*, *24*(1), 487–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.487>
- Cavaletti, G., Tredici, G., Petruccioli, M. G., Dondè, E., Tredici, P., Marmioli, P., Minoia, C., Ronchi, A., Bayssas, M., & Griffon Etienne, G. (2001). Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *European Journal of Cancer*, *37*(18), 2457–2463. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00300-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00300-8)
- Chatterjea, D., & Martinov, T. (2015). Mast cells: Versatile gatekeepers of pain. *Molecular Immunology*, *63*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.03.001>
- Chen, J., Liang, C., Zong, L., Zhu, Y., & Zhao, H.-B. (2018). Knockout of Pannexin-1 Induces Hearing Loss. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1332. <https://doi.org/10.3390/ijms19051332>

- Chen, Y., Zhang, X., Wang, C., Li, G., Gu, Y., & Huang, L.-Y. M. (2008). Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(43), 16773–16778. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801793105>
- Choi, Y., Raja, S. N., Moore, L. C., & Tobin, J. R. (1996). Neuropathic pain in rats is associated with altered nitric oxide synthase activity in neural tissue. *Journal of the Neurological Sciences*, *138*(1–2), 14–20. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(95\)00325-V](https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00325-V)
- Cunha, T. M., Verri, W. A., Schivo, I. R., Napimoga, M. H., Parada, C. A., Poole, S., Teixeira, M. M., Ferreira, S. H., & Cunha, F. Q. (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of Leukocyte Biology*, *83*(4), 824–832. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907654>
- Cunha, T. M., Verri, W. A., Silva, J. S., Poole, S., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(5), 1755–1760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409225102>
- Dahl, G. (2015). ATP release through pannexon channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1672), 1–11. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0191>
- Decosterd, I., & Woolf, C. J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, *87*(2), 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00276-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00276-1)
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(September), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>
- Devor, M. (1999). Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain*, *82*, S27–S35. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00135-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00135-9)
- Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D., & Wood, J. N. (2000). ATP, P2X receptors and pain pathways. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *81*(1–3), 289–294. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00131-4)
- Dougherty, P. M., Cata, J. P., Cordella, J. V, Burton, A., & Weng, H.-R. (2004). Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain*, *109*(1), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.01.021>

- Du, X., Hao, H., Yang, Y., Huang, S., Wang, C., Gigout, S., Ramli, R., Li, X., Jaworska, E., Edwards, I., Deuchars, J., Yanagawa, Y., Qi, J., Guan, B., Jaffe, D. B., Zhang, H., & Gamper, N. (2017). Local GABAergic signaling within sensory ganglia controls peripheral nociceptive transmission. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(5), 1741–1756. <https://doi.org/10.1172/JCI86812>
- Dublin, P., & Hanani, M. (2007). Satellite glial cells in sensory ganglia: Their possible contribution to inflammatory pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, *21*(5), 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.011>
- Duggett, N. A., Griffiths, L. A., & Flatters, S. J. L. (2017). Paclitaxel-induced painful neuropathy is associated with changes in mitochondrial bioenergetics, glycolysis, and an energy deficit in dorsal root ganglia neurons. *Pain*, *158*(8), 1499–1508. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000939>
- Ebbinghaus, M., Uhlig, B., Richter, F., Von Banchet, G. S., Gajda, M., Bräuer, R., & Schaible, H. G. (2012). The role of interleukin-1 β in arthritic pain: Main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, *64*(12), 3897–3907. <https://doi.org/10.1002/art.34675>
- England, S., Bevan, S., & Docherty, R. J. (1996). PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *Journal of Physiology*, *495*(2), 429–440. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021604>
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments*, *38*. <https://doi.org/10.3791/1918>
- Erzurumlu, R. S., Murakami, Y., & Rijli, F. M. (2010). Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrn2804>
- Feldman-Goriachnik, R., & Hanani, M. (2021). How do neurons in sensory ganglia communicate with satellite glial cells? *Brain Research*, *1760*(February), 147384. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147384>
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., & Di Virgilio, F. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *The Journal of Immunology*, *176*(7), 3877–3883. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.3877>

- Ferrari, L. F., Cunha, F. Q., Parada, C. A., & Ferreira, S. H. (2007). A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *159*(2), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.025>
- Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B., Bristow, A. F., & Poole, S. (1988). Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, *334*(6184), 698–700. <https://doi.org/10.1038/334698a0>
- Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B., & Poole, S. (1993). Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, *110*(3), 1227–1231. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13946.x>
- Ferreira, S. H., Moncada, S., Parsons, M., & Vane, J. R. (1974). The concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. *Brit.J.Pharmacol.*, *52*(1), 108–109.
- Fields, R. D., & Ni, Y. (2010). Nonsynaptic Communication Through ATP Release from Volume-Activated Anion Channels in Axons. *Science Signaling*, *3*(142), ra73–ra73. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001128>
- Finnerup, N. B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R. H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T. S., Kamerman, P. R., Lund, K., Moore, A., Raja, S. N., Rice, A. S. C., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B. H., & Wallace, M. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, *14*(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0)
- Forveille, S., Humeau, J., Sauvat, A., Bezu, L., Kroemer, G., & Kepp, O. (2019). Quinacrine-mediated detection of intracellular ATP. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 629). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.05.050>
- Geisler, J. C., Corbin, K. L., Li, Q., Feranchak, A. P., Nunemaker, C. S., & Li, C. (2013). Vesicular Nucleotide Transporter-Mediated ATP Release Regulates Insulin Secretion. *Endocrinology*, *154*(2), 675–684. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1818>
- Gold, M. S., Reichling, D. B., Shuster, M. J., & Levine, J. D. (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(3), 1108–1112. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1108>

- Gornstein, E., & Schwarz, T. L. (2014). The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology*, *76*(PART A), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.016>
- Grubb, B. D. (1999). Characterization of cultured dorsal root ganglion neuron P2X receptors. *European Journal of Neuroscience*, *11*(1), 149–154. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00426.x>
- Gu, Y., Chen, Y., Zhang, X., Li, G. W., Wang, C., & Huang, L. Y. M. (2010). Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. *Neuron Glia Biology*, *6*(1), 53–62. <https://doi.org/10.1017/S1740925X10000116>
- Gutiérrez-Gutiérrez, G., Sereno, M., Miralles, A., Casado-Sáenz, E., & Gutiérrez-Rivas, E. (2010). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Clinical features, diagnosis, prevention and treatment strategies. *Clinical and Translational Oncology*, *12*(2), 81–91. <https://doi.org/10.1007/S12094-010-0474-z>
- Hamilton, S. G., Wade, A., & McMahon, S. B. (1999). The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *British Journal of Pharmacology*, *126*(1), 326–332. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702258>
- Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. *Brain Research Reviews*, *48*(3), 457–476. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>
- Hanani, M. (2012). Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: Implications for chronic pain. *Brain Research*, *1487*, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.070>
- Hanner, F., Lam, L., Nguyen, M. T. X., Yu, A., & Peti-Peterdi, J. (2012). Intrarenal localization of the plasma membrane ATP channel pannexin1. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *303*(10), 1454–1459. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00206.2011>
- Hanstein, R., Hanani, M., Scemes, E., & Spray, D. C. (2016). Glial pannexin1 contributes to tactile hypersensitivity in a mouse model of orofacial pain. *Scientific Reports*, *6*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep38266>
- Hanstein, R., Negoro, H., Patel, N. K., Charollais, A., Meda, P., Spray, D. C., Suadicani, S. O., & Scemes, E. (2013). Promises and pitfalls of a Pannexin1 transgenic mouse line. *Frontiers in Pharmacology*, *4* MAY(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00061>

- Henriques, M. G., Silva, P. M., Martins, M. A., Flores, C. A., Cunha, F. Q., Assreuy-Filho, J., & Cordeiro, R. S. (1987). Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, *20*(2), 243–249. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3690058>
- Huang, L. Y. M., Gu, Y., & Chen, Y. (2013). Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia*, *61*(10), 1571–1581. <https://doi.org/10.1002/glia.22541>
- Igwe, O. J., Murray, J. N., & Moolwaney, A. S. (2001). Interleukin 1-induced cyclooxygenase and nitric oxide synthase gene expression in the rat dorsal root ganglia is modulated by antioxidants. *Neuroscience*, *105*(4), 971–985. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00253-6)
- Inoue, H., Kuroda, H., Ofusa, W., Oyama, S., Kimura, M., Ichinohe, T., & Shibukawa, Y. (2021). Functional coupling between the p2x7 receptor and pannexin-1 channel in rat trigeminal ganglion neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115978>
- Inyang, K. E., Szabo-Pardi, T., Wentworth, E., McDougal, T. A., Dussor, G., Burton, M. D., & Price, T. J. (2019). The antidiabetic drug metformin prevents and reverses neuropathic pain and spinal cord microglial activation in male but not female mice. *Pharmacological Research*, *139*(November 2018), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.10.027>
- Isakson, B. E., & Thompson, R. J. (2014). Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signaling. *Channels*, *8*(2), 118–123. <https://doi.org/10.4161/chan.27978>
- JANCSÓ, N., JANCSÓ-GÁBOR, A., & SZOLCSÁNYI, J. (1967). DIRECT EVIDENCE FOR NEUROGENIC INFLAMMATION AND ITS PREVENTION BY DENERVATION AND BY PRETREATMENT WITH CAPSAICIN. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, *31*(1), 138–151. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1967.tb01984.x>
- Jasmin, L., Vit, J. P., Bhargava, A., & Ohara, P. T. (2010). Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? *Neuron Glia Biology*, *6*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1017/S1740925X10000098>
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S. C., & Treede, R.-D. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain*, *152*(10), 2204–2205. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>

- Jimenez-Andrade, J. M., Herrera, M. B., Ghilardi, J. R., Vardanyan, M., Melemedjian, O. K., & Mantyh, P. W. (2008). Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: Implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Molecular Pain*, *4*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-10>
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, *413*(6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>
- Jung, J., Shin, Y. H., Konishi, H., Lee, S. J., & Kiyama, H. (2013). Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *430*(2), 488–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.009>
- Khakh, B. S., & North, R. A. (2012). Neuromodulation by Extracellular ATP and P2X Receptors in the CNS. *Neuron*, *76*(1), 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Tokunaga, A., & Noguchi, K. (2005). Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *481*(4), 377–390. <https://doi.org/10.1002/cne.20393>
- Kung, L. H., Gong, K., Adedoyin, M., Ng, J., Bhargava, A., Ohara, P. T., & Jasmin, L. (2013). Evidence for Glutamate as a Neuroglial Transmitter within Sensory Ganglia. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068312>
- Lemes, J. B. P., de Campos Lima, T., Santos, D. O., Neves, A. F., de Oliveira, F. S., Parada, C. A., & da Cruz Lotufo, C. M. (2018). Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception. *Neuroscience Letters*, *676*(April), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.003>
- Lent, R. (2010). *Cem Bilhões de Neurônios*. Capítulo 7: Os Sentidos do Corpo. Estrutura e Função do Sistema Somestésico. As dores do corpo. p. 250-250.
- Li, Yan, North, R. Y., Rhines, L. D., Tatsui, C. E., Rao, G., Edwards, D. D., Cassidy, R. M., Harrison, D. S., Johansson, C. A., Zhang, H., & Dougherty, P. M. (2018). Drg voltage-gated sodium channel 1.7 is upregulated in paclitaxel-induced neuropathy in rats and in humans with neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, *38*(5), 1124–1136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0899-17.2017>
- Li, Yue-ling, Liu, F., Zhang, Y., Lin, J., Huang, C., Fu, M., Zhou, C., Li, C., & Shen, J. (2021).

- NMDAR1-Src-Pannexin1 Signal Pathway in the Trigeminal Ganglion Contributed to Orofacial Ectopic Pain Following Inferior Alveolar Nerve Transection. *Neuroscience*, 466, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.04.032>
- Linhart, O., Obreja, O., & Kress, M. (2003). The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin e2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 118(1), 69–74. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00960-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00960-0)
- Linley, J. E., Rose, K., Ooi, L., & Gamper, N. (2010). Understanding inflammatory pain: Ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 459(5), 657–669. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0784-6>
- Liu, X., Zhou, J. L., Chung, K., & Chung, J. M. (2001). Ion channels associated with the ectopic discharges generated after segmental spinal nerve injury in the rat. *Brain Research*, 900(1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02274-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02274-0)
- Locovei, S., Bao, L., & Dahl, G. (2006). Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7655–7659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601037103>
- Luo, X., Fitzsimmons, B., Mohan, A., Zhang, L., Terrando, N., Kordasiewicz, H., & Ji, R. R. (2018). Intrathecal administration of antisense oligonucleotide against p38 α but not p38 β MAP kinase isoform reduces neuropathic and postoperative pain and TLR4-induced pain in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 72, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.007>
- Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J., & Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5113–5117. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5113>
- Masuda, T., Ozono, Y., Mikuriya, S., Kohro, Y., Tozaki-Saitoh, H., Iwatsuki, K., Uneyama, H., Ichikawa, R., Salter, M. W., Tsuda, M., & Inoue, K. (2016). Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12529>
- Matsuka, Y., Neubert, J. K., Maidment, N. T., & Spigelman, I. (2001). Concurrent release of ATP and substance P within guinea pig trigeminal ganglia in vivo. *Brain Research*, 915(2), 248–255. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02888-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02888-8)

- Meacham, K., Shepherd, A., Mohapatra, D. P., & Haroutounian, S. (2017). Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Current Pain and Headache Reports*, 21(6). <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0629-5>
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3)
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Neves, A. F., Farias, F. H., de Magalhães, S. F., Araldi, D., Pagliusi, M., Tambeli, C. H., Sartori, C. R., Lotufo, C. M. da C., & Parada, C. A. (2020). Peripheral Inflammatory Hyperalgesia Depends on P2X7 Receptors in Satellite Glial Cells. *Frontiers in Physiology*, 11(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00473>
- Nishida, K., Nomura, Y., Kawamori, K., Moriyama, Y., & Nagasawa, K. (2014). Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters*, 579, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.07.017>
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- Oh, E. J., & Weinreich, D. (2002). Chemical communication between vagal afferent somata in nodose ganglia of the rat and the guinea pig in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 87(6), 2801–2807. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.6.2801>
- Oliveira-Fusaro, M. C. G., Zanoni, C. I. S., dos Santos, G. G., Manzo, L. P., Araldi, D., Bonet, I. J. M., Tambeli, C. H., Dias, E. V., & Parada, C. A. (2017). Antihyperalgesic effect of CB1receptor activation involves the modulation of P2X3receptor in the primary afferent neuron. *European Journal of Pharmacology*, 798(August 2016), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.030>
- Oliveira, M. C. G., Pelegri-da-Silva, A., Tambeli, C. H., & Parada, C. A. (2009). Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X3,2/3 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*, 141(1–2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.10.024>

- Pagliusi, M., Bonet, I. J. M., Lemes, J. B. P., Oliveira, A. L. L., Carvalho, N. S., Tambeli, C. H., Parada, C. A., & Sartori, C. R. (2020). Social defeat stress-induced hyperalgesia is mediated by nav 1.8+ nociceptive fibers. *Neuroscience Letters*, 729(January), 135006. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135006>
- Pangršič, T., Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Fabbretti, E., Nistri, A., Pryazhnikov, E., Khiroug, L., Giniatullin, R., & Zorec, R. (2007). Exocytotic Release of ATP from Cultured Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28749–28758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700290200>
- Pannese, E., Ledda, M., Cherkas, P. S., Huang, T. Y., & Hanani, M. (2003). Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anatomy and Embryology*, 206(5), 337–347. <https://doi.org/10.1007/s00429-002-0301-6>
- Pelegri, P., & Surprenant, A. (2009). The P2X7 receptor - Pannexin connection to dye uptake and IL-1 β release. *Purinergic Signalling*, 5(2), 129–137. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9141-7>
- Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.017>
- Piardi, L. N., Pagliusi, M., Bonet, I. J. M., Brandão, A. F., Magalhães, S. F., Zanelatto, F. B., Tambeli, C. H., Parada, C. A., & Sartori, C. R. (2020). Social stress as a trigger for depressive-like behavior and persistent hyperalgesia in mice: study of the comorbidity between depression and chronic pain. *Journal of Affective Disorders*, 274(December 2019), 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.05.144>
- Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A., & Chiu, I. M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology*, 38(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). *Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin* (pp. 1–17). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Prado, F. C., Araldi, D., Vieira, A. S., Oliveira-Fusaro, M. C. G., Tambeli, C. H., & Parada, C. A. (2013). Neuronal P2X3 receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation.

- Neuropharmacology*, 67, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.011>
- Raja, S. N., Meyer, R. A., & Campbell, J. N. (1988). Peripheral Mechanisms of Somatic Pain. *Anesthesiology*, 68(4), 571–590. <https://doi.org/10.1097/00000542-198804000-00016>
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413–492. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0_5
- Ransford, G. A., Fregien, N., Qiu, F., Dahl, G., Conner, G. E., & Salathe, M. (2009). Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(5), 525–534. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0367OC>
- Riedel, W., & Neeck, G. (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 60(6), 404–415. <https://doi.org/10.1007/s003930170003>
- Roberts, J. A., Vial, C., Digby, H. R., Agboh, K. C., Wen, H., Atterbury-Thomas, A., & Evans, R. J. (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 452(5), 486–500. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0073-6>
- Ronchetti, S., Migliorati, G., & Delfino, D. V. (2017). Association of inflammatory mediators with pain perception. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96(December), 1445–1452. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.001>
- Rosen, S., Ham, B., & Mogil, J. S. (2017). Sex differences in neuroimmunity and pain. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1–2), 500–508. <https://doi.org/10.1002/jnr.23831>
- Sachs, D., Villarreal, C. F., Cunha, F. Q., Parada, C. A., & Ferreira, S. H. (2009). The role of PKA and PKC η pathways in prostaglandin E₂-mediated hypernociception. *British Journal of Pharmacology*, 156(5), 826–834. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00093.x>
- Santiago, M. F., Veliskova, J., Patel, N. K., Lutz, S. E., Caille, D., Charollais, A., Meda, P., & Scemes, E. (2011). Targeting pannexin1 improves seizure outcome. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025178>
- Scemes, E., Suadicani, S. O., Dahl, G., & Spray, D. C. (2007). Connexin and pannexin mediated cell–cell communication. *Neuron Glia Biology*, 3(3), 199–208. <https://doi.org/10.1017/S1740925X08000069>
- Sekiguchi, F., Aoki, Y., Nakagawa, M., Kanaoka, D., Nishimoto, Y., Tsubota-Matsunami, M., Yamanaka, R., Yoshida, S., & Kawabata, A. (2013). AKAP-dependent sensitization of Cav3.2

- channels via the EP 4 receptor/cAMP pathway mediates PGE2-induced mechanical hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, *168*(3), 734–745. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02174.x>
- Seretny, M., Currie, G. L., Sena, E. S., Ramnarine, S., Grant, R., MacLeod, M. R., Colvin, L. A., & Fallon, M. (2014). Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain*, *155*(12), 2461–2470. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.020>
- Shin, Y. H., Lee, S. J., & Jung, J. (2012). Secretion of ATP from Schwann cells through lysosomal exocytosis during Wallerian degeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *429*(3–4), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.121>
- Silverman, W. R., de Rivero Vaccari, J. P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S. K., Scemes, E., Keane, R. W., & Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(27), 18143–18151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004804>
- Snider, W. D., & McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. *Neuron*, *20*(4), 629–632. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81003-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81003-X)
- Sorge, R. E., LaCroix-Fralish, M. L., Tuttle, A. H., Sotocinal, S. G., Austin, J. S., Ritchie, J., Chanda, M. L., Graham, A. C., Topham, L., Beggs, S., Salter, M. W., & Mogil, J. S. (2011). Spinal cord toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *Journal of Neuroscience*, *31*(43), 15450–15454. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3859-11.2011>
- Sosinsky, G. E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H. S., Laird, D. W., MacVicar, B. A., Naus, C. C., Penuela, S., Scemes, E., Spray, D. C., Thompson, R. J., Zhao, H. B., & Dahl, G. (2011). Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels*, *5*(3), 193–197. <https://doi.org/10.4161/chan.5.3.15765>
- Spray, D. C., & Hanani, M. (2019). Gap junctions, pannexins and pain. *Neuroscience Letters*, *695*, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.035>
- Suadicani, S. O., Cherkas, P. S., Zuckerman, J., Smith, D. N., Spray, C., Hanani, M., Spray, D. C., & Hanani, M. (2010). Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia. *Neuron Glia Biology*, *6*(1), 43–51. <https://doi.org/10.1017/S1740925X09990408>. Bidirectional

- Suadicani, S. O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D. C., & Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia*, *60*(7), 1106–1116. <https://doi.org/10.1002/glia.22338>
- Takeda, M., Takahashi, M., & Matsumoto, S. (2009). Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *33*(6), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.12.005>
- Takeda, M., Tanimoto, T., Nasu, M., Ikeda, M., Kadoi, J., & Matsumoto, S. (2005). Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. *Pain*, *116*(3), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.05.007>
- Tatsushima, Y., Egashira, N., Kawashiri, T., Mihara, Y., Yano, T., Mishima, K., & Oishi, R. (2011). Involvement of substance P in peripheral neuropathy induced by paclitaxel but not oxaliplatin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *337*(1), 226–235. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.175976>
- Taves, S., Berta, T., Liu, D. L., Gan, S., Chen, G., Kim, Y. H., Van de Ven, T., Laufer, S., & Ji, R. R. (2016). Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain, Behavior, and Immunity*, *55*, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.10.006>
- Teixeira, J. M., Oliveira, M. C. G., Nociti, F. H., Clemente-Napimoga, J. T., Pelegrini-da-Silva, A., Parada, C. A., & Tambeli, C. H. (2010). Involvement of temporomandibular joint P2X3 and P2X2/3 receptors in carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, *645*(1–3), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.06.008>
- Thompson, R. J., Jackson, M. F., Olah, M. E., Rungta, R. L., Hines, D. J., Beazely, M. A., MacDonald, J. F., & MacVicar, B. A. (2008). Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science*, *322*(5907), 1555–1559. <https://doi.org/10.1126/science.1165209>
- Thompson, R. J., Zhou, N., & Macvicar, B. A. (2006). Junction Hemichannels. *Science*, *851*(May), 924–927.
- Tsuda, M., Koizumi, S., Kita, A., Shigemoto, Y., Ueno, S., & Inoue, K. (2000). Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X2/3 receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. *The*

- Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(15), 1–5.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-15-j0007.2000>
- Tsuda, Makoto, Masuda, T., Tozaki-Saitoh, H., & Inoue, K. (2013). P2X4 receptors and neuropathic pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(OCT), 1–6.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00191>
- Vandenbeuch, A., Anderson, C. B., & Kinnamon, S. C. (2015). Mice Lacking Pannexin 1 Release ATP and Respond Normally to All Taste Qualities. *Chemical Senses*, 40(7), 461–467.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjv034>
- Villarreal, C. F., Funez, M. I., Figueiredo, F., Cunha, F. Q., Parada, C. A., & Ferreira, S. H. (2009). Acute and persistent nociceptive paw sensitisation in mice: The involvement of distinct signalling pathways. *Life Sciences*, 85(23–26), 822–829.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.018>
- Vivancos, G. G., Verri, W. A., Cunha, T. M., Schivo, I. R. S., Parada, C. A., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(3), 391–399. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300017>
- Weisblum, B., & De Haseth, P. L. (1972). Quinacrine, A Chromosome Stain Specific for Deoxyadenylate-Deoxythymidylate-Rich Regions in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(3), 629–632. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.3.629>
- Whyte-Fagundes, P., Kurtenbach, S., Zoidl, C., Shestopalov, V. I., Carlen, P. L., & Zoidl, G. (2018). A Potential Compensatory Role of Panx3 in the VNO of a Panx1 Knock Out Mouse Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00135>
- Woolf, C. J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., & Poole, S. (1997). Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: The contribution of tumour necrosis factor α . *British Journal of Pharmacology*, 121(3), 417–424. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701148>
- Yu, X., Liu, H., Hamel, K. A., Morvan, M. G., Yu, S., Leff, J., Guan, Z., Braz, J. M., & Basbaum, A. I. (2020). Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nature Communications*, 11(1), 264.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13839-2>
- Zhang, H., Li, Y., de Carvalho-Barbosa, M., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Albrecht, P. J., &

- Dougherty, P. M. (2016). Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *The Journal of Pain*, *17*(7), 775–786. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.02.011>
- Zhang, X., Chen, Y., Wang, C., & Huang, L.-Y. M. (2007). Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(23), 9864–9869. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611048104>
- Zhang, Y., Laumet, G., Chen, S. R., Hittelman, W. N., & Pan, H. L. (2015). Pannexin-1 up-regulation in the dorsal root ganglion contributes to neuropathic pain development. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(23), 14647–14655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.650218>
- Zou, J., Hu, B., Arpag, S., Yan, Q., Hamilton, A., Zeng, Y. S., Vanoye, C. G., & Li, J. (2015). Reactivation of lysosomal Ca²⁺ efflux rescues abnormal lysosomal storage in FIG4-deficient cells. *Journal of Neuroscience*, *35*(17), 6801–6812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4442-14.2015>

ANEXO 1 - Certificado CEUA: 4566-1/2017.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo da liberação de ATP no gânglio da raiz dorsal em dor aguda e inflamatória**, registrada com o nº **4566-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada e Júlia Borges Paes Lemes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **14 de julho de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	05/06/2017-05/03/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/07/2017-05/03/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	238
Peso / Idade:	07 semanas / 200g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 14 de julho de 2017.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Afonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO 2 - Certificado Adendo CEUA: 4566-1(A)/2019.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Estudo da liberação de ATP no gânglio da raiz dorsal em dor aguda e inflamatória, registrada com o nº 4566-1(A)/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada e Júlia Borges Paes Lemes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 13/06/2019.

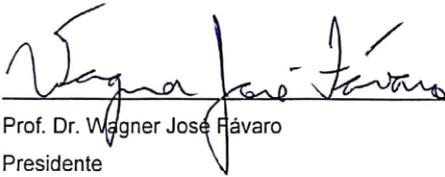
Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2019 a 02/03/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	13/06/2019 a 02/03/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	24 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	24 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	27
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 120.00 Gramas
Sexo:	27 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	24 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 120.00 Gramas



Sexo:	24 Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério LED, Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB /UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 14 de junho de 2019.


 Prof. Dr. Wagner José Fávares
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO 3 - Certificate IACUC: 00001131.



Science at the heart of medicine

Jorge N. Larocca
IACUC Administrator
Institutional Animal Care and Use Committee

Jack and Pearl Resnick Campus
1225 Morris Park Ave., Bronx, NY 10461
Tel: 718.839.7152 Fax: 718.862.1883
jorge.larocca@einsteinmed.org

April 22, 2021

Animal Use Protocol Title: Pannexin 1 channels and ATP signaling in mechanisms of peripheral pain sensitization
Animal Use Protocol Number: 00001131
Principal Investigator: Dr. Sylvia O. Suadicani

To Whom It May Concern:

The animal experimentation performed by Julia Lemes in the laboratory of Dr. Suadicani was cover by protocol number 00001131. This protocol was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) on 06/17/2020 for a three-year period extending through 06/17/2023.

Our approved Animal Welfare Assurance (D16-00200) is on file with the Office for Laboratory Animal Welfare. Albert Einstein College of Medicine has been fully accredited by the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) since February 22, 1983.

A handwritten signature in cursive script that reads "Jorge N. Larocca".

Jorge N. Larocca, PhD
Administrator
Institutional Animal Care and Use Committee

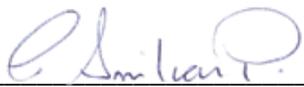
ANEXO 4 - Declaração de direitos autorais:

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congresso sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo da liberação de ATP mediada por Panx1 e excitose no gânglio da raiz dorsal: efeito sobre a nocicepção e hiperalgesia**, não infringem os dispositivos da lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de agosto de 2021

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Julia Borges Paes Lemes**
RG n.º 15.226.919

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Carlos Amilcar Parada**
RG n.º 7962.382