

**João Nathanael Lima Torres**

**Expressão gênica e proteica de receptores purinérgicos  
(P2X) em pele, músculo e gânglios da raiz dorsal em  
modelo de incisão plantar em ratos.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia, Ciências  
Cirúrgicas e Medicina Perioperatória

Área de concentração: Anestesia e  
Analgesia

Orientador: Dr. Hazem Adel Ashmawi

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Torres, João Nathanael Lima  
Expressão gênica e proteica de receptores  
purinérgicos (P2X) em pele, músculo e gânglios da  
raiz dorsal em modelo de incisão plantar em ratos /  
João Nathanael Lima Torres. -- São Paulo, 2022.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas  
e Medicina Perioperatória. Área de Concentração:  
Anestesia e Analgesia.  
Orientador: Hazem Adel Ashmawi.

Descritores: 1.Dor aguda 2.Hiperalgisia  
3.Receptores purinérgicos 4.Ratos 5.Reação em cadeia  
da polimerase 6.Western blotting 7.Dor pós-operatória

USP/FM/DBD-434/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

À minha esposa Adriana, aos meus filhos Murilo, Rodrigo e Alice que são o amor incondicional e a força de vontade para ser alguém melhor. Amo vocês!

Dedico aos meus pais, exemplo de educação e fonte primária e primordial de ética desde a infância.

Dedico aos Professores: Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (In Memoriam) e Doutor Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, por vislumbrarem na pesquisa científica com o LAFICA-UFC (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer – Universidade Federal do Ceará) a excelência e o conhecimento. Uma oportunidade ímpar para meu crescimento pessoal e profissional durante a graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador Professor Doutor Hazem Adel Ashmawi, exemplo de dedicação e ensino. Obrigado por ensinar-me o caminho da ética, do conhecimento e da pesquisa científica.

Ao Professor Doutor Luiz Fernando Onuchic e ao LIM/29 (Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular) pela oportunidade, disponibilidade e auxílio durante a fase de experimentação em biologia molecular.

Ao HCFMUSP e à sua equipe de controle da dor pela formação recebida. Sinto-me honrado em ter feito parte desta equipe.

Ao Laboratório de Anestesia (LIM/08) da FMUSP, pela oportunidade de realização deste projeto.

Especial agradecimento ao Gilberto de Mello Nascimento, técnico do LIM/08. Grato pela sua dedicação ao laboratório e aos animais de experimentação. Sua ajuda foi imprescindível.

À Andressa Godoy Amaral pela imensa ajuda em ensinar sobre o mundo da biologia molecular com maestria e disposição. O meu sincero obrigado!

À FAPESP por financiar e acreditar no projeto e possibilidade transformadora do mesmo.

Aos animais de experimentação, dedico todo o meu respeito e gratidão.

“A inquietude é o estímulo essencial à pesquisa científica”

— Anderson Vailati Ritzman

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

## SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Epígrafe

Lista de figuras

Tabelas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Abstract

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Teste comportamental.....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Guarding pain.....	23
3.1.2. Hiperalgesia térmica.....	23
3.1.3. Hiperalgesia mecânica.....	24
<b>3.2. Marcação tecidual de receptores e genotipagem.....</b>	<b>24</b>
3.2.1. Obtenção de tecidos.....	24
3.2.2. Obtenção do RNA.....	25
3.2.3. PCR quantitativo.....	26
3.2.4. Gene controle.....	26
3.2.5. Protocolo experimental.....	28
3.2.6. Western blotting.....	28
<b>3.3. Microdiálise.....</b>	<b>29</b>
3.3.1. Preparo dos animais.....	30
<b>3.4. Estudo comportamental.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5. Análise estatística.....</b>	<b>31</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Expressão dos receptores purinérgicos.....</b>	<b>44</b>
5.1.1. Expressão do P2X3.....	44

5.1.2. Expressão do P2X4.....	46
5.1.3. Expressão do P2X7.....	47
5.2. Microdiálise do ATP.....	48
6. CONCLUSÕES .....	50
7. REFERÊNCIAS .....	51

## **ANEXOS**

## Lista de figuras

FIGURA 1- Figura esquemática da distribuição dos receptores p2X durante transmissão nociceptiva.....	17
FIGURA 2- Limiar de retirada da pata após estímulo térmico e mecânico no modelo de incisão plantar em animais com e sem PPADS intraplantar.....	32
FIGURA 3- Comportamento de guarda da pata no modelo de incisão plantar em animais com e sem PPADS intraplantar.....	32
FIGURA 4- Expressão dos mRNAs de P2X1-7 na pele após incisão plantar em ratos.....	33
FIGURA 5- Expressão proteica de P2X4 em pele.....	34
FIGURA 6- Expressão dos mRNAs de P2X1-7 em músculo após incisão plantar em ratos.....	35
FIGURA 7- Expressão proteica de P2X4 em músculo.....	36
FIGURA 8- Expressão dos mRNAs de P2X3, P2X4 e P2X7 no gânglio da raiz dorsal após incisão plantar em ratos.....	37
FIGURA 9- Expressão proteica de P2X4 em gânglio da raiz dorsal.....	38
FIGURA 10- Expressão proteica de P2X3 no gânglio da raiz dorsal.....	39
FIGURA 11- Estabilização do ATP.....	40
FIGURA 12- Coeficiente de permeabilidade <i>in vitro</i> do filamento de microdiálise.....	41
FIGURA 13- Concentração de ATP no dialisado <i>in vivo</i> após incisão.....	42

## TABELAS

TABELA 1- Sequências de pares de “ <i>primers</i> ” para amplificação das sequências dos genes da família P2X e dos genes de expressão constitutiva (TBP e GUSB).....	27
---	----

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

° C	Graus Celsius
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ASIC	Canal Iônico Sensível ao Ácido
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Bovine Serum Albumine
BCA	Ácido Bicinconínico
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CA	Califórnia
CW	Continuous Wave
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GADPH	Gliceraldeido-3-Fostato Desidrogenase
GUSB	Beta-Glicuronidase
HCl	Ácido Clorídrico
IA	Iowa
IL	Illinois
IRDYE	Infrared Dyes
KDa	Kilo Dalton
L3, L4 E L5	Vértebra Lombar Correspondente ao
LIM	Laboratório de Investigação Médica
P2X	Receptor Ionotrópico Purinérgico
P2Y	Receptor Metabotrópico Purinérgico
LTDA	Sociedade Limitada
MA	Massachusetts
Min	Minuto
mm	Milímetro
mM	milimol
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
P2X1-7	Família Receptores P2x do 1 ao 7
PBS	Phosphate Buffer Saline

POD	Dia Pós-Incisão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPADS	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2-4 dissulfônico
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase H	Ribonuclease H
RPL1	Proteína ribossômica L1
RPM	Rotações por Minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)
TBP	Tata Box Protein
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TTBS	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TX	Texas
δ	Delta
μ	Micro

## RESUMO

Torres JNL. Expressão gênica e proteica de receptores purinérgicos (P2X) em pele, músculo e gânglios da raiz dorsal em modelo de incisão plantar em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A dor aguda pós-operatória de intensidade moderada ou forte ainda é de alta prevalência. O seu tratamento adequado melhora a experiência do paciente, diminui a morbidade pós-operatória e reduz os custos do tratamento. A fisiopatologia da dor pós-operatória ainda não é completamente entendida, mesmo com os modelos experimentais que vem sendo propostos. Diversos receptores estão envolvidos na transdução ou modulação do sinal doloroso. Uma das famílias de receptores envolvidos é a dos receptores purinérgicos P2X, que media a ação nociceptiva do ATP e está envolvida em dor crônica, neuropática e inflamatória. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão gênica de mRNA dos receptores purinérgicos da família P2X nos gânglios da raiz dorsal de L3, L4 e L5, músculo e pele da pata de rato em modelo de dor pós-operatória; e avaliar a tradução de P2X4 e P2X3 no mesmo modelo. Foi usado modelo de dor incisional e estudados os comportamentos dolorosos associados: guarda de pata e hiperalgesia mecânica e térmica. Foram obtidos tecidos dos gânglios das raízes dorsais de L3, L4 e L5, pele e músculo da pata incisionada. Foi realizado RT-PCR quantitativo por transcrição reversa e ensaio imunoenzimático. Resultados: Na pele, P2X4 teve aumento em sua expressão após 12 e 48 horas, voltando a valores basais no quinto dia pós incisão. P2X3 apresentou diminuição, que foi significativa, em sua expressão no 1º e 5º dias, assim como P2X7 que teve diminuição significativa no 1º, 5º e manteve-se com expressão diminuída no 10º dia pós incisão. Em músculo, houve aumento do P2X4 após 12h e 2º dia. No 10º dia a expressão ainda era maior que o valor basal. P2X6 diminuiu em todos os momentos. P2X3 aumentou no 2º e 5º dias, no 10º dia o valor era próximo ao basal. Os outros receptores purinérgicos não tiveram alterações significativas em suas expressões. Houve diminuição importante da expressão de mRNA de P2X3 no gânglio da raiz dorsal entre 1º e 5º dia e entre 1º 4h e 10º dia. Expressões do mRNA de P2X4 e P2X7 não se alteraram durante o período avaliado. Expressão proteica de P2X4 no gânglio da raiz dorsal aumentou nas 48h comparado ao valor basal. Expressão proteica de P2X3 no gânglio da raiz dorsal não mostrou modificação relevante no período avaliado. Conclusão: O modelo de dor pós-incisional em pata de ratos causou aumento da expressão gênica e proteica de receptor P2X4 em gânglio da raiz dorsal, pele e músculo, inferindo sua participação no mecanismo de dor pós-operatória aguda. Ainda mais estudos são necessários para comprovar a participação dos receptores purinérgicos no mecanismo de dor aguda pós-operatória.

Palavras-chave: Dor aguda. Hiperalgesia. Receptores purinérgicos. Ratos. Reação em cadeia da polimerase. Western blotting. Dor pós-operatória.

## ABSTRACT

Torres JNL. Gene and protein expression of purinergic (P2X) receptors in skin, muscle and dorsal root ganglia in a rat plantar incision model [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2022.

Acute postoperative pain of moderate or severe intensity is still highly prevalent. Proper treatment improves the patient experience, decreases postoperative morbidity and reduces treatment costs. The pathophysiology of postoperative pain is still not completely understood, even with the experimental models that have been proposed. Several receptors are involved in the transduction or modulation of the pain signal. One of the receptor families involved is the purinergic P2X receptors, which mediate the nociceptive action of ATP and are involved in chronic, neuropathic and inflammatory pain. The aim of the study was to evaluate the mRNA gene expression of the purinergic receptors of the P2X family in the dorsal root ganglia of L3, L4 and L5, muscle and skin of the rat paw in a model of postoperative pain; and to evaluate the translation of P2X4 and P2X3 in the same model. An incisional pain model was used and the associated painful behaviors were studied: paw guarding and mechanical and thermal hyperalgesia. Tissues were obtained from the dorsal root ganglia of L3, L4 and L5, skin and muscle of the incised paw. Quantitative RT-PCR was performed by reverse transcription and enzyme immunoassay. Results: In the skin, P2X4 had an increase in its expression after 12 and 48 hours, returning to baseline values on the fifth day after incision. P2X3 showed a decrease, which was significant, in its expression on the 1st and 5th days, as well as P2X7, which had a significant decrease on the 1st, 5th and remained with reduced expression on the 10th post-incision day. In muscle, there was an increase in P2X4 after 12h and 2nd day. On the 10th day, the expression was still higher than the baseline value. P2X6 decreased at all times. P2X3 increased on the 2nd and 5th days, on the 10th day the value was close to baseline. The other purinergic receptors had no significant changes in their expressions. There was a significant decrease in P2X3 mRNA expression in the dorsal root ganglion between the 1st and 5th day and between the 1st and 4th day. P2X4 and P2X7 mRNA expressions did not change during the period evaluated. P2X4 protein expression in the dorsal root ganglion increased at 48h compared to baseline. Protein expression of P2X3 in the dorsal root ganglion showed no relevant modification in the period evaluated. Conclusion: The post-incisional pain model in rat paws caused an increase in P2X4 receptor gene and protein expression in dorsal root ganglion, skin and muscle, inferring its participation in the mechanism of acute postoperative pain. Even more studies are needed to prove the role of purinergic receptors in the mechanism of acute postoperative pain.

Keywords: Acute pain. Hyperalgesia. Purinergic receptors. Rats. PCR. Western blotting. Postoperative pain.

## 1. INTRODUÇÃO

A dor pós-operatória é uma forma única e comum de dor aguda. Evidências indicam que o tratamento apropriado e suficiente da dor pós-operatória diminui a morbidade perioperatória, contribui para o retorno precoce às atividades laborais, bem como acelera a alta hospitalar, diminuindo custo total do tratamento ((1)(2)). Sabe-se também que o alívio da dor pós-operatória tem efeito de longo prazo, como a diminuição no risco do desenvolvimento de dor pós-operatória crônica (3–5). Entretanto, apesar do desenvolvimento de novas técnicas e fármacos para analgesia pós-operatória, entre 50 e 70% dos pacientes ainda sentem dor moderada ou intensa ao longo do período pós-operatório (6)(7). Em parte, isso é explicado pelo incompleto conhecimento dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da dor pós-operatória. Ao longo dos anos, foram desenvolvidos modelos experimentais de dor pós-operatória, na tentativa de torná-los próximos da dor pós-operatória clínica, de maneira a aumentar o conhecimento sobre os mecanismos neurofisiológicos e farmacológicos da dor. Existem modelos de dor pós-toracotomia (8), dor visceral (9) e de dor somática incisional (10,11).

A dor pós-operatória experimental apresenta componente de dor espontânea e de dor após estimulação, de maneira semelhante ao que se observa na prática clínica, onde os pacientes operados apresentam dor espontânea durante o repouso, geralmente de curta duração, de intensidade moderada e de boa resposta com uso de opioides ou anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e dor relacionada ao movimento, geralmente tosse, mobilização ou deambulação, dor, normalmente, mais intensa, prolongada e de mais difícil tratamento (12).

A incisão cirúrgica leva à sensibilização de nociceptores, principalmente a estímulos térmicos e mecânicos. Os nociceptores estão, normalmente, presentes em fibras A-delta e C, fibras ligadas à transdução e condução do estímulo doloroso até o sistema nervoso central. Paralelamente à

sensibilização, ocorre a conversão de nociceptores mecanoinsensíveis, localizados em fibras A-delta, em nociceptores mecanossensíveis (10). Não se pode classificar a dor pós-operatória, simplesmente, como sendo inflamatória, como tem sido classificada ao longo do tempo (13). É aceitável se considerar que a sensibilização que ocorre nos aferentes primários promova uma disfunção transitória na função neuronal, considerada como lesão neuropática, e possivelmente um componente neuropático na dor pós-operatória. Respostas semelhantes à inflamação são induzidas pela lesão tecidual e são, provavelmente, diferentes da inflamação imunomediada ou por substâncias irritativas (como formalina e capsaicina) (10,14). A hiperalgesia secundária, definida como um aumento da nocicepção a estímulos mecânicos, que ocorre na área adjacente à incisão, está presente após a incisão cirúrgica e é secundária à sensibilização central no corno dorsal da medula.

A dor pós-operatória envolve diferentes tipos de receptores nociceptivos (mecânico, químico, térmico) e os papéis dos principais transdutores da nocicepção na gênese e manutenção da dor pós-operatória ainda não são adequadamente conhecidos.

A dor é iniciada quando estímulo nociceptivo térmico, mecânico ou químico ativa as terminações nervosas de aferentes primários especializados conhecidos como nociceptores, a maior parte consistindo de fibras C, estas de pequeno diâmetro, não mielinizadas e fibras de médio diâmetro, finamente mielinizadas, fibras A-delta (15–17). Essas fibras transmitem o estímulo nociceptivo para o sistema nervoso central, onde ocorre a percepção, interpretação, expressão da dor e dos comportamentos dolorosos. Sabe-se que diversos tipos de receptores ionotrópicos e metabotrópicos estão envolvidos nesse processo (18,19). A função principal dos nociceptores ocorre na fase inicial, na transdução do estímulo nociceptivo em sinal neuronal que desencadeará o potencial de ação, transmitindo pelo aferente primário a informação nociceptiva.

A transdução é feita, principalmente, através de canais catiônicos que incluem a família dos canais TRP (*Transient Receptor Potential*), canais ASIC

(*Acid Sensing Ionic Channel*) e P2X. A abertura dos canais ou ativação de receptores leva à entrada de cátions gerando a despolarização necessária para ativação dos canais de sódio voltagem-dependente e, portanto, do potencial de ação(20).

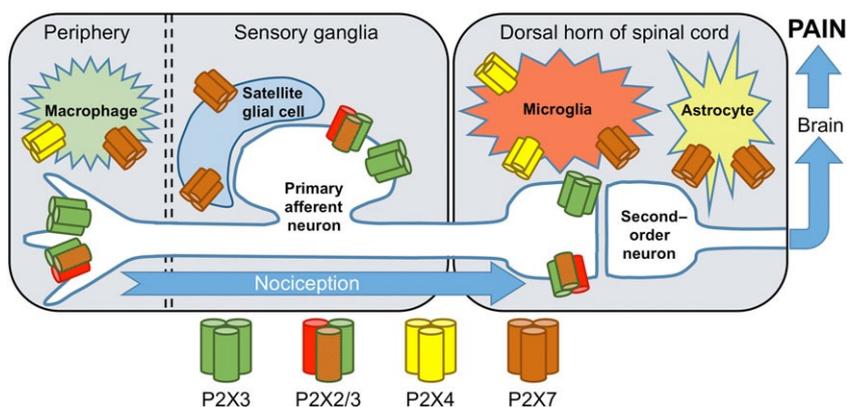


Figura 1- Figura esquemática da distribuição dos receptores P2X durante transmissão nociceptiva. Fonte: Bernier LP, Ase AR, Séguéla P. P2X receptor channels in chronic pain pathways. *Br J Pharmacol.* 2018;175(12):2219–30.

Receptores P2X fazem parte de uma família de ligantes iônicos (P2X1-7). Até o momento foram descritos sete subtipos de receptores, todos ativados por ATP, que promovem diferentes efeitos fisiológicos. Os receptores purinérgicos foram descritos inicialmente por Geoff Burnstock em 1978 e depois foram subdivididos em P2X e P2Y, em 1985, por Burnstock e Kennedy após aplicarem critérios farmacológicos através dos dados gerados em estudos experimentais com músculo liso (21). ATP é uma molécula reconhecida como central no processo do metabolismo celular, mas também participa como agonista dos receptores purinérgicos, quando liberado no meio extracelular durante processos fisiológicos e processos de lesão ou estresse celular (22). Em tecidos saudáveis a concentração homeostática extracelular de ATP encontra-se baixa, pela ação das enzimas nucleotidases solúveis e às ligadas à membrana que degradam o ATP (23,24).

Os receptores P2X podem ser do tipo homotrímeros ou heterotrímeros, são canais iônicos não seletivos permeáveis ao Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> ou K<sup>+</sup>. Entre os receptores purinérgicos ainda existem os receptores P1 (ativado por adenosina) e P2Y (ativado por ATP), ambos metabotrópicos, que também participam da homeostase celular e participam da alça regulatória durante a ação do P2X (21–40). A afinidade do ATP aos subtipos de receptores P2X é variável. P2X3 tem afinidade maior ao ATP que o P2X7, no entanto, todos os subtipos são antagonizados pelo PPADS (antagonista inespecífico) (40). Esses receptores participam de diversas atividades fisiológicas como: funções vesicais, respiração, transmissão neuromuscular, gustação, formação e reabsorção ósseas, regulação da pressão arterial, fertilidade masculina. Também estão envolvidos na fisiopatologia de diversos outros processos patológicos como dor crônica, dor inflamatória e dor neuropática. (25,26)

A expressão dos receptores P2X está aumentada após lesão nervosa (22,27,28), na lesão da medula espinhal (28,29) e em respostas inflamatórias (23,24,29).

Os receptores P2X2 estão presentes no sistema nervoso central e periférico e em outras células não neuronais. No sistema nervoso, estão relacionados à transmissão sensitiva e modulação da função sináptica. No SNC, P2X2 é expresso no córtex, cerebelo, hipotálamo, corno dorsal da medula, entre outras regiões (30,31). É expresso no gânglio da raiz dorsal e em neurônios de pequeno a médio diâmetro (32).

O canal P2X3 tem sido reconhecido como tendo papel importante na mediação dos efeitos do ATP nos aferentes primários, principalmente em fibras C (33). Está envolvido em diferentes tipos de dor, inflamatória (formalina, carragenina), neuropática (constricção de nervo ciático), dor visceral e dor por metástase óssea (34–37).

O receptor P2X3 possui ação sinérgica local com outros canais iônicos em nociceptores que contribuem no desenvolvimento da hiperalgesia (38) e

alodinia (39). Seus receptores pré-sinápticos presentes no corno dorsal da medula mediam a liberação de glutamato.(40)

O receptor P2X4 é expresso em vários tipos de células, entre elas neurônios e células da glia do SNC (41), e está associado ao desenvolvimento de dor neuropática (42) e à dor inflamatória (43–45). Também têm sido identificados no endotélio vascular, células linfóides, eosinófilos e mastócitos, com envolvimento na degranulação mastocitária (28). Nos últimos anos tem se dado atenção ao receptor na gênese e percepção da dor crônica (23,28,46).

Cada vez mais se mostra a participação da micróglia na fisiopatologia da dor, principalmente na dor neuropática. O aumento da expressão do P2X4 no corno dorsal da medula tem papel importante no mecanismo de alodinia em modelos de lesão de nervo periférico (47). Os receptores P2X4 encontram-se, preferencialmente, nos lisossomos das células, em sua forma inativa (pH baixo). Ativam-se diante da alta concentração de ATP, quando pH está acima de 7,4. (44)

Os antagonistas inespecíficos do P2X4, como o PPADS e o Azul reativo, muitas vezes têm seletividade para alguns subtipos de P2X, visto em experimento com células expressando P2x4 em ratos (32).

A neuroinflamação ocorre, de maneira ampla, por uma resposta inflamatória proveniente do SNC (48). Muitas vezes, associado a danos neuronais, degradação do tecido neuronal e aparecimento de distúrbios neurodegenerativos, aspectos positivos da resposta neuroinflamatória também foram identificados, como remodelação de macrófagos induzida por lesão e promoção do reparo axonal (49) Essa resposta é mediada principalmente pela ativação da micróglia e dos astrócitos, que liberam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mensageiros secundários, enquanto o endotélio e as células imunes periféricas em circulação desempenham um papel importante na regulação entre os mediadores das células imunes e o sistema nervoso central.

Os receptores P2X4 podem desempenhar papéis importantes na perpetuação da dor crônica neuropática após lesão do nervo periférico (50,51),

lesão cerebral pós-trauma (52) e modelos de dor óssea induzida pelo câncer (53).

O receptor P2X7 é expresso em células de linhagem hematopoiética e no SNC, não tendo sido descrito no aferente primário. Age na modulação da dor neuropática (54) e inflamatória (55,56). A ativação de P2X7 ativa cascata inflamatória, via recrutamento de inflamassomas e liberação de IL- 1 Beta (57). O papel dos receptores P2X7 na fisiopatologia da dor, independente das células imunes é ainda algo não esclarecido e digno de observação. Na dor pós-operatória, que envolve diferentes tipos de estimulação nociceptiva (mecânica, química ou térmica), os papéis dos receptores purinérgicos presentes nas vias nociceptivas na gênese como na manutenção da dor pós-operatória ainda são pouco conhecidos.

## 2. OBJETIVOS

- Estudar a expressão gênica de mRNAs dos receptores purinérgicos P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7 em pele e músculo em modelo de incisão plantar em rato.
- Estudar a expressão gênica de mRNAs e sua tradução dos receptores purinérgicos P2X3, P2X4 e P2X7 nos gânglios da raízes dorsais de L3,L4 e L5 em modelo de incisão plantar em rato.
- Avaliar comportamento doloroso à nocicepção mecânica, térmica e comportamento de guarda da pata após uso de antagonista de receptores purinérgicos.
- Estudar curva de concentração de ATP na incisão plantar.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética Para uso de Animais em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número 064/16, em 2016.

#### **Animais**

O trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, nos Laboratórios de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM 08 e LIM 29. Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*. Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes da International Association for the Study of Pain (IASP) (Zimmermann, 1983).

#### **Modelo de dor incisional**

Após indução e manutenção de anestesia geral com isoflurano a 2%, os animais foram colocados em decúbito ventral e, após antissepsia local com iodo povidine, foi realizada incisão de 1,0 cm de extensão na região plantar da pata traseira direita dos mesmos (58) visando pele e subcutâneo, com início 0,5 cm a partir do calcanhar. A seguir, fáscia e músculo plantar foram elevados e incisados longitudinalmente, sem lesão da inserção do músculo. A incisão cirúrgica foi fechada com dois pontos separados com fio de *mononylon* (5-0) e sobre a incisão foi colocado antibiótico tópico. Esta técnica induz hiperalgesia duradoura na área cirúrgica e a cerca de 1cm da incisão.

Após o despertar da anestesia, os ratos foram acondicionados em caixas, posteriormente foram submetidos aos testes de hipersensibilidade térmica, mecânica e teste comportamental que são descritos a seguir.

### **3.1 Testes comportamentais**

#### **3.1.1. *Guarding pain* (guarda da pata)**

O escore cumulativo de dor foi utilizado para avaliação de dor espontânea conforme descrito anteriormente (58). Os ratos foram colocados sobre uma tela plástica elevada, com aberturas de 8x8 mm<sup>2</sup> e recobertos com caixa plástica transparente. As patas traseiras com e sem incisão foram observadas pelo período de 1 minuto, e esse processo foi repetido a cada 5 minutos, durante 1 hora. Dependendo da posição da pata sobre os orifícios da tela eram atribuídas notas 0, 1 ou 2. Quando o peso do animal era sustentado sobre a pata e se observavam áreas esbranquiçadas ao redor da área de contato da pata com orifício da tela, atribuíam-se nota zero. Quando a pata encontrava-se totalmente sem contato com a tela, atribuíam-se nota dois. Se a área da incisão tocava de forma leve, sem áreas esbranquiçadas, a nota era um. Somando-se as doze avaliações (0 - 24) para ambas as patas, a diferença entre os escores da pata incisada e não incisada era o escore cumulativo de dor para esse período.

#### **3.1.2. Hiperalgisia térmica**

O tempo de latência para a retirada da pata à emissão de calor (hiperalgesia térmica) foi obtido após a aplicação de fonte de calor radiante na região posterior da pata direita (local da incisão) através de vidro temperado de espessura de 3 mm, modelo de Hargreaves (60). O estímulo térmico foi através de luz de uma lâmpada de 50 W com diâmetro de abertura de 6 mm. O tempo de latência máximo para provocar a resposta de retirada da pata foi de 30 segundos para evitar lesão tecidual. Três medidas com intervalos entre 5 e 10 minutos foram realizadas e a média dos três valores foi utilizada.

### **3.1.3. Hiperalgisia mecânica**

O limiar de retirada da pata foi avaliado usando o algésímetro eletrônico Randall-Selitto (IITC 2500 Digital Paw Pressure Meter, IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Antes do teste, cada animal foi colocado, durante 3 dias, no aparelho para se acostumar com a manipulação. O animal era coberto com pano macio de algodão como maneira de diminuir o estresse da medição. O teste consistiu na aplicação de uma força mecânica crescente, na qual a ponta do aparelho foi aplicada na porção plantar da pata até que houvesse a resposta de retirada. O ponto de aplicação foi marcado com tinta para manter o local em tentativas repetidas. A força máxima aplicada foi limitada a 250 g para evitar danos à pele.

## **3.2. Marcação Tecidual de Receptores e Genotipagem**

### **3.2.1. Obtenção de tecidos**

Os animais operados foram anestesiados com isoflurano 5% para a obtenção de amostras do músculo plantar, pele e gânglio de raiz dorsal. Em seguida, foram submetidos à toracotomia e secção de átrios para exsanguinação. Foi feita retirada a pele que envolvia a incisão plantar e do músculo plantar. Para retirada das amostras de gânglio de raiz dorsal, rapidamente era realizada laminectomia lombar nos níveis de L3, L4 e L5 para a retirada dos gânglios dessas mesmas raízes dorsais, ipsilaterais à incisão plantar. Todos os tecidos foram armazenados em solução de RNAlater® (Ambion, Austin, TX) para preservação do RNA total.

### 3.2.2. Obtenção do RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). DNA genômico foi digerido usando kit Turbo free DNase (Ambion, Austin, TX). RNA purificado foi obtido através do kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). O RNA foi submetido à quantificação espectrofotométrica com Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA) para avaliar o grau de contaminação, e amostras com relação A260/A280 maior que 1,8 serão utilizadas. Aleatoriamente foram selecionadas amostras para análise da integridade do RNA com Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), procurando-se picos de RNA ribossomais 18S e 28S. As amostras coletadas de todos os tecidos foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. Em seguida, as amostras foram utilizadas para extração de RNA total utilizando o kit *ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A homogeneização dos tecidos foi realizada no equipamento *Bead Ruptor 24* (Omni Inc., Georgia, EUA), com microesferas de cerâmica de 1,4 mm de diâmetro, a 5000 rpm por 30 s. Algumas amostras de RNA foram selecionadas aleatoriamente para a verificação da integridade por eletroforese capilar no equipamento. Utilizamos neste ensaio o gene GUSB (Rn00566655\_m1) como controle interno endógeno. As sequências dos *primers* e das sondas não são fornecidas pelo fabricante. Os ensaios utilizados foram P2X3 (Rn00579301\_m1), P2X4 (Rn00580949\_m1), P2X7 (Rn00570451\_m1) e GUSB (Rn00566655\_m1).

A reação de transcrição reversa foi feita a partir de 0,5 µg de RNA total usando SuperScript® First-Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi obtida a temperatura de 42 °C por 50 minutos, seguida por 15 minutos a 70 °C e inativação de RNA com RNase H por 20 minutos a 37 °C.

### 3.2.3 PCR quantitativo (*Real time PCR*)

Em amostras de pele e músculo, os *primers* de P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7 foram desenhados e sintetizados como mostrados na tabela 1 (IDT, Coralville, IA). Seu desenho garantiu que todos tivessem *melting temperatures* semelhantes e que anelassem em éxons distintos, para garantir a não contaminação genômica no momento da amplificação.

*Real Time PCR* foi realizado em volume final de 25  $\mu$ L. Os parâmetros para a PCR foram de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Cada amostra de cDNA foi amplificada em triplicata. As reações foram realizadas no aparelho ABI PCR Model 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os dados dos produtos da PCR foram analisados pelo método  $\Delta\Delta C_t$  descrito por Livak e Schmittgen, 2001(61).

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 $\mu$ g de RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do mRNA e direcionadas para a reação de transcrição reversa utilizando o kit ImProm-II (Promega). A análise de expressão gênica para P2X3, P2X4 e P2X7 no gânglio da raiz dorsal foi realizada pelo sistema de detecção *Taqman* (Applied Biosystems, Warrington, UK).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Thermo-Fisher) e as quantificações relativas da expressão dos genes avaliados foram realizadas utilizando a metodologia  $\Delta\Delta C_t$  e os resultados apresentados em unidades arbitrárias.

### 3.2.4 Gene controle

Em trabalhos prévios, foram usados os genes de beta-glucuronidase (GUSB), TATA box protein (TBP), GAPDH e RPL1 em tecidos submetidos ou não à incisão como genes controle para estudo da expressão de transdutores nociceptivos, incluindo os P2X em pele e músculo. O gene que apresentou a menor variação entre os diferentes tecidos estudados e menor variação entre

tecidos com e sem incisão foi o TBP. Por isso, este foi utilizado como gene de expressão constitutiva (*housekeeping gene*) no presente estudo, juntamente com o gene GUSB, que também apresentou variação limitada.

Gene	Número de acesso no Genbank	"Primer forward"	"Primer reverse"
P2X1	NM_012997	AAG-ATC-CCA-AGC-CCT-GCT-CTT-CTT	GAA-GCG-TGG-AAA-GCT-GAT-GCT-GTT
P2X2	NM_053656	TGG-ACA-GGC-AGG-GAA-ATT-CAG-TCT	TGG-AGT-ACG-CAC-CTT-GTC-GAA-CTT
P2X3	X91167	GGA-ACG-CTG-GCA-AGT-TCA-ACA-TCA	TGA-TGT-CAC-AGA-GAA-CAG-TGC-CCA
P2X4	NM_031594	ACA-AGA-ATC-CTC-CTG-CTT-CTG-CCT	ATA-GGG-TGG-AAG-AAC-GTC-TTG-CGT
P2X5	X97328	TTC-AAC-CGC-CTG-GAC-AAC-AAA-CAC	AGG-GTC-ACG-GTA-ATA-CCT-GGC-AAA
P2X6	X97376	GAC-TGG-AGA-GGG-GGT-TGG-GGT-AAT	AGG-CAG-GTG-CTT-CAG-AAT-AGG-TTG
P2X7	NM_019256	ACA-CAG-TCT-GAC-GCC-TCA-TTG-CTA	ACC-TGC-AAT-TCC-AGT-TCC-AGG-AGA
TBP	Nm_001004198	CGA-TAA-CCC-AGA-AAG-TCG-AA	AGA-TGG-GAA-TTC-CAG-GAG-TC
GUSB	NM_010368	GTG-GGG-ATA-ATG-ACT-TGC-AG	GGA-ACC-CCT-GGT-AGA-ACA-GT

Tabela 1. Sequências de pares de *primers* para amplificação das sequências dos genes da família P2X e dos genes de expressão constitutiva (TBP e GUSB).

### 3.2.5 Protocolo experimental

Estudamos a expressão dos receptores P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7 na pele, músculo plantar da pata submetida a incisão plantar nos seguintes momentos:

- Antes da incisão (SHAM)
- 12 horas após a incisão,
- primeiro dia de pós-incisão (POD1),
- segundo dia de pós-incisão (POD2),
- quinto dia de pós-incisão (POD5),
- décimo dia de pós-incisão (POD10).

Em cada momento foram estudados seis animais por grupo.

No estudo da expressão em gânglios, avaliou-se a expressão do P2X4, em virtude do aumento periférico observado nos estudos em pele e músculo, de P2X3 e P2X7.

### 3.2.6 Western Blotting

As amostras de tecido foram coletadas e armazenadas como descrito para os experimentos de RT-PCR em tempo real. As amostras para a realização da expressão proteica foram homogeneizadas em tampão de homogeneização T-PER (Thermo Fisher Scientific) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Thermo Fisher Scientific). A homogeneização foi realizada com o equipamento *Bead Ruptor 24* (Omni Inc.), com microesferas de cerâmica de 1,4 mm de diâmetro, a 5000 rpm (movimentos por minuto) por 45 s. O homogenato foi centrifugado a 13.400 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a determinação da concentração de proteínas utilizando o reagente Pierce 660 nm (Thermo Fisher Scientific). Quantidades equitativas de proteína foram aplicadas a gel com gradiente poliacrilamida 4-20% em SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e transferidos para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad). O bloqueio foi realizado com BSA 3%. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C

com os anticorpos primários anti-P2X3 (Thermo Fisher Scientific, PA5-77682), anti-P2X4 (Thermo Fisher Scientific, PA5-77663) anti-AMPK fosforilada (Cell signaling, Danvers, EUA, 4188), anti-PKC $\alpha$  fosforilada (Santa Cruz, Dallas, EUA, sc-12356), seguidas da incubação com anticorpo secundário conjugado a HRP por 1 h. A revelação foi realizada com *Clarity Western ECL* (Bio-Rad). O sinal quimioluminescente, por sua vez, foi detectado pelo sistema digital de aquisição de imagens ALLIANCE 4.7 (UVITEC) e quantificado por análise densitométrica com o *software* Image J. O sinal quimioluminescente de cada proteína alvo foi normalizado pela coloração de proteínas Ponceau e os resultados expressos em unidades arbitrárias.

Foram estudadas a tradução de P2X3 e P2X4, genes com maior variação em estudos prévios de expressão gênica, nos seguintes momentos:

- Antes da incisão,
- primeiro dia de pós-incisão (POD1 ou 24h),
- segundo dia de pós-incisão (POD2 ou 48h),
- décimo dia de pós-incisão (POD10).

Em cada momento foram estudados oito animais.

### **3.3 Microdiálise**

No dia anterior à realização do experimento, foram preparados os filamentos de microdiálise (200  $\mu$ m diâmetro, permeável à moléculas de até 45.000 Da; Hospal AN69). Todo o filamento era impermeabilizado com cola tipo Epoxy à exceção da região central, de comprimento de 9mm. Uma das pontas do filamento era ligada a um tubo PE 20 de 14 cm de extensão, que em sua outra extremidade era conectado a uma agulha 25G e essa à seringa por onde se administravam as soluções. Para caracterizar o coeficiente de permeabilidade do filamento ao ATP, os filamentos eram inseridos, através de pequenos orifícios laterais, em cubetas de espectrofotometria, e os orifícios selados com epoxy. A cubeta era preenchida com solução de tampão fosfato

salino (PBS), pH= 7,4. O filamento era perfundido com a mesma solução de PBS (perfusato) por 15 minutos e na extremidade livre do filamento era coletado o dialisado por 15 minutos, posteriormente o conteúdo da cubeta era esvaziado e trocado por solução de ATP 0,1  $\mu$ M, assim sucessivamente com soluções de ATP 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M. Os dialisados coletados eram colocados a -80 °C para posterior medição do ATP nas amostras. A velocidade de perfusão era de 2,5  $\mu$ L/min. Após a medição do conteúdo de ATP nos dialisados, era calculado o coeficiente de permeabilidade do filamento de microdialise. Também era calculado o tempo para ocorrência de equilíbrio entre o meio e o interior do filamento, onde após a colocação de ATP 1  $\mu$ M na cubeta, dialisados eram coletados a cada 3 minutos por período de 42 minutos e depois medido o conteúdo de ATP nos dialisados.

Para a determinação da concentração tecidual de ATP foi utilizado o método no net flux (Lonroth et al, 1987)(62). Infelizmente, os primeiros resultados mostraram que o ATP tecidual rapidamente diminuía e optamos em quantificar o ATP nos dialisados em diferentes tempos após a incisão – 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 e 120 minutos. A dosagem de ATP foi feita usando-se kit Enliten ATP Essay System (Promega, Madison, WI, USA).

### **3.3.1 Preparo dos animais**

O animal era anestesiado com isoflurano 2 – 3%, na artéria carótida comum direita era introduzido cateter para monitorização de pressão arterial e obtenção de amostras de sangue para gasometria arterial. A traqueia era isolada e o animal submetido à traqueotomia para ventilação mecânica com O<sub>2</sub> 100%. A temperatura retal era medida com sonda retal e a temperatura mantida entre 36 e 38°C através de manta térmica. A seguir era feita incisão da pele na região posterior da coxa direita (lado incisão), agulha 23G era introduzida no músculo gastrocnêmio, e, então, inserida membrana semipermeável no interior da agulha, que era retirada permanecendo a porção permeável do filamento no ventre do músculo. Idêntico procedimento era realizado no lado contralateral. O local era perfundido com PBS a um fluxo de 2,5  $\mu$ L/min por um período de 40 minutos. Nesse instante, o músculo

gastrocnêmio direito era incisado estando o filamento presente no local da incisão. A perfusão com PBS era, novamente, iniciada e os volumes de dialisados eram coletados nos tempos: – 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 e 120 minutos, para posterior mensuração do ATP.

### **3.4 Estudo comportamental**

Dois grupos (controle e PPADS) de seis animais foram utilizados. Antes da incisão plantar sob anestesia geral, cada grupo recebia 50 $\mu$ L de SF0,9% ou de 50 $\mu$ L de PPADS (antagonista inespecífico de receptores purinérgicos) na região onde seria realizada a incisão plantar. Os testes de limiar de retirada da pata por calor, de guarda da pata e de retirada da pata após estímulo mecânico (teste de Randall Selitto) foram realizados antes da incisão, uma hora, quatro horas depois da incisão; como também no 1º PO, antes da administração das soluções e depois da administração das soluções. A pessoa que administrou a solução não foi a que realizou as avaliações comportamentais. (63)

### **3.5 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Após obtenção dos dados de cada grupo, os resultados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se do teste de ANOVA two-way ou ANOVA one-way com pós-teste ou pelo teste Kruskal-Wallis para expressão proteica, fixando-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese nula ( $p < 0,05$ ), marcadas por asterisco. Todas as análises foram realizadas pelo software Graphpad Prism 9.4. (Graphpad Software Inc. CA,USA)

## 4. RESULTADOS

Nos estudos comportamentais de hiperalgesia térmica ou mecânica não houve diferença entre os grupos PPADS e controle. No entanto, durante o comportamento de guarda da pata, o grupo PPADS mostrou menor escore de dor nas 4h e no POD1 pós-administração de PPADS (figura 2 e 3).

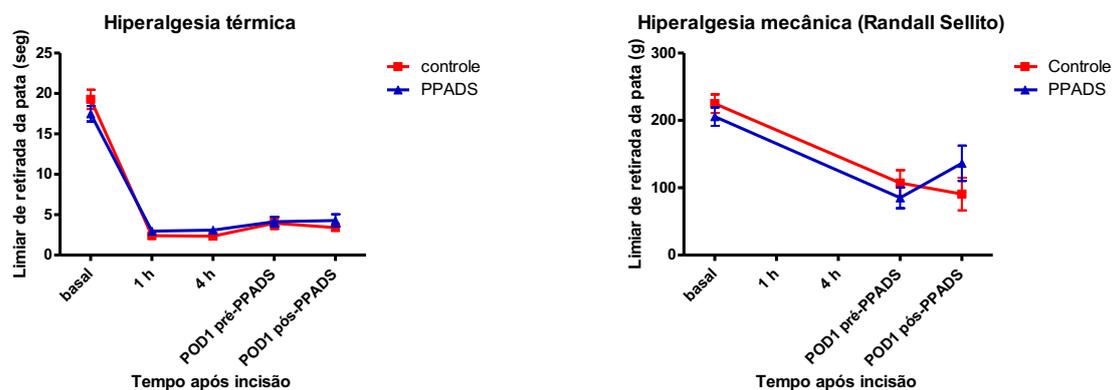


Figura 2. Limiar de retirada da pata após estímulo térmico e mecânico no modelo de incisão plantar em animais com e sem PPADS intraplantar.

\*  $P < 0.05$   
 \*\*  $P < 0.001$   
 2way ANOVA

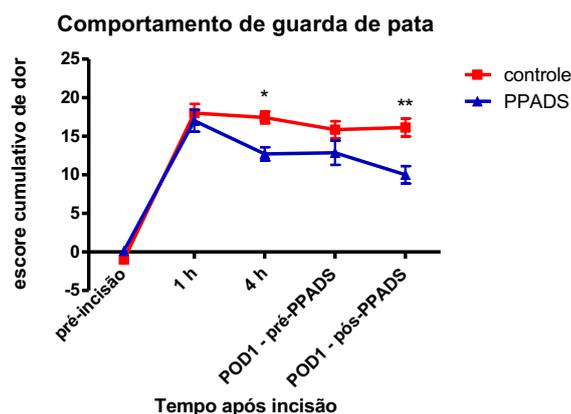


Figura 3. Comportamento de guarda da pata no modelo de incisão plantar em animais com e sem PPADS intraplantar.

Na pele, houve aumento da expressão de P2X4 após 12 e 48 horas, voltando a valores basais no quinto dia pós-incisão. P2X3 apresentou diminuição, que foi significativa, em sua expressão nos POD1 e POD5, assim como P2X7 que teve diminuição significativa nos POD1, POD5 e mantinha-se com expressão diminuída no 10º dia pós-incisão. Os outros receptores purinérgicos não tiveram alterações significativas em suas expressões (figura 4).

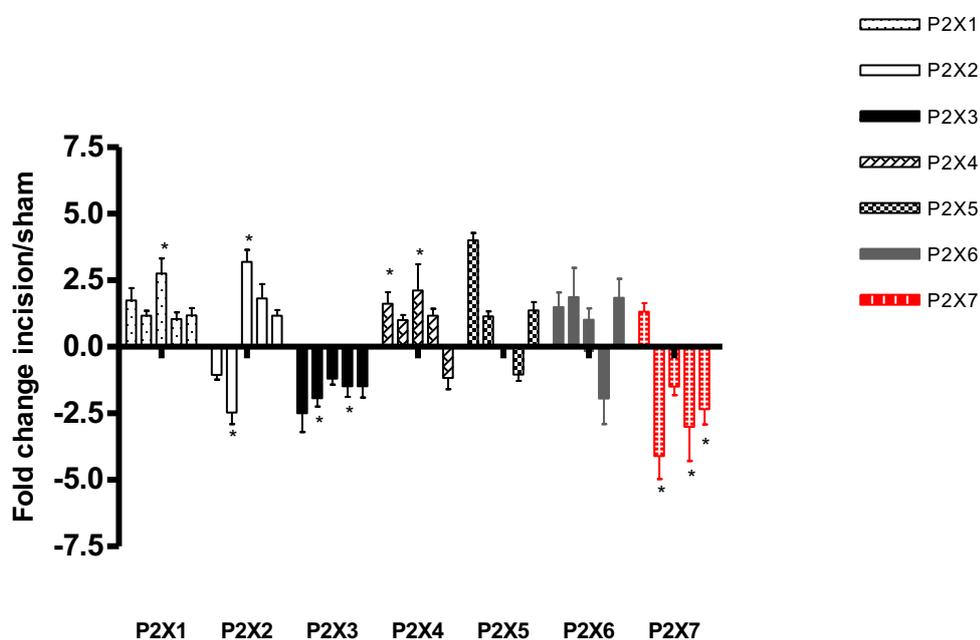


Figura 4. Expressão dos mRNAs de P2X1-7 na pele após incisão plantar em ratos. Foram estudados os tempos 12 horas, POD1, POD2, POD5 e POD10.

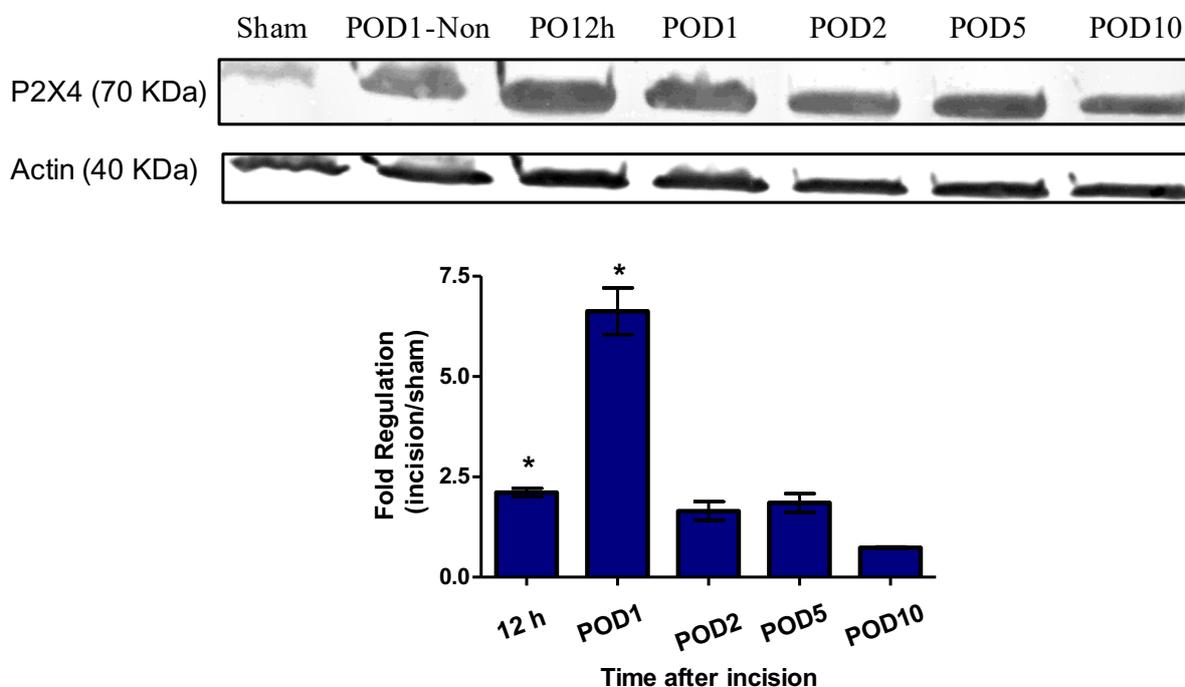


Figura 5. Expressão Proteica de P2X4 em pele.

Em músculo houve aumento da expressão do mRNA de P2X4 nos tempos 12hs, POD1, POD2, POD5 e POD10. Houve aumento inicial após 12hs, com posterior queda, ainda que a expressão fosse cinco vezes maior que no grupo sham, aumento no POD2 e posteriores quedas no POD5 e POD10. No POD10, apesar de haver tendência ao retorno aos valores basais, a expressão ainda era maior que no grupo sham. O P2X6 apresentou grande diminuição em sua expressão em todos os momentos, sendo menor no primeiro dia e com tendência a retorno aos valores basais até o POD10. O P2X2 apresentou grande diminuição em sua expressão após 12hs e no POD1,

com posterior aumento, que se tornou significativo no POD5. O P2X3 apresentou aumento significativo no segundo e quinto dias pós-incisão, com retorno a valores basais. O P2X5 apresentou diminuição em sua expressão, mas sem significância estatística, até o POD5 quando teve aumento significativo em sua expressão, e no POD10 o valor era próximo dos valores basais. P2X1 e P2X7 não apresentaram modificações significativas em suas expressões (figura 6).

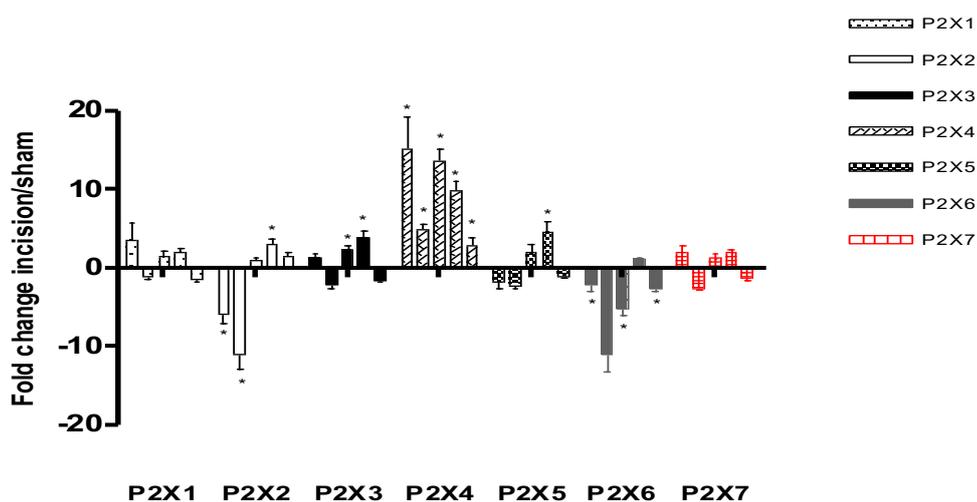


Figura 6. Expressão dos mRNAs de P2X1-7 em músculo após incisão plantar em ratos. Foram estudados os tempos 12 horas, POD1, POD2, POD5 e POD10.

A observação do aumento importante da expressão do mRNA de P2X4 nos fez optar em estudar a expressão proteica de P2X4. Os resultados mostraram uma expressão aumentada, em torno de duas vezes, durante todo o período até o décimo dia, em músculo (figura 7). Já na pele, a expressão foi significativa após 12hs e POD1, voltado ao normal após esse período. A expressão no POD1 ficou, em torno de sete vezes maior que no grupo não incisão (figura 5).

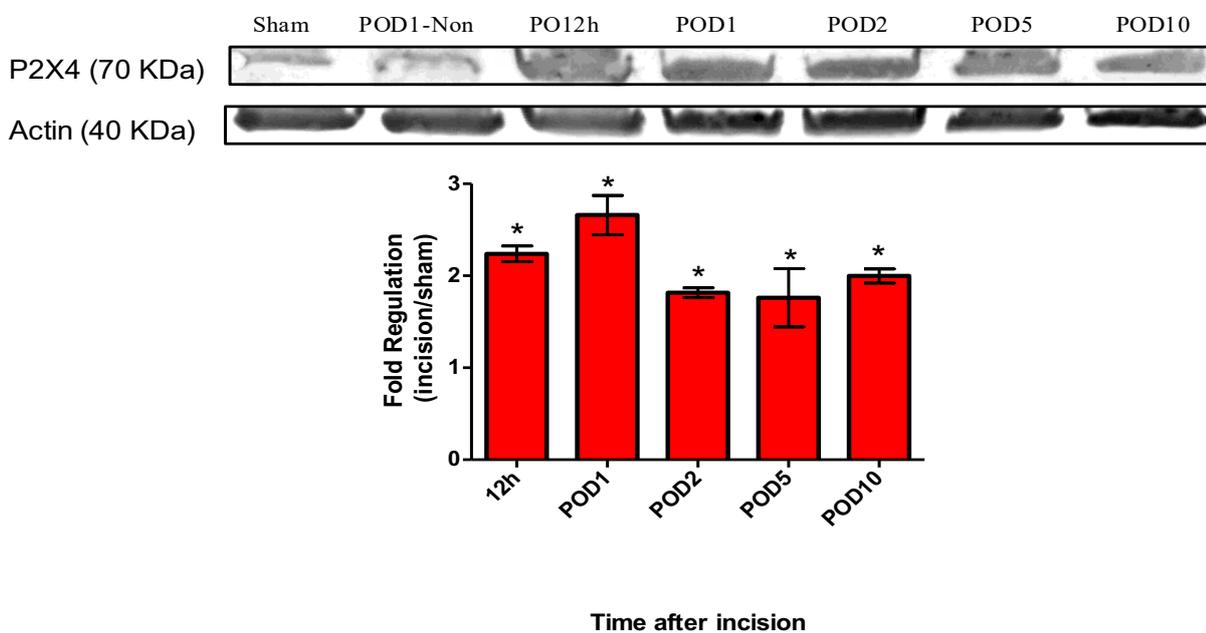


Figura 7. Expressão Proteica de P2X4 em músculo.

Houve diminuição importante da expressão de mRNA de P2X3 no gânglio da raiz dorsal entre 24 h e 5° dia e entre 24h e 10° dia. As expressões dos mRNA de P2X4 e P2X7 não se alteraram durante o período avaliado. (figura 8)

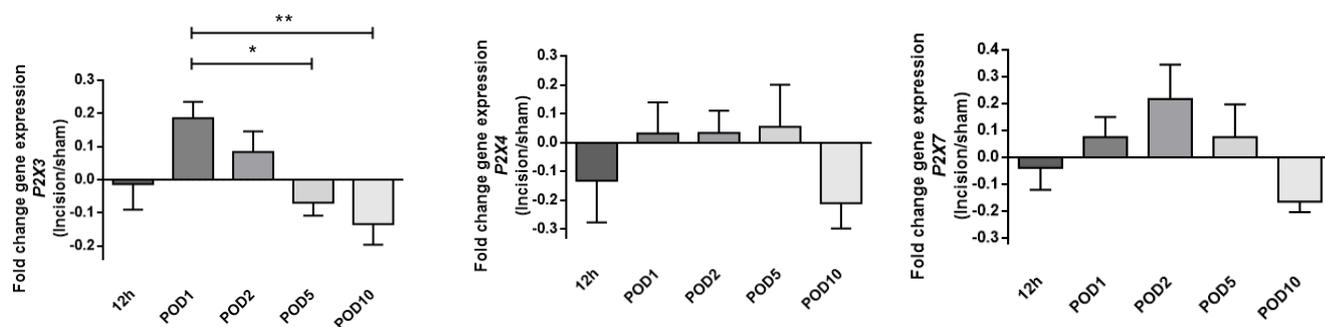


Figura 8. Análises comparativas da expressão gênica de A) P2X3 (n = 8 para todos os tempos), B) P2X4 (n = 8 para todos os tempos) e C) P2X7 (n = 8 para todos os tempos) no gânglio da raiz dorsal. Os dados paramétricos foram comparados pelo teste ANOVA one-way e pós teste de Newman-Keuls, com os resultados apresentados como média e erro padrão. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01.

A expressão proteica de P2X4 no gânglio da raiz dorsal aumentou nas 48h comparado ao controle. A expressão proteica de P2X3 no gânglio da raiz dorsal não se modificou de forma relevante no período avaliado (figura 9 e 10).

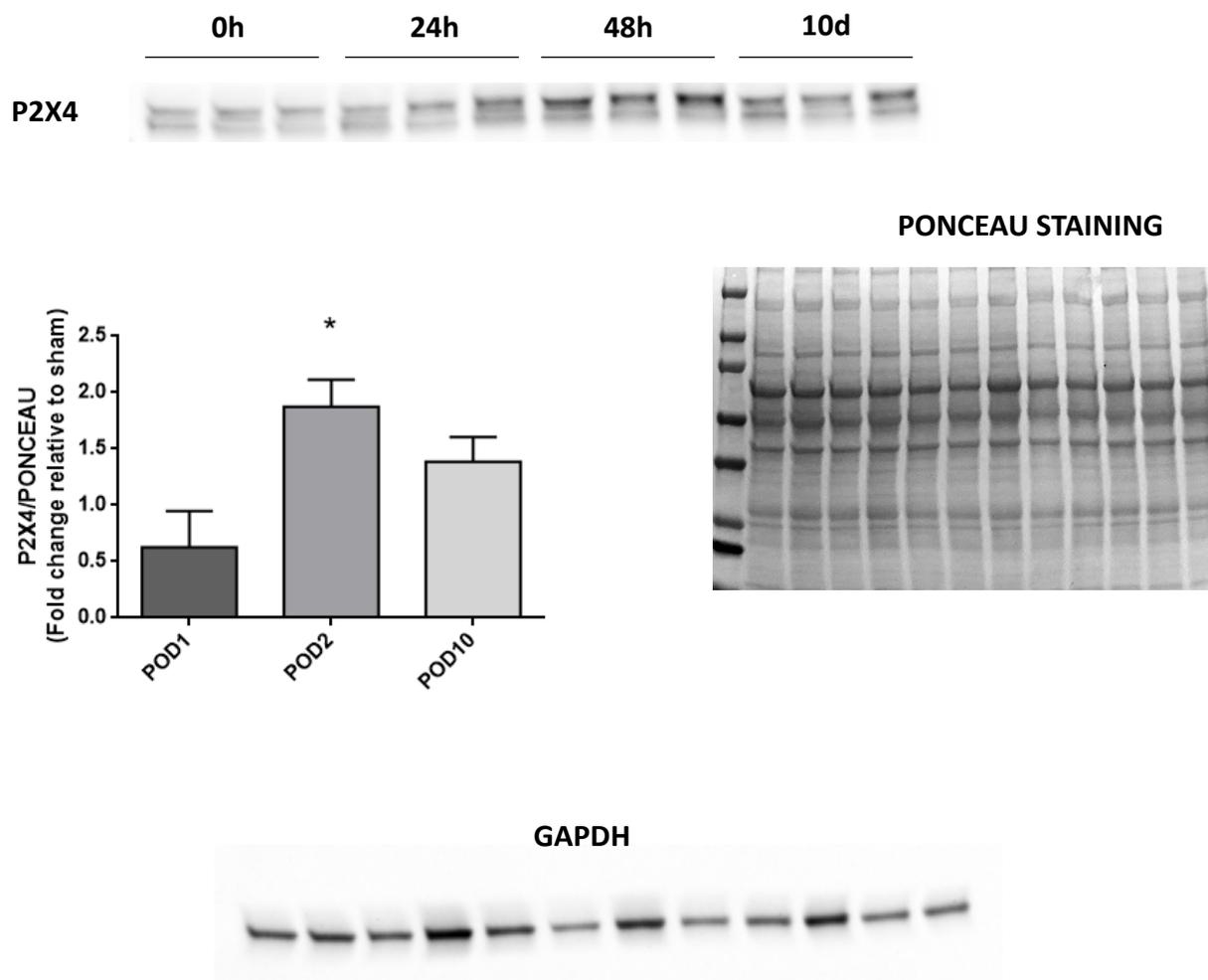


Figura 9. Análises comparativas da expressão proteica de P2X4 (n = 3 para todos os tempos). Os dados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's, com os resultados apresentados como média e erro padrão. \* P <0,05.

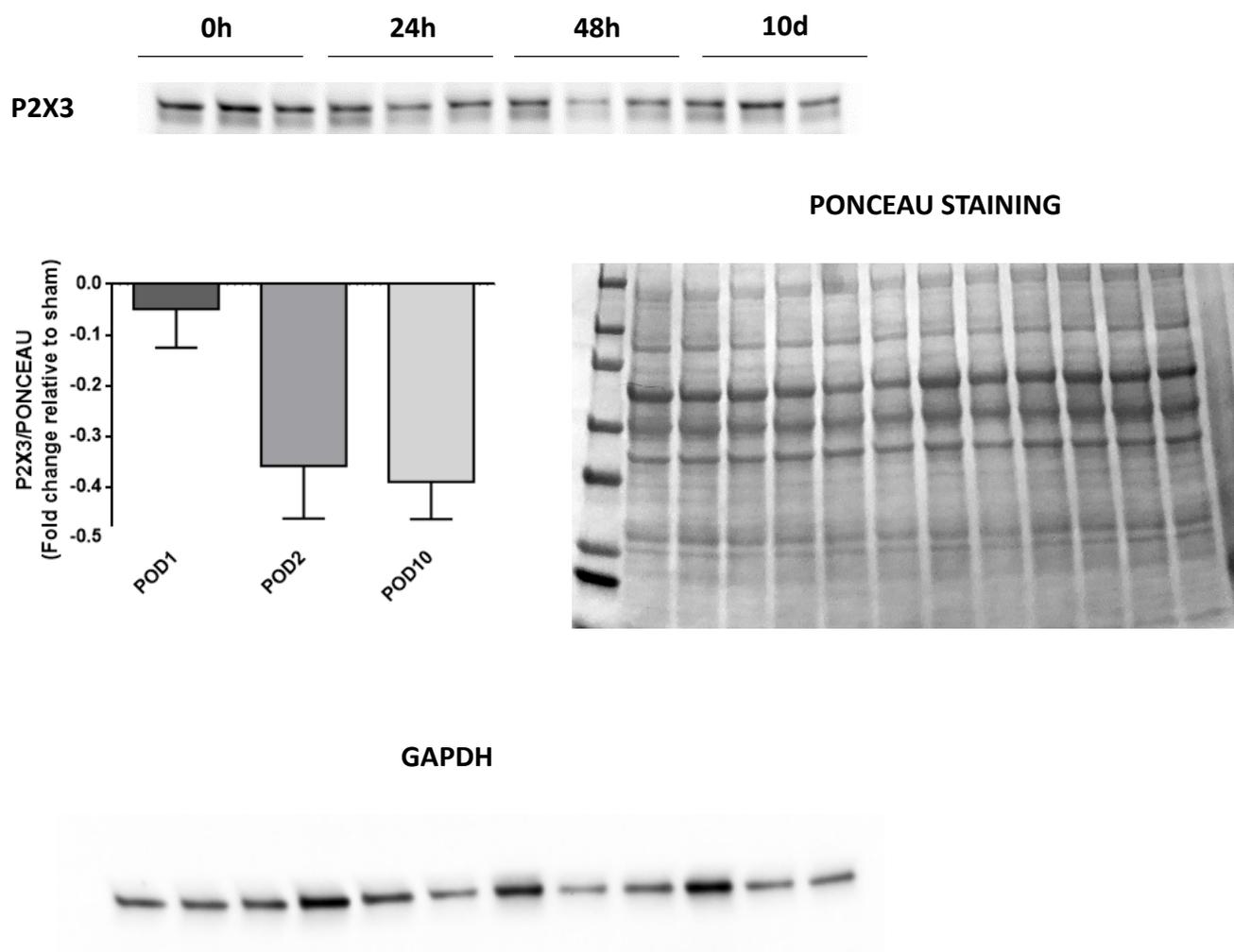


Figura 10. Análises comparativas da expressão proteica de P2X3 no gânglio da raiz dorsal ( $n = 3$  para todos os tempos). Os dados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis.

Nos experimentos com microdiálise observou-se que a concentração de ATP, *in vitro*, se estabilizou após dez minutos de equilíbrio, não variando significativamente após 40 minutos de tempo de equilíbrio entre as soluções fora e dentro do filamento (figura 11). As permeabilidades observadas para os filamentos, quando testados *in vitro*, para diferentes concentrações de ATP foram: - [ATP] na cubeta de 0,5 $\mu$ M, a permeabilidade era de  $14,2 \pm 6\%$ , - [ATP] de 5 $\mu$ M, permeabilidade de  $15,5 \pm 2,95\%$ , - [ATP] de 10 $\mu$ M, permeabilidade de  $22,5 \pm 1,8\%$  (figura 12).

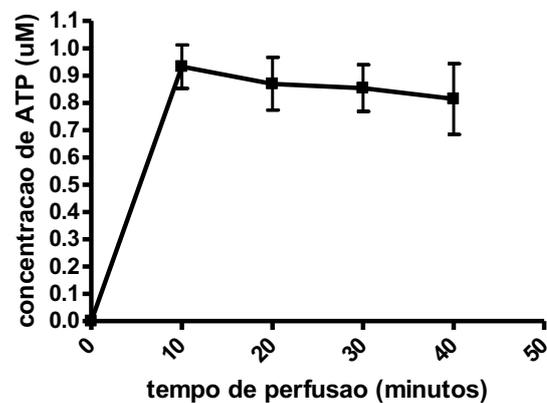


Figura 11. Estabilização de ATP. A concentração de ATP nos dialisados permaneceu estável após 10 minutos de equilíbrio das soluções.

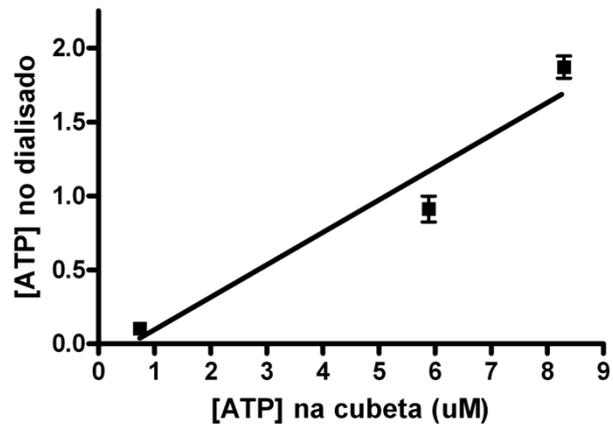
Coeficiente de Permeabilidade *in vitro*

Figura 12. Coeficiente de permeabilidade *in vitro* do filamento de microdialise. O coeficiente de permeabilidade do filamento foi testado em três diferentes concentrações em cinco filamentos diferentes, e a equação para obtenção dos valores de permeabilidade foi  $y = 0,2191x - 0,1223$ ,  $r^2 = 0,922$ .

As concentrações de ATP nos dialisados obtidos *in vivo* após incisão no músculo gastrocnêmio foram bastante aumentadas imediatamente após a incisão (5 minutos), decrescendo rapidamente, voltando a valores semelhantes aos encontrados no lado controle sem incisão em torno de 30 a 40 minutos após a incisão, não variando até o período de 2 horas após a incisão (figura 13).

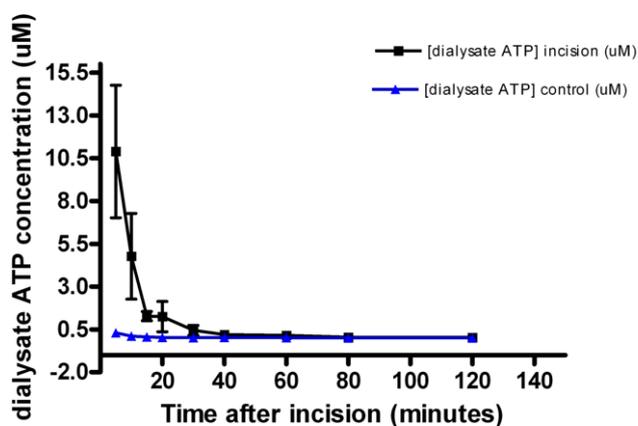


Figura 13. Concentração de ATP no dialisado *in vivo* após incisão e no controle sem incisão. A concentração de ATP após incisão é bastante aumentada, inicialmente, tendo um rápido declínio voltando aos valores semelhantes ao controle sem incisão entre 30 e 40 minutos após a incisão.

## 5. DISCUSSÃO

Os receptores purinérgicos têm participação em diversos processos patológicos como a inflamação, dor, regulação imunológica e apoptose. A ação nociceptiva do ATP por administração periférica ou intratecal estimula a nocicepção e aumento da sensibilidade ao estímulo doloroso. Seus efeitos nociceptivos são amplificados com a presença de mediadores inflamatórios (64).

Adotamos o modelo experimental de dor incisional por incisão plantar, que apresenta similaridade com o status cirúrgico agudo pós-operatório observado na prática clínica, assim como por ser um modelo clássico de dor pós-operatória em animais (58).

Existem diversos subtipos de receptores P2X relacionados à nocicepção, e o estudo procurou avaliar seus papéis no modelo de dor incisional, através de suas expressões gênicas e proteicas e dos comportamentos dolorosos dos animais utilizando antagonistas de receptores purinérgicos.

### Avaliação comportamental

Os estudos comportamentais realizados, de hiperalgisia mecânica, térmica e guarda da pata, mostraram diferenças entre o grupo de animais que receberam PPADS intraplantar, antagonista de receptores P2X, e o grupo que recebeu solução de NaCl 0,9%, apenas no teste da guarda da pata, não havendo diferença entre nos testes de limiar de retirada da pata após estímulo térmico ou mecânico. Trabalhos experimentais que avaliaram a hiperalgisia térmica ou mecânica em ratos, em modelos de ligadura de nervo ciático, também não demonstraram diferença com uso de PPADS no limiar nociceptivo (65,66). Um estudo com alodinia tátil, o PPADS reverteu a diminuição do limiar de dor em ratos que receberam administração intraplantar de agonistas de P2X, inferindo possível participação dos receptores P2X2 e P2X3(67).

O comportamento de guarda da pata está ligado à ocorrência de dor espontânea pós-incisional (68–70) com a atuação de nociceptores sensíveis

aos mediadores inflamatórios (70). Após a incisão, ocorre rápido aumento da atividade espontânea dos nociceptores que diminui ao longo dos dias (70)(58). Estes nociceptores são, normalmente, mecano insensíveis, tornando-se sensíveis a mediadores pró-inflamatórios. A atividade neuronal espontânea de neurônios do corno dorsal da medula também aumenta, estando correlacionada, juntamente, com o aumento da atividade neuronal dos nociceptores, com dor em repouso após cirurgia (67). O comportamento da guarda da pata pode ser inibido pela infiltração de anestésico local, administração de morfina intratecal e cetoprofeno (68). A diminuição observada nos escores cumulativos de dor do comportamento de guarda da pata nos animais que receberam PPADS parece demonstrar o papel dos receptores purinérgicos na dor espontânea pós-incisional. Entretanto, o PPADS não alterou os comportamentos relacionados à ocorrência de dor evocada, de hiperalgesia térmica e mecânica, que também estão presentes no modelo de dor incisional. Como o PPADS é antagonista não específico dos receptores P2X, não é possível inferir qual ou quais receptores estão envolvidos.

## **5.1 Expressão dos receptores purinérgicos**

### **5.1.1 Expressão do P2X3**

No aferente primário, P2X3 é preferencialmente expresso em fibras nervosas do tipo C, que transmitem o estímulo para medula espinhal. Estudos de imuno-histoquímica demonstram presença da proteína P2X3 também no sistema nervoso central e e nos corpos celulares destes neurônios presentes nos gânglios das raízes dorsais (21-23).

Entre os sete receptores purinérgicos P2X, há evidências da participação do receptor P2X3 na transdução nociceptiva no aferente primário (71). Há ainda resultados conflitantes sobre o papel do receptor P2X3 em diferentes experimentos de nocicepção. O receptor P2X3 tem sua expressão aumentada em gânglio da raiz dorsal em modelo de dor neuropática, de ligadura do nervo ciático em ratos (72,73).

No presente estudo, houve aumento inicial na expressão gênica do receptor P2X3 em gânglio da raiz dorsal, em alguns momentos no músculo plantar (POD2 e POD5), e houve diminuição na expressão deste receptor na pele. Uma limitação do nosso estudo reside no fato de termos utilizado tecido total homogeneizado para avaliar a expressão, o que dificulta saber quais células foram responsáveis pelas variações nas expressões, se neurônios, miócitos ou células inflamatórias entre outras células presentes nos tecidos estudados. Limitação que não ocorreria se o estudo fosse realizado com imuno-histoquímica para a avaliação da expressão proteica dos receptores.

Em modelo de ligadura de nervo ciático ou de gânglio trigeminal em ratos não foi evidente a mudança na expressão gênica de P2X3 em gânglio da raiz dorsal para experimentos em animais (42,74) enquanto que houve diminuição na expressão na pele e aumento da expressão no músculo plantar ao longo do período estudado, corroborando com esta tese em que também não foi evidente a mudança expressão gênica do P2X3 em gânglio da raiz dorsal para experimentos com ligadura dos nervos espinhais (42) e ligadura do gânglio trigeminal em ratos (74).

Encontramos uma diminuição da expressão gênica do P2X6 em músculo, semelhante aos achados de experimentos em ligadura de nervo espinhal (75). Em contrapartida, a expressão gênica de P2X6 aumentou em modelos de nocicepção com ratos com ligadura do ciático (73). A diferença na expressão gênica do P2X6 entre os modelos citados pode estar relacionada a dinâmica da expressão gênica diante da lesão inicial, embora pouco ainda se sabe sobre a participação do P2X6 em dor pós-incisional.

O comportamento da expressão gênica diferiu entre pele, músculo e gânglio da raiz dorsal. Enquanto houve aumento da expressão gênica e proteica do P2X4, outros receptores purinérgicos apresentaram comportamento diferente. Os subtipos P2X1, P2X2, P2X5, P2X6 e P2X7 não apresentaram variações significativas ao longo do tempo avaliado. A expressão dos receptores P2X1 e P2X5 no gânglio da raiz dorsal aumentou em modelos experimentais de dor neuropática, enquanto que receptores P2X4, P2X6 e P2X7 aumentaram em modelos de dor visceral (73). Desta maneira, os

receptores P2X1 e P2X5 podem estar envolvidos na gênese da dor neuropática, enquanto que P2X4 e P2X7, envolvidos na dor visceral (70). Como dor pós-operatória tem mecanismos próprios e ainda não esclarecidos, a comparação dos resultados com outros modelos fica prejudicada.

Houve diferenças nas expressões gênicas de um mesmo receptor nos diferentes tecidos. Houve diferença de expressão entre as amostras de tecidos para estudo da expressão gênica dos receptores purinérgicos e o tempo de extração dos tecidos. Houve aumento de expressão de P2X3 em músculo e diminuição em amostra de pele e gânglio de raiz dorsal. Provavelmente as diferenças de resultados entre amostras (pele, músculo ou gânglio e tempo utilizado (dia de pós-operatório), demonstram a dinâmica na expressão gênica dos receptores purinérgicos ao longo do período pós-operatório ou significar que os receptores purinérgicos apresentem diferentes papéis a depender do tecido ou células que os expressem. Este foi o primeiro estudo a avaliar o modelo fisiopatológico de dor por incisão plantar e a expressão gênica e proteica dos subtipos dos receptores purinérgicos. As diferenças genotípicas dos tecidos avaliados podem justificar a diferença de tendências de expressão gênica mostrada na tese.

### **5.1.2 Expressão do P2X4**

Os aumentos observados nas expressões do mRNA de P2X4 em pele, músculo e gânglio da raiz dorsal em até 24-48 horas, e do aumento da síntese proteica de P2X4 em pele, músculo e gânglio da raiz dorsal são dos principais resultados dessa tese. Possível envolvimento do P2X4 na nocicepção envolvida no modelo de dor aguda pós-operatória, corrobora a sua participação no fenômeno de neuroinflamação, com provável participação das células da glia, principalmente a micróglia, no processo de dor aguda pós-operatória. Até o momento, a maior parte dos estudos envolvendo receptores purinérgicos em dor está relacionada à sua participação em mecanismos de dor crônica e neuropática, com redução da resposta à dor em modelos de dor neuropática

em ratos deficientes para receptor P2X4, exibindo redução na reposta em modelos de dor neuropática crônica, porém, sem alteração de resposta quando se avalia o estímulo agudo ou lesão tecidual aguda (76). O estudo atual é, possivelmente, o primeiro que mostra o envolvimento do receptor P2X4 na nocicepção da dor pós-operatória aguda, mesmo com a limitação em demonstrar a(s) célula(s) responsáveis por sua síntese.

### **5.1.3 Expressão do P2X7**

Receptores P2X7 estão envolvidos na cronificação da dor, hiperalgesia pelo uso do opioide e dor neuropática. A expressão de P2X7 em modelo de ligadura de nervo periférico aumentou em gânglio da raiz dorsal correspondente, além de estar associada a maior grau de inflamação, dor e maior risco de cronificação da dor (77).

As expressões gênicas de P2X7 foram diferentes nos três tecidos estudados: pele, músculo e gânglio de raiz dorsal. Na pele, houve uma consistente diminuição de sua expressão no período estudado, enquanto que no músculo e gânglio de raiz dorsal, não houve variações significativas.

P2X7 está associado aos efeitos pró-nociceptivos com ação no sistema nervoso central, tendo sido isolado em células da glia (78) e ação no sistema nervoso periférico, com ação em modelos de dor inflamatória, como de injeção intraplantar de carragenina (56).

São resultados difíceis de serem comparados. Não encontramos estudos semelhantes ao presente estudo que estudou a expressão de receptores purinérgicos na periferia, o esperado seria a ocorrência de aumento da expressão próximo da área de lesão, o que não ocorreu na pele ou músculo e gânglio de raiz dorsal. Eventualmente, a diminuição da expressão, especificamente, na pele esteja associada a outro efeito do receptor que não associado à nocicepção. A diminuição, intrigante e curiosa, da expressão gênica do P2X7 também pode ser consequência de outros mecanismos moleculares como a participação de RNA de interferência de dupla fita (79) inviabilizando sua expressão apesar da lesão tecidual provocada pela incisão

plantar, promovendo inibição da expressão gênica na pele, mecanismo esse que não foi visto no gânglio da raiz dorsal ou no músculo, onde os valores se mantiveram semelhantes ao longo do tempo estudado. Em estudo usando outro modelo de dor pós-operatória com incisão de pele e retração intensa de músculo por uma hora foi encontrado aumento da expressão de P2X7 em gânglio de raiz (75), sendo importante avaliar diferentes modelos de dor pós-operatória para compreendermos a contribuição do receptor P2X7 na nocicepção da dor pós-operatória.

## **5.2 Microdiálise do ATP**

A microdiálise tem sido largamente usado em pesquisa científica. Diferente dos outros modelos, a microdiálise tem vantagens como, pode ser colocado diretamente no tecido, sem causar dano significativo ao tecido ou órgão-alvo (80). Em virtude de os receptores purinérgicos serem ativados por ATP, ficou expressa a necessidade de se avaliar a concentração tecidual de ATP na área onde ocorre a lesão tecidual causada pela incisão cirúrgica. Os resultados deste estudo usando microdiálise mostram o comportamento abrupto de aumento da concentração do ATP após a incisão em músculo.

Pode-se perceber nos resultados que logo após a incisão houve grande aumento, em torno de 30 vezes, da concentração de ATP no sítio de lesão, provavelmente, liberado como produto da lesão celular. Entretanto, a concentração diminuiu rapidamente, retornando aos valores basais depois de vinte minutos e permanecendo igual à região sem lesão pelo período de estudo, que foi de 120 minutos. Em tese, após vinte minutos ainda não houve transcrição e tradução significativas dos receptores purinérgicos na região, entretanto, os animais, sentem dor durante este período. O observado foi o aumento da expressão proteica de P2X4 na pele e no músculo depois de 12 horas e aumento da expressão de P2X3 no músculo depois de dois dias.

Não foi avaliada a concentração local de ATP nos tempos em que houve a expressão proteica dos receptores. É possível, que a concentração de ATP

tecidual possa aumentar novamente nestes tempos em função da inflamação tecidual, isquemia local e ativação dos mecanismos reparadores de lesão tecidual.

Provavelmente, houve participação dos receptores P2X4 na pele, músculo e gânglio da raiz dorsal nos mecanismos de dor e inflamação que ocorrem nos modelos de dor aguda pós-operatória.

Dentre as dificuldades observadas no trabalho estão a carência de trabalhos comparativos com mesmo modelo proposto pela tese ou de modelos semelhantes. Uma limitação observada no estudo está não utilização de hibridização *in situ* ou de imunohistoquímica que auxiliariam na real localização das células responsáveis pela transcrição e tradução dos receptores purinérgicos estudados.

Nos dias atuais, o conhecimento dos papéis dos receptores purinérgicos na fisiopatologia dor aguda e na dor pós-operatória aguda ainda são insuficientes e devem ser motivos de mais estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos.

## 6. CONCLUSÕES

Ao final da tese, concluímos que:

- - Houve alterações na expressão dos mRNAs de P2X3, P2X4 e P2X7 na pele, de P2X3 e P2X4 no músculo e de P2X3 em gânglio de raiz dorsal.
- Aumentou a expressão proteica de P2X4 em pele, músculo e gânglio da raiz dorsal.
- O uso de antagonista de receptor purinérgico diminuiu a resposta do comportamento de guarda de pata.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Kehlet H, Holte K. Effect of postoperative analgesia on surgical outcome. *Br J Anaesth*. 2001;87(1):62–72.
2. Kehlet H, Wilmore DW. Multimodal strategies to improve surgical outcome. *Am J Surg*. 2002;183(6):630–41.
3. Perkins FM, Kehlet H. Chronic pain as an outcome of surgery: A review of predictive factors. Vol. 93, *Anesthesiology*. 2000. p. 1123–33.
4. Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. Vol. 367, *Lancet*. 2006. p. 1618–25.
5. Gottschalk A, Raja SN. Severing the link between acute and chronic pain: The anesthesiologist's role in preventive medicine. Vol. 101, *Anesthesiology*. 2004. p. 1063–5.
6. American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice Guidelines for Acute Pain Management in the. *Anesthesiology*. 2012;116(2):248–73.
7. Pavlin DJ, Chen C, Penaloza DA, Polissar NL, Buckley FP. Pain as a factor complicating recovery and discharge after ambulatory surgery. *Anesth Analg*. 2002;95(3):627–34.
8. Buvanendran A, Kroin JS, Kerns JM, Nagalla SNK, Tuman KJ. Characterization of a new animal model for evaluation of persistent postthoracotomy pain. *Anesth Analg*. 2004;99(5):1453–60.
9. Martin TJ, Buechler NL, Kahn W, Crews JC, Eisenach JC. Effects of laparotomy on spontaneous exploratory activity and conditioned operant responding in the rat: A model for postoperative pain. *Anesthesiology*. 2004;101(1):191–203.
10. Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of incisional pain. Vol. 23, *Anesthesiology Clinics of North America*. 2005. p. 1–20.
11. Whiteside GT, Harrison J, Boulet J, Mark L, Pearson M, Gottshall S, et al. Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. *Br J Pharmacol*. 2004;141(1):85–91.
12. Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ. Postoperative pain-clinical implications of basic research. Vol. 21, *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*. 2007. p. 3–13.
13. Rahman A. Bonica's Management of Pain, 4th Edition. *Anesthesiology*. 2010;113(6):1482–3.
14. Lavand'homme P. Perioperative pain. Vol. 19, *Current Opinion in Anaesthesiology*. 2006. p. 556–61.
15. Wood JN, Perl ER. Pain. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9(3):328–32.
16. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. Vol. 288, *Science*. 2000. p. 1765–8.
17. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? Vol. 5, *Nature Neuroscience*. 2002. p. 1062–7.
18. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*. 1999;398(6726):436–41.
19. McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:835–56.

20. Tominaga M. Nociception and TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;179:489–505.
21. 资本深化、有偏技术进步与全要素生产率增长. The P2Y/P2X divide: how it began Accepted. 余东华 张鑫宇 孙 婷. 2019;1–20.
22. Rawish E, Langer HF. Platelets and the Role of P2X Receptors in Nociception, Pain, Neuronal Toxicity and Thromboinflammation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12).
23. Sheng D, Hattori M. Recent progress in the structural biology of P2X receptors. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2022;(January):1779–85.
24. Hua S qi, Hu J ling, Zou F long, Liu J peng, Luo H liang, Hu D xia, et al. P2X7 receptor in inflammation and pain. *Brain Res Bull [Internet]*. 2022;187(July):199–209. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.07.006>
25. Antonio LS, Egan TM. P2X receptors. *Curated Ref Collect Neurosci Biobehav Psychol*. 2016;349–54.
26. Burnstock G. P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signal*. 2016;12(1):59–67.
27. Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Microglial regulation of neuropathic pain. Vol. 121, *Journal of Pharmacological Sciences*. 2013. p. 89–94.
28. Sophocleous RA, Ooi L, Sluyter R. The P2X4 Receptor: Cellular and Molecular Characteristics of a Promising Neuroinflammatory Target. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10).
29. Schwab JM, Guo L, Schluesener HJ. Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *J Neuroimmunol*. 2005;163(1–2):185–9.
30. Kidd EJ, Grahames CBA, Simon J, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PPA. Localization of P(2X) purinoceptor transcripts in the rat nervous system. *Mol Pharmacol*. 1995;48(4):569–73.
31. Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, et al. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1999;407(1):11–32.
32. Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. Vol. 377, *Nature*. 1995. p. 428–31.
33. Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford APDW. Pharmacology of P2X channels. Vol. 452, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2006. p. 513–37.
34. Phillis JW, O'Regan MH, Perkins LM. Adenosine 5'-triphosphate release from the normoxic and hypoxic in vivo rat cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 1993;151(1):94–6.
35. Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R, McCleskey EW. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature*. 1997;387(6632):505–8.
36. Bennett DLH, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, et al. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury.

- J Neurosci. 1998;18(8):3059–72.
37. Page AJ, Martin CM, Blackshaw LA. Vagal mechanoreceptors and chemoreceptors in mouse stomach and esophagus. *J Neurophysiol.* 2002;87(4):2095–103.
  38. Prado FC, Araldi D, Vieira AS, Oliveira-Fusaro MCG, Tambeli CH, Parada CA. Neuronal P2X3 receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation. *Neuropharmacology.* 2013;67:252–8.
  39. Yasuda M, Shinoda M, Kiyomoto M, Honda K, Suzuki A, Tamagawa T, et al. P2X3 receptor mediates ectopic mechanical allodynia with inflamed lower lip in mice. *Neurosci Lett.* 2012;528(1):67–72.
  40. Davenport AJ, Neagoe I, Bräuer N, Koch M, Rotgeri A, Nagel J, et al. Eliapixant is a selective P2X3 receptor antagonist for the treatment of disorders associated with hypersensitive nerve fibers. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99177-0>
  41. Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE, Stühmer W. Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol.* 1997;51(1):109–18.
  42. Kim C, Chung JM, Chung K. Changes in the gene expression of six subtypes of P2X receptors in rat dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. *Neurosci Lett.* 2003;337(2):81–4.
  43. Ulmann L, Hirbec H, Rassendren F. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J.* 2010;29(14):2290–300.
  44. Suurväli J, Boudinot P, Kanellopoulos J, Rüütel Boudinot S. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J.* 2017;40(5):245–56.
  45. Kanellopoulos JM, Almeida-da-Silva CLC, Rüütel Boudinot S, Ojcius DM. Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. *Front Immunol.* 2021;12(March):1–21.
  46. Manzoor S, Khalid M, Idrees M. P2X4 receptors mediate induction of antioxidants, fibrogenic cytokines and ECM transcripts; in presence of replicating HCV in in vitro setting: An insight into role of P2X4 in fibrosis. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(5 May):1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0259727>
  47. Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC M-LRJCS 2007;120:3838e49. Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci.* 2007;120(38):38–49.
  48. Detterbeck FC. The Devil Is in the Details. *Ann Surg Oncol.* 2021;28(1):11–3.
  49. Kwon, H.S.; Koh S-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Tansl Neurodegener.* 2020;9:42.
  50. Bernier LP, Ase AR, Séguéla P. P2X receptor channels in chronic pain pathways. *Br J Pharmacol.* 2018;175(12):2219–30.
  51. Trang, T.; Salter MW. P2X4 purinoceptor signaling in chronic pain. *PurinergicSignal.* 2012;8:621–8.
  52. He, W.; Wang, Q.; Sha, W.; Wang, L.; Li, D.; Chen G. P2X4 Inhibition reduces microglia inflammation and apoptosis by NLRP3 and improves nervous

- system defects in rat brain trauma model.  
 P2X4 inhibition reduces microglial inflammation and apoptosis by NLRP3  
 Improv Nerv Syst defects rat brain trauma Model. 2022;99:224–32.
53. Meng, X.-w.; Gao, J.-l.; Zuo, J.-L.; Wang, L.-N.; Liu, S.-l.; Jin, X.-H.; Yao, M.; Namaka M. Toll-like receptor-4/p38MAPK signaling in the dorsal horn contributes to P2X4 receptor activation and BDNF over-secretion in cancer induced bone pain. *Neurosci Res.* 2017;125:37–45.
  54. Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, et al. A-740003 [N-(1-((cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):1376–85.
  55. McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, et al. P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience.* 2007;146(4):1817–28.
  56. Teixeira JM, Oliveira MCG, Parada CA, Tambeli CH. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X7 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol.* 2010;644(1–3):55–60.
  57. Pelegrin P. P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2021;187(December 2020):114385. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114385>
  58. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain.* 1996;64(3):493–502.
  59. Zahn PK, Gysbers D, Brennan TJ. Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology.* 1997;86(5):1066–77.
  60. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 1988;32(1):77–88.
  61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
  62. Lonroth O, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1987;253(2).
  63. Shinoda M, Ogino A, Ozaki N, Urano H, Hironaka K, Yasui M, et al. Involvement of TRPV1 in Nociceptive Behavior in a Rat Model of Cancer Pain. *J Pain.* 2008;
  64. D'amico R, Fusco R, Siracusa R, Impellizzeri D, Peritore AF, Gugliandolo E, et al. Inhibition of p2x7 purinergic receptor ameliorates fibromyalgia syndrome by suppressing nlrp3 pathway. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12).
  65. Driessen B, Reimann W, Selve N, Friderichs E, Bültmann R. Antinociceptive effect of intrathecally administered P2-purinoceptor antagonists in rats. *Brain Res.* 1994;666(2):182–8.
  66. Liu T, Tracey DJ. ATP P(2X) receptors play little role in the maintenance of neuropathic hyperalgesia. *Neuroreport.* 2000;11(8):1669–72.
  67. Tsuda M, Koizumi S, Kita A, Shigemoto Y, Ueno S, Inoue K. 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. *J Neurosci*. 2000;20(15):1–5.
68. Xu J, Brennan TJ. The pathophysiology of acute pain: Animal models. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2011;24(5):508–14.
  69. Wordliczek J, Dobrogowski J. Pathophysiology of postoperative pain. *Przegląd Lek*. 2000;57(4):201–10.
  70. Xu J, Brennan TJ. Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. *Anesthesiology*. 2010;112(1):153–64.
  71. Leng C, Chen LIN, Li C. Alteration of P2X1-6 receptor expression in retrograde Fluorogold-labeled DRG neurons from rat chronic neuropathic pain model. *Biomed Reports*. 2019;10(4):225–30.
  72. Novakovic SD, Kassotakis LC, Oglesby IB, Smith JA, Eglen RM FA and HJ. Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury. *Pain*. 1999;80:273–82.
  73. Chen L, Liu YW, Yue K, Ru Q, Xiong Q, Ma BM TX and LC. Differential expression of ATP-gated P2X receptors in DRG between chronic neuropathic pain and visceralgia rat models. *Purinergic Signal*. 2016;12:79–87.
  74. Biggs JE, Yates JM, Loescher AR, Clayton NM RP and BF. P2X(3) expression is not altered by lingual nerve injury. *Neurosci Lett*. 2008;441:110–4.
  75. Torres GE ET and VM. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem*. 1999;274:6653–9.
  76. Tsuda, M.; Kuboyama, K.; Inoue, T.; Nagata, K.; Tozaki-Saitoh, H.; Inoue K. Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain*. 2009;5:28.
  77. Ying YL, Wei XH, Xu XB, She SZ, Zhou LJ, Lv J, et al. Over-expression of P2X7 receptors in spinal glial cells contributes to the development of chronic postsurgical pain induced by skin/muscle incision and retraction (SMIR) in rats. *Exp Neurol [Internet]*. 2014;261:836–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.09.007>
  78. Inoue K, Tsuda M. Nociceptive signaling mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 receptors. *Biochem Pharmacol [Internet]*. 2021;187(October 2020):114309. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114309>
  79. Chu YX, Zhang Y, Zhang YQ, Zhao ZQ. Involvement of microglial P2X7 receptors and downstream signaling pathways in long-term potentiation of spinal nociceptive responses. *Brain Behav Immun [Internet]*. 2010;24(7):1176–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.06.001>
  80. Lehmann A. Effects of microdialysis-perfusion with Anisoosmotic media on extracellular amino acids in the rat Hippocampus and skeletal muscle. *Neurochem*. 1989;

## ANEXOS



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 16.10.18 **APROVOU** o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **064/16** intitulado “**Dor pós-operatória: expressão gênica de receptores purinérgicos ligados à dor em gânglio da raiz dorsal em modelo de incisão plantar em ratos**” apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

- Substituição de título do referido protocolo para: “**Expressão gênica de receptores purinérgicos ligados a nocicepção em gânglio da raiz dorsal no modelo de dor pós-operatória em ratos**”
- Substituição de pesquisador executante de Felipe Chiodini Machado para **João Nathanael Lima Torres**

Pesquisador Responsável: **Hazem Adel Ashmawi**

CEUA-FMUSP, 16 de Outubro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais