

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OLIVAR PEREIRA XAVIER JUNIOR

**ESTUDO DO PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP ( $K_{ATP}$ )  
NA FUNÇÃO DE NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS PRIMÁRIOS.**

UBERLÂNDIA, MG  
2025

OLIVAR PEREIRA XAVIER JUNIOR

**ESTUDO DO PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP ( $K_{ATP}$ )  
NA FUNÇÃO DE NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS PRIMÁRIOS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como exigência para obtenção de diploma de Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo.

UBERLÂNDIA, MG

2025

**ESTUDO DO PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP (K<sub>ATP</sub>)  
NA FUNÇÃO DE NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS PRIMÁRIOS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como exigência para obtenção de diploma de Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Celina Monteiro da Cruz Lotufo. UFU/MG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Queixa Tilelli. UFU/MG

---

Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira Santos. UFU/MG

Uberlândia, MG

2025.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da  
UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

X3 Xavier Junior, Olivar Pereira, 1991-  
2025 Estudo do papel dos canais de potássio sensíveis a ATP  
(KATP) na função de neurônios nociceptivos primários.  
[recurso eletrônico] / Olivar Pereira Xavier Junior. 2025.

Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Ciências Biológicas.

Modo de acesso: Internet.  
Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.

1. Biologia. I. Lotufo, Celina Monteiro da Cruz, 1976-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 573

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Dedico este trabalho a todos os estudantes e professores que seguiram firmes, ou não tão firmes assim, nessa caminhada acadêmica, e a minha família e amigos que estiveram comigo sempre que precisei.

## AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho de conclusão de curso representa um marco importante em minha jornada acadêmica e pessoal, e não seria possível sem o apoio, dedicação e presença de pessoas especiais que estiveram comigo ao longo dessa trajetória.

Expresso minha profunda gratidão à minha família, aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo apoio irrestrito e pelos valores que me transmitiram, os quais foram fundamentais para que eu chegassem até aqui. Em especial a minha irmã, por todo apoio e suporte na conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos, que compartilharam comigo momentos de alegria, dificuldades e aprendizado, meu mais sincero obrigado. Vocês foram minha rede de apoio emocional, sempre me incentivando e oferecendo palavras de motivação quando mais precisei.

Sou imensamente grato a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo, pelo comprometimento, paciência e orientação durante todo o processo de elaboração deste trabalho. Suas palavras de incentivo e suas valiosas contribuições foram indispensáveis para o sucesso deste projeto. Além de não ter desistido dessa orientação com tantos percalços devido a diversos problemas de cunho pessoal e de saúde.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia – UFU, pelo espaço para desenvolvimento das pesquisas, crescimento profissional e pessoal, um ambiente de aprendizagem sem precedentes.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta conquista, meu muito obrigado(a). Este trabalho não é apenas um resultado acadêmico, mas também uma celebração de todos que contribuíram para que eu alcançasse mais este objetivo em minha vida.

Já que é impossível voltar atrás para  
poder apagar o que fizemos,  
avancemos fazendo agora todo o  
bem possível, que um dia  
colheremos.

Divaldo Franco

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína cinase B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
DiBAC <sub>4</sub> (3)	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)TrimethineOxonol
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
GLUT2	Transportador de glicose 2
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HbA1c	Hemoglobina glicada
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanolsulfônico
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
I.Ig	Injeção intraganglionar
K <sup>+</sup>	Potássio
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	Canal de potássio sensível a ATP
Kir	Canal de potássio retificador de influxo
L5	5° Gânglio da raiz dorsal região lombar
L6	6° Gânglio da raiz dorsal região lombar
Na <sup>+</sup>	Sódio
Na <sup>+</sup> TTX-R	Canal de sódio resistente a tetrodotoxina
NaCl	Cloreto de sódio
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (reduzido)
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Nav	Canal de sódio dependente de voltagem
NO	Óxido nítrico
P2X	Canal sensível a ATP
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
RNA	Ácido ribonucleico
SP	Substância P
Sur	Receptor sulfoniluréia
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cultura de Primária de gânglio da raiz dorsal de ratos.** A imagem mostra a verificação das culturas da antes de ser colocada na estufa para incubação, neurônios circulados de vermelho..... 22
- Figura 2:** Diagrama da inserção da agulha no espaço intervertebral, entre L5 e L6..... 24
- Figura 3:** Von Frey eletrônico sendo aplicado na pata traseira de um rato..... 24
- Figura 4: Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal.** Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC4(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência inicial. B: Fluorescência final, após 10 minutos da administração de glibenclamida 100  $\mu$ M. Aumento 400x..... 27
- Figura 5: Efeito da glibenclamida no potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos em cultura.** É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's após administração de glibenclamida nas concentrações de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M de 31 a 125 neurônios.\* p<0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni..... 28
- Figura 6: Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal.** Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC4(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência basal (inicial). B: Fluorescência final, após 10 minutos da administração de diazóxido 100 $\mu$ M. Aumento 400x..... 29
- Figura 7: Efeito do diazóxido no potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos em cultura.** É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's após administração de diazóxido nas concentrações de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M de 31 a 125 neurônios \* p<0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni..... 30
- Figura 8: Gráfico comparativo entre glibenclamida e diazóxido.** O gráfico compara a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico, nas diferentes concentrações das drogas

1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Os valores obtidos por diazóxido são inferiores ao da glibenclamida. ..... 30

**Figura 9: Efeito do diazóxido (1  $\mu$ M) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico.** O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga. ..... 31

**Figura 10: Teste de hiperalgesia induzida por carragenina.** O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado após 3h, da administração intratecal de veículo (5% de DMSO em 10  $\mu$ L de salina), glibenclamida (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) ou diazóxido (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L), mediante uma injeção intraplantar subcutânea de carragenina (100  $\mu$ g/50  $\mu$ L). Dados mostrados como média  $\pm$  EPM (n=6) dados comparados por ANOVA no tempo de 3 horas, não houve diferença significativa. \* p<0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni. ..... 32

**Figura 11: Teste de nocicepção induzida por capsaicina.** As reações nociceptivas foram avaliadas durante 5 minutos após administração de capsaicina de 50  $\mu$ l contendo 10  $\mu$ g de capsaicina (em NaCl 0,9% contendo 5% de DMSO. Foi registrado o número de sacudidas ou lambidas da pata (reações nociceptivas). A injeção intratecal de veículo (5% de DMSO em 10  $\mu$ L de salina), glibenclamida (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) ou diazóxido (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) por via intratecal foi realizado 30 minutos antes da injeção de capsaicina na pata dos animais. Dados mostrados como média  $\pm$  EPM (n=6) \* p<0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni. ..... 33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivos Específicos.....	19
2.2. Justificativa .....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1. Animais.....	20
3.2. Cultura Primária de gânglio da raiz dorsal de ratos e Microscopia Confocal.....	21
3.3. Injeção intratecal.....	23
3.4. Modelo de dor do tipo inflamatória com carragenina.....	24
3.5. Teste da capsaicina .....	25
3.6. Eutanásia.....	26
3.7. Descarte de materiais .....	26
3.8. Análise Estatística.....	26
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1. Experimentos <i>em vitro</i> .....	27
4.2. Experimentos <i>em vivo</i> .....	31
4.2.1. Teste da hiperalgesia induzida por carragenina: .....	31
4.2.2. Teste de nocicepção induzido por capsaicina: .....	32
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## RESUMO

Esta pesquisa analisou o papel dos canais de potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) na regulação do potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários e sua influência em modelos de dor e hiperalgesia. O objetivo central do estudo foi analisar o impacto da glibenclamida (um inibidor dos canais  $K_{ATP}$ ) e do diazóxido (um ativador desses canais) na excitabilidade neuronal *in vitro* e na sensibilidade dolorosa em animais. Para tal, foram conduzidos estudos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal (GRD) de ratos, empregando microscopia confocal e o marcador fluorescente DiBAC4(3) para avaliar mudanças no potencial de membrana. Ao mesmo tempo, experimentos comportamentais analisaram a hiperalgesia mecânica provocada pela carragenina e a nocicepção química provocada pela capsaicina em ratos que receberam as drogas por via intratecal.

Os resultados *in vitro* indicaram que a glibenclamida, nas concentrações testadas (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M), causou despolarização significativa do potencial de repouso neuronal ao bloquear os canais  $K_{ATP}$ , reduzindo a entrada de  $K^+$  e aumentando a atividade celular. O diazóxido, por sua vez, apresentou uma resposta bifásica: inicialmente promoveu hiperpolarização, devido à ativação dos canais  $K_{ATP}$ , e depois induziu despolarização, possivelmente ligada a mecanismos compensatórios, como a ativação de canais de cálcio ou sódio sensíveis à voltagem. A despolarização tardia ocorreu cerca de 5 minutos após a exposição ao diazóxido, sugerindo o envolvimento de vias de sinalização secundárias.

Nos experimentos *in vivo*, a glibenclamida diminuiu de forma parcial a hiperalgesia provocada pela carragenina, sem modificar significativamente a sensibilidade mecânica prévia. O diazóxido não demonstrou ter um efeito analgésico, indicando que a ativação dos canais  $K_{ATP}$  pode não ser suficiente para neutralizar os mediadores inflamatórios presentes na carragenina. Na nocicepção causada pela capsaicina, ambos os fármacos intensificaram a dor: a glibenclamida potencializou a despolarização através do TRPV1, enquanto o diazóxido acionou vias de excitação compensadora. Estes achados indicam que a modulação dos canais  $K_{ATP}$  apresenta consequências contextuais, variando conforme o estímulo doloroso e a condição dos neurônios.

As implicações desses resultados são especialmente relevantes para a neuropatia diabética, onde a hiperglicemias crônica reduz a atividade dos canais  $K_{ATP}$ , promovendo hiperexcitabilidade neuronal e dor persistente. A glibenclamida, embora usada no tratamento do diabetes tipo 2, pode agravar a dor neuropática ao bloquear esses canais. Por outro lado, agonistas seletivos como o diazóxido mostram potencial terapêutico, apesar da necessidade de melhorar sua eficácia.

Temos como conclusão de que os canais  $K_{ATP}$  são importantes para a manutenção do potencial de repouso e podem atuar como moduladores da excitabilidade dos neurônios nociceptivos. Este mecanismo explica o papel da abertura dos canais  $K_{ATP}$  no mecanismo de ação de drogas analgésicas. Por outro lado, os dados aqui apresentados sugerem que a glibenclamida pode aumentar a sensibilidade dolorosa. Tal efeito deve ser mais bem investigado em um estudo posterior.

**Palavras-chave:** Canais de potássio sensíveis a ATP. Dor neuropática. Glibenclamida. Diazóxido. Neurônios sensoriais. Hiperalgesia.

## ABSTRACT

This research analyzed the role of ATP-sensitive potassium (KATP) channels in regulating the resting potential of primary nociceptive neurons and their influence in models of pain and hyperalgesia. The main objective of the study was to analyze the impact of glibenclamide (an inhibitor of KATP channels) and diazoxide (an activator of these channels) on neuronal excitability *in vitro* and pain sensitivity in animals. To this end, studies were conducted in primary cultures of rat dorsal root ganglia (DRG), using confocal microscopy and the fluorescent marker DiBAC4(3) to evaluate changes in membrane potential. At the same time, behavioral experiments analyzed the mechanical hyperalgesia caused by carrageenan and the chemical nociception caused by capsaicin in rats that received the drugs intrathecally.

The *in vitro* results indicated that glibenclamide, at the concentrations tested (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M), caused significant depolarization of the neuronal resting potential by blocking KATP channels, reducing K<sup>+</sup> entry and increasing cellular activity. Diazoxide, in turn, presented a biphasic response: it initially promoted hyperpolarization, due to the activation of KATP channels, and then induced depolarization, possibly linked to compensatory mechanisms, such as the activation of voltage-sensitive calcium or sodium channels. The late depolarization occurred approximately 5 minutes after exposure to diazoxide, suggesting the involvement of secondary signaling pathways.

In *in vivo* experiments, glibenclamide partially reduced the hyperalgesia caused by carrageenan, without significantly modifying the previous mechanical sensitivity. Diazoxide did not demonstrate an analgesic effect, indicating that the activation of KATP channels may not be sufficient to neutralize the inflammatory mediators present in carrageenan. In the nociception caused by capsaicin, both drugs intensified the pain: glibenclamide potentiated the depolarization through TRPV1, while diazoxide activated compensatory excitation pathways. These findings indicate that the modulation of KATP channels has contextual consequences, varying according to the painful stimulus and the condition of the neurons.

The implications of these results are especially relevant for diabetic neuropathy, where chronic hyperglycemia reduces the activity of KATP channels, promoting neuronal hyperexcitability and persistent pain. Glibenclamide, although used in the treatment of type 2 diabetes, may aggravate neuropathic pain by blocking these channels. On the other hand, selective agonists such as diazoxide show therapeutic potential, although their efficacy needs to be improved.

We conclude that KATP channels are important for maintaining the resting potential and can act as modulators of the excitability of nociceptive neurons. This mechanism explains the role of KATP channel opening in the mechanism of action of analgesic drugs. On the other hand, the data presented here suggest that glibenclamide may increase pain sensitivity. This effect should be further investigated in a future study.

**Keywords:** ATP-sensitive potassium channels. Neuropathic pain. Glibenclamide. Diazoxide. Sensory neurons. Hyperalgesia.

## 1. INTRODUÇÃO

A dor é um fenômeno complexo e essencial para a sobrevivência dos organismos vivos, funcionando como um mecanismo de alerta contra possíveis danos teciduais (SCHOLZ, J., & WOOLF, C. 2002). A “*International Association for the Study of Pain*” (IASP) revisou recentemente a definição de dor, descrevendo-a como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA *et al.*, 2020; HWANG, S. J.; OH, S. B, 2007). Essa definição destaca a subjetividade da dor, diferenciando-a da nocicepção, que se refere apenas ao processamento neural de estímulos nocivos (JULIUS; BASBAUM, 2009; NEVES, 2017).

A dor é classificada em três principais categorias: dor nociceptiva, dor inflamatória e dor patológica (HWANG, S. J.; OH, S. B, 2007; GATTLEN, 2019). A dor nociceptiva resulta da ativação de nociceptores em resposta a estímulos nocivos, como temperaturas extremas ou trauma mecânico, desempenhando um papel protetor. A dor inflamatória ocorre devido à liberação de mediadores inflamatórios, facilitando o processo de reparação tecidual (RAJA *et al.*, 2020; MENDES, 2017). Já a dor patológica, que inclui a dor neuropática, pode surgir independentemente da presença de um estímulo nocivo direto e está associada a doenças crônicas e disfunções do sistema nervoso (GATTLEN, 2019; DE CAMPOS LIMA *et al.*, 2019).

A dor neuropática tem sido amplamente estudada devido ao seu impacto na qualidade de vida dos pacientes e à sua complexidade fisiopatológica. Esse tipo de dor resulta de lesões ou disfunções no sistema nervoso somatossensorial, podendo ser causado por doenças como diabetes, neuralgia pós-herpética e neuropatias induzidas por quimioterapia (DE CAMPOS LIMA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2014). Devido à sua natureza muitas vezes refratária, o tratamento da dor neuropática representa um desafio clínico significativo. Enquanto a dor inflamatória responde bem a anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), a dor neuropática frequentemente requer o uso de anticonvulsivantes, antidepressivos ou moduladores dos canais iônicos para um controle mais eficaz (BASBAUM; JULIUS, 2009; HWANG, S. J.; OH, S. B, 2007).

Para se entender a dor devemos compreender como ocorre sua transmissão, que

envolve uma complexa rede de vias neurais que conectam os nociceptores periféricos ao sistema nervoso central. Os sinais nociceptivos são inicialmente detectados pelos nociceptores, os neurônios sensoriais especializados que expressam canais iônicos e receptores responsáveis pela transdução de estímulos nocivos (DU; GAMPER, 2013; ZHANG *et al.*, 2002). Esses sinais são conduzidos pela medula espinhal até o cérebro, onde ocorrem o processamento e a percepção da dor. As fibras A $\delta$  e C desempenham um papel fundamental na condução da dor: as fibras A $\delta$  transmitem sinais rápidos e bem localizados, enquanto as fibras C são responsáveis por transmitir dor difusa e persistente (MCDOWELL, 2019; MILLAN, 1999; GATTLEN, 2019; WOOLF *et al.*, 1992).

As fibras A $\delta$ , mielinizadas, respondem a estímulos mecânicos e podem ser sensibilizadas pelo calor, são fibras de diâmetro maior (1–6  $\mu$ M), mielinizadas, e transmitem impulsos rapidamente, com velocidades típicas entre 5 e 30 metros por segundo. Elas são responsáveis pela dor aguda, inicial e bem localizada, descrita como “pontada” ou “choque” (F. FERRANTE, 1999; I. B. BENDER, 2000; OLIVEIRA, 2008). Já as fibras C, não mielinizadas, reagem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, sendo nociceptores polimodais, são fibras de diâmetro menor (0,2–1  $\mu$ M), não mielinizadas, e transmitem impulsos lentamente, com velocidades em torno de 0,5 a 2 metros por segundo. Estão associadas à dor mais difusa, persistente e de caráter “queimante” ou “arrastada”. (F. FERRANTE, 1999; I. B. BENDER, 2000; MACIVER & TANELIAN, 1992; K. ØRSTAVIK *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2008).

Os nociceptores são neurônios sensoriais especializados encontrados por todo o corpo humano, que são responsáveis por detectar estímulos mecânicos, químicos e térmicos, ativam vários canais iônicos e receptores, como TRPV1, e outros, que desempenham um papel crucial na sensibilização e modulação da dor (KHAN *et al.*, 2019; DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010; MILLAN, 1999). O receptor TRPV1 é um canal permeável aos íons sódio e cálcio e que pode ser seletivamente ativado por capsaicina, o princípio ativo das pimentas ardentes (DACHUN YANG *et al.* 2010; FANG YANG *et al* 2015; YANG & ZHENG, 2017). Este receptor é característico de fibras C nociceptivas e sua função está relacionada à sensibilidade a calor intenso e acidez (BÖLCSKEI *et al.*, 2005, KOLLARIK & UNDEM, 2004; MITCHELL *et al.*, 2014).

A sensibilização das vias de transmissão da dor é um fenômeno que pode

ocorrer tanto em níveis periféricos quanto centrais, contribuindo para a hiperalgesia e a alodinia. Esses processos são fundamentais para entender como a dor pode se tornar crônica e debilitante, impactando a qualidade de vida dos pacientes (P. SCHEUREN *et al.*, 2020; R. JI *et al.*, 2018).

A hiperalgesia é caracterizada por uma resposta aumentada a estímulos que normalmente induziram dor, enquanto a alodinia refere-se à dor provocada por estímulos que não são normalmente dolorosos (MANNION & WOOLF, 2000; HAANPÄÄ *et al.*, 2011). Esses fenômenos são frequentemente observados em condições de inflamação e dor crônica e estão associados a alterações na excitabilidade neuronal e na plasticidade sináptica (C. LUO *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 1992). Os canais iônicos, incluindo os canais de sódio e de potássio, desempenham um papel fundamental na geração e propagação dos potenciais de ação nos neurônios nociceptivos. A ativação dos canais de sódio é crítica para a despolarização da membrana celular, enquanto os canais de potássio são essenciais para a repolarização e o estabelecimento do potencial de repouso (ZHOU *et al.*, 2011; KACZMAREK & ZHANG, 2017). Alterações tanto em canais de sódio quanto em canais de potássio podem participar do processo de sensibilização, ou hiperalgesia, em neurônios nociceptivos primários (VERKEST *et al.*, 2021).

Dentre os canais de potássio que parecem afetar a excitabilidade dos neurônios nociceptivos primários, diversas evidências têm sugerido um importante papel para os canais de potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) (OCAÑA, M. *et al.*, 2004; DE CAMPOS LIMA *et al.*, 2022). O efeito de diversas moléculas com ação analgésica e que atuam sobre os neurônios nociceptivos primários parece ocorrer através da abertura de canais  $K_{ATP}$  (LUU, W. *et al.*, 2019). A abertura de canais  $K_{ATP}$  resulta em uma hiperpolarização do potencial de repouso neuronal, resultando em redução da excitabilidade dos neurônios nociceptivos.

Os canais  $K_{ATP}$  são bem conhecidos devido ao seu papel fundamental na liberação de insulina pelas células beta pancreáticas (MIKI, T.; NAGASHIMA, K.; SEINO, S., 1999). Nestas células, o aumento da glicemia resulta em entrada de glicose na célula, que resulta em produção aumentada de ATP pelo metabolismo celular. Este aumento de ATP promove o fechamento de canais  $K_{ATP}$ , que estão abertos durante o repouso celular, despolarizando a membrana e promovendo a abertura de canais de cálcio

dependentes de voltagem (KENNEDY, H. J. *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2017). O influxo de cálcio é responsável por induzir a liberação e produção de insulina pelas células beta pancreáticas. Dados de nosso laboratório e de outros sugere que efeito semelhante pode acontecer em neurônios nociceptivos primários em situações de hiperglicemia (DE CAMPOS LIMA, 2019; WANG *et al.*, 2023).

Canais  $K_{ATP}$ , em particular, respondem a variações nos níveis de ATP, influenciando a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores que modulam a dor (DE CAMPOS LIMA, 2019; KAWANO *et al* 2009; SARANTOPOULOS, C. *et al* 2003). A disfunção desses canais em condições de hiperglicemia pode ter implicações significativas para a modulação da dor e o desenvolvimento de neuropatia diabética.

A glibenclamida, um inibidor dos canais  $K_{ATP}$ , é amplamente utilizada no tratamento do diabetes, promovendo um aumento de liberação de insulina em pacientes com diabetes do tipo 2. No entanto, alguns estudos sugerem que essa inibição pode afetar o potencial de repouso dos neurônios nociceptivos, tornando-os mais suscetíveis à ativação espontânea e, possivelmente, afetando a neuropatia diabética (DE CAMPOS LIMA *et al.*, 2019; HWANG, S. J.; OH, S. B, 2007).

Como antagonista da glibenclamida temos o que é um diazóxido utilizado no tratamento de hipertensão arterial grave e hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente (HH), especialmente em recém-nascidos e crianças. O diazóxido ativa canais  $K_{ATP}$ , por meio da sua abertura, levando à hiperpolarização da membrana neuronal, redução da frequência de potenciais de ação e diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  via canais NMDA, além de reduzir o estresse oxidativo. (DONG LIU *et al.*, 2010, M. AVSHALUMOV *et al.*, 2005, N. MATSUMOTO *et al.*, 2002)

Estudos indicam que terapias experimentais, como a modulação farmacológica dos canais  $K_{ATP}$  por meio de agonistas seletivos, pode representar uma alternativa terapêutica promissora para a dor neuropática, reduzindo os efeitos colaterais dos tratamentos convencionais (DU *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2024). Esses ensaios demonstram que a abertura dos canais  $K_{ATP}$  pode diminuir a excitabilidade dos neurônios nociceptivos, levando a uma redução na nocicepção e na percepção da dor (GINIATULLIN 2020; KAWANO *et al* 2009).

A investigação dos canais  $K_{ATP}$  nos nociceptores é de suma importância, especialmente considerando sua relação com a diabetes e a analgesia. A utilização da glibenclamida, que bloqueia esses canais, e do diazóxido que faz a abertura deles, oferece uma perspectiva valiosa para entender os mecanismos de ação dos analgésicos e como eles podem ser otimizados para o tratamento de dor neuropática (DE CAMPOS LIMA *et al.* 2019; FERREIRA *et al.*, 2007).

Compreender melhor a relação entre os canais  $K_{ATP}$  e os processos nociceptivos pode permitir avanços significativos no desenvolvimento de novas terapias analgésicas mais eficazes e seguras. O aprofundamento na interação entre os canais  $K_{ATP}$  e o potencial de repouso dos neurônios nociceptivos primários, bem como os efeitos em especial da glibenclamida sobre esses canais, pode auxiliar na elaboração de estratégias terapêuticas inovadoras para o tratamento da dor crônica. Assim, novas abordagens farmacológicas direcionadas a esses mecanismos celulares podem contribuir para melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofrem com condições dolorosas crônicas e de difícil manejo.

O avanço nesse campo pode contribuir significativamente para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes que sofrem com dor crônica, especialmente aqueles afetados pela diabetes. Em nosso laboratório foi utilizado uma técnica de fluorescência com o indicador DiBAC 4(3) que permite avaliar alterações no potencial de repouso celular de forma simples em culturas celulares (CUNHA *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2012; DE CAMPOS LIMA *et. al* 2019), além de testes comportamentais em modelos animais que possibilitam avaliar o efeito de moduladores de canais  $K_{ATP}$  na dor e hiperalgesia.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi estudar o papel dos canais  $K_{ATP}$ , presentes em neurônios nociceptivos primários, na dor e hiperalgesia. Para tanto, foi avaliado o efeito da glibenclamida, uma substância que fecha canais  $K_{ATP}$  e do diazóxido, uma substância que abre estes canais, sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos. Além disso, o efeito das mesmas substâncias na nocicepção e hiperalgesia inflamatória foi avaliado em modelos experimentais em ratos.

### 2.1. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o efeito do fechamento dos canais  $K_{ATP}$  através da administração de glibenclamida sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários.
- 2) Avaliar o efeito da abertura dos canais  $K_{ATP}$  através da administração de diazóxido sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários.
- 3) Avaliar o efeito da administração espinhal, via intratecal, da glibenclamida e do diazóxido sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina na pata de ratos.
- 4) Avaliar o efeito da administração espinhal, via intratecal, da glibenclamida e do diazóxido sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de carragenina na pata de ratos.

### 2.2. Justificativa

Estudos anteriores indicam um papel importante dos canais  $K_{ATP}$  na modulação da dor, sendo que estes canais participam da regulação do potencial de repouso dos neurônios nociceptivos.

A despolarização do potencial de repouso participa da diminuição do limiar de excitabilidade dos neurônios aferentes nociceptivos, resultando no fenômeno chamado de hiperalgesia, ou seja, um aumento da sensibilidade dolorosa ou a uma resposta exacerbada

a um estímulo nocivo.

A glibenclamida inibe a atividade desse canal de potássio sensível ao ATP, promovendo seu fechamento, levando a despolarização da membrana da célula. Esse mecanismo é semelhante ao processo fisiológico que ocorre na célula beta pancreática. Os neurônios sensoriais periféricos também são permeáveis à glicose e possuem canais  $K_{ATP}$ , de forma que o mesmo mecanismo de despolarização que ocorre nas células betas pancreáticas pode estar ocorrendo nos neurônios sensoriais. Sendo assim, o estudo se justifica por procurar avançar no conhecimento do envolvimento dos canais  $K_{ATP}$ , e neurônios nociceptivos na dor e hiperalgesia.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o protocolo Nº 048/21. E seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela “*International Association for the Study of Pain*” (IASP), (ZIMMERMANN, 1986).

#### **3.1. Animais**

Os ratos Wistar foram mantidos em sala com temperatura de 25°C e ciclo de luminosidade controlada (12/12h). Eles tiveram acesso livre à água filtrada e ração *ad libitum*. As caixas eram trocadas a cada 2 ou 3 dias e colocados em maravalha autoclavada para esterilização. As caixas ficavam em estantes ventiladas com exaustão de ar próprias para este fim. Os ratos foram mantidos em quantidade máxima de 5 animais por caixa (aproximadamente 34 x 41 x 18 cm). (ZIMMERMANN, 1986).

Para os experimentos, os animais foram divididos em grupos distintos de acordo com os protocolos de indução de nocicepção e hiperalgesia. No teste de nocicepção induzido por capsaicina, três grupos foram estabelecidos: o Grupo 1 (controle), que recebeu injeção intratecal de veículo 30 minutos antes da administração de capsaicina (n=7); o Grupo 2 (glibenclamida), tratado com injeção intratecal de glibenclamida no mesmo intervalo (n=7); e o Grupo 3 (diazóxido), que

recebeu diazóxido intratecal antes da capsaicina (n=7), totalizando 21 ratos.

No teste de hiperalgesia induzido por carragenina, a distribuição seguiu um delineamento similar, porém com ajustes no tempo de administração. O Grupo 1 (controle) recebeu veículo intratecal 2 horas e 30 minutos após a carragenina (n=6); o Grupo 2 (glibenclamida) foi submetido à glibenclamida no mesmo intervalo (n=6); e o Grupo 3 (diazóxido) recebeu diazóxido após o período estabelecido (n=6), somando 18 ratos.

Ao todo, o estudo utilizou 47 animais, sendo 8 ratas com peso entre 80 e 100 g para experimentos *in vitro* e 39 ratos com peso entre 180 e 200 g para ensaios comportamentais *in vivo*. Essa distribuição buscou assegurar robustez estatística e adequação ética, minimizando o número de indivíduos sem comprometer a validade dos resultados.

### **3.2. Cultura Primária de gânglio da raiz dorsal de ratos e Microscopia Confocal**

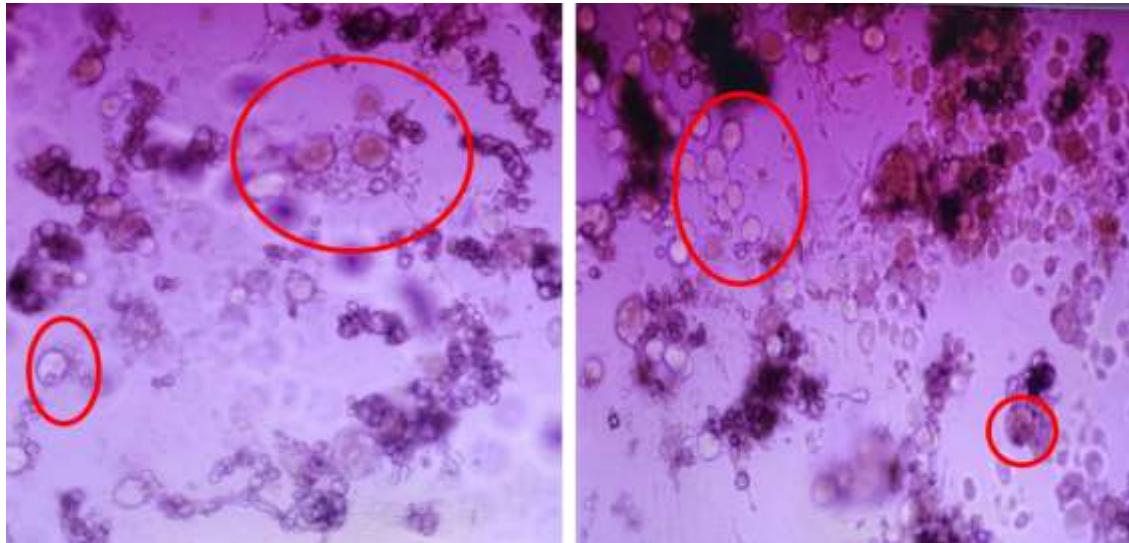
Para os experimentos *in vitro* foram realizadas culturas primárias do gânglio da raiz dorsal (GRD). As ratas Wistar foram anestesiados profundamente por inalação de isoflurano (5% em oxigênio) e em seguida eutanasiados e exsanguinados por decapitação. A exsanguinação foi necessária para que se possa remover com maior rapidez e afim da obtenção de uma quantidade maior de gânglios. A concentração maior de anestésico inalatório garante que o animal esteja profundamente anestesiado no momento da eutanásia e não há prejuízo caso o animal venha a óbito pela concentração maior de anestésico.

Posteriormente, os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica foram removidos (cerca de 12 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES. Em seguida, os gânglios foram incubados com solução salina de Hank's contendo 0,28 U/ml de colagenase a 37°C por 75 minutos, e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina.

Os gânglios foram, então, lavados em meio DMEM contando 10% de soro fetal

bovino. As células foram dissociadas mecanicamente com uma pipeta Pasteur de vidro e cultivadas no mesmo meio de cultura em placas cobertas com Matrigel. As placas foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 37°C. As células foram cultivadas em placas de Petre contendo uma lamínula ao fundo, apropriadas para aquisição de imagens através do microscópio confocal. Após 12-72 horas, as culturas foram lavadas houve a incubação com indicador fluorescente para avaliação de potencial de membrana (DiBAC4(3)). (YAMADA *et al.*, 2001).

Este indicador, presente durante todo o experimento, é carregado negativamente e emite fluorescência ao se associar à membrana celular ou a proteínas, sinalizando variações no potencial de membrana da célula se torna menos negativo, ou seja, ocorre despolarização, a fluorescência aumenta, diminuindo em caso de hiperpolarização da membrana. A glibenclamida ou o diazóxido foram administrados diretamente às culturas durante a aquisição das imagens no microscópio confocal. Para tanto, 10 µL de uma solução 10X a concentração final desejada foi adicionada à placa contendo 90 µL de solução Hanks/Hepes.



**Figura 1: Cultura de Primária de gânglio da raiz dorsal de ratos.** A imagem mostra a verificação das culturas da antes de ser colocada na estufa para incubação, neurônios circulados de vermelho.

Devido à sua difusão lenta através da membrana, o DiBAC4(3) é adequado para registrar alterações sustentadas no potencial de membrana, como as do potencial de repouso neuronal. A fluorescência foi registrada por meio de imagens em séries temporais obtidas com microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) e analisadas pelo software

ImageJ (NIH). A variação de fluorescência de cada neurônio foi determinada através da seleção de ROI, regiões de interesse, para quantificação da intensidade média de fluorescência em cada célula. Os resultados foram expressos como  $(\Delta F/F_0)$ , normalizando a variação na fluorescência ( $\Delta F = F - F_0$ ) em relação à fluorescência basal ( $F_0$ ) para considerar as diferenças na concentração do indicador nas células.

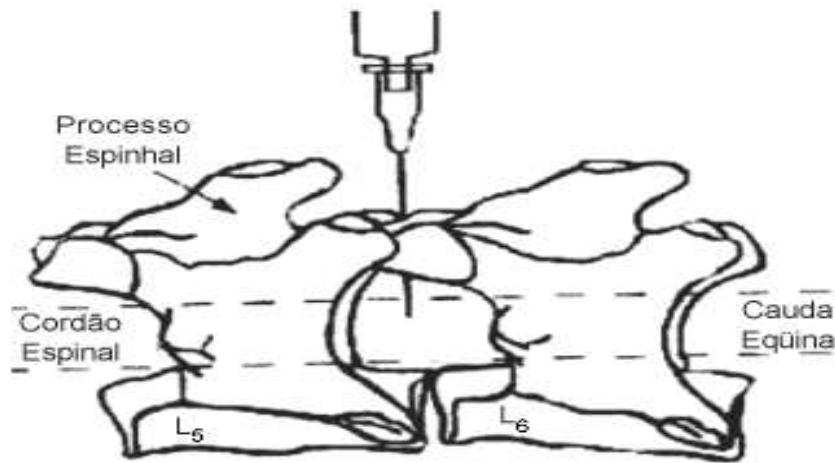
### **3.3. Injeção intratecal**

As injeções intratecais foram realizadas através do método de injeção direta conforme descrito por Mestre e Col. (1994). Para a realização da injeção intratecal, após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais foram anestesiados também com Isoflurano e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, para que sua região lombar fique hiperfletida. Em seguida, uma agulha BD Ultra-Fine® (29G) de seringa para insulina 30 unidades foi inserida no espaço subaracnóideo, perfurando a região medial entre as vértebras L4-L5 ou L5-L6 ( $\pm 1$ ) em ângulo de aproximadamente  $45^\circ$ , e o volume de  $10 \mu\text{L}$  foi injetado.

A correta localização da punção no espaço subaracnóideo foi verificada pela observação de um reflexo na cauda do animal. Após a injeção, a agulha foi mantida por alguns segundos em posição antes de cautelosa retirada, evitando assim o refluxo da solução injetada.

As drogas que foram administradas no espaço subaracnóideo são glibenclamida ( $50 \mu\text{g}$  em  $10 \mu\text{L}$ ), diazóxido ( $50 \mu\text{g}$  em  $10 \mu\text{L}$ ) ou o respectivo veículo (5% de DMSO em solução salina) conforme descrito anteriormente (FERRARI *et al.*, 2007).

Figura 2: Diagrama da inserção da agulha no espaço intervertebral, entre L5 e L6



Fonte: (MESTRE et al.; 1994).

### 3.4. Modelo de dor do tipo inflamatória com carragenina

Neste experimento, foi avaliada a sensibilidade mecânica por meio de um anestesiômetro eletrônico (Von Frey eletrônico Insight), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão das patas dos animais é realizado por meio de uma ponteira Universal Tips 10  $\mu$ L (T-300, Axygen) adaptada ao aparelho, como descrito em estudos anteriormente (VIVANCOS *et al.*, 2004).

Figura 3: Von Frey eletrônico sendo aplicado na pata traseira de um rato.



Fonte: (Site DOL - Dor Online – [www.dol.inf.br](http://www.dol.inf.br)).

Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho foi uma rede de malha igual a 5 mm<sup>2</sup> constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. Foi então aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata que havia sofrido estimulação. Foram realizados 3 a 4 estímulos em cada tempo de medida para cada animal, sendo registrada a média destes para análise.

O reflexo de retirada da pata foi considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP). A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão obtida antes e após o experimento, em gramas.

O LNRP foi avaliado antes e após 3 horas da administração intraplantar de carragenina (pata direita traseira utilizando uma seringa BD Ultra-fine II; 100 µg/ 50 µL). A injeção intratecal de veículo (5% de DMSO em 10 µL de salina), glibenclamida (50 µg/ 10 µL) ou diazóxido (50 µg/ 10 µL) por via intratecal foi realizada duas horas e meia após a injeção de carragenina, ou seja, 30 minutos antes da avaliação do LNRP. Para redução do stress, os ratos foram habituados ao equipamento 1 dia antes da execução dos experimentos.

### **3.5. Teste da capsaicina**

No teste da capsaicina foi realizada uma injeção intraplantar de 50 µl contendo 10 µg de capsaicina (em NaCl 0,9% contendo 5% de DMSO), utilizando uma seringa BD Ultra-fine II. Essa injeção é realizada de forma subcutânea. Após a injeção intraplantar da capsaicina, o animal foi observado, durante 5 minutos após administração das drogas e registrado o número de sacudidas ou lambidas da pata (reações nociceptivas). A injeção intratecal de veículo (5% de DMSO em 10 µL de salina), glibenclamida (50 µg/ 10 µL) ou diazóxido (50 µg/ 10 µL) por via intratecal foi realizada 30 minutos antes da injeção de capsaicina na pata dos animais.

### **3.6. Eutanásia**

Nos ratos utilizados nos experimentos comportamentais foi utilizada a sobredosagem de xilazina e cetamina. As drogas foram administradas em dose única, usando a mesma seringa, sendo xilazina (30 mg/kg, i.p.) e cetamina (300 mg/kg, i.p.).

Nas ratas utilizadas para obtenção das culturas primárias: Os animais foram anestesiados com uma concentração alta de isoflurano e em seguida foram decapitados para exsanguinação. A concentração alta de isoflurano foi utilizada visto que não há prejuízo caso o animal venha a óbito durante a anestesia (5% de isoflurano em oxigênio administrado através de vaporizador para uso veterinário). Os animais foram observados por pelo menos 5 minutos após parada respiratória.

### **3.7. Descarte de materiais**

O lixo resultante da limpeza da sala, material e carcaça dos animais provenientes da seção de experimentação, foram acondicionados em sacos plásticos brancos, identificados como risco biológico e descartados em local apropriado. A carcaça foi acondicionada em freezer a -20º C, destinado a este fim no REBIR/UFU e foi recolhida posteriormente para incineração por empresa contratada.

### **3.8. Análise Estatística**

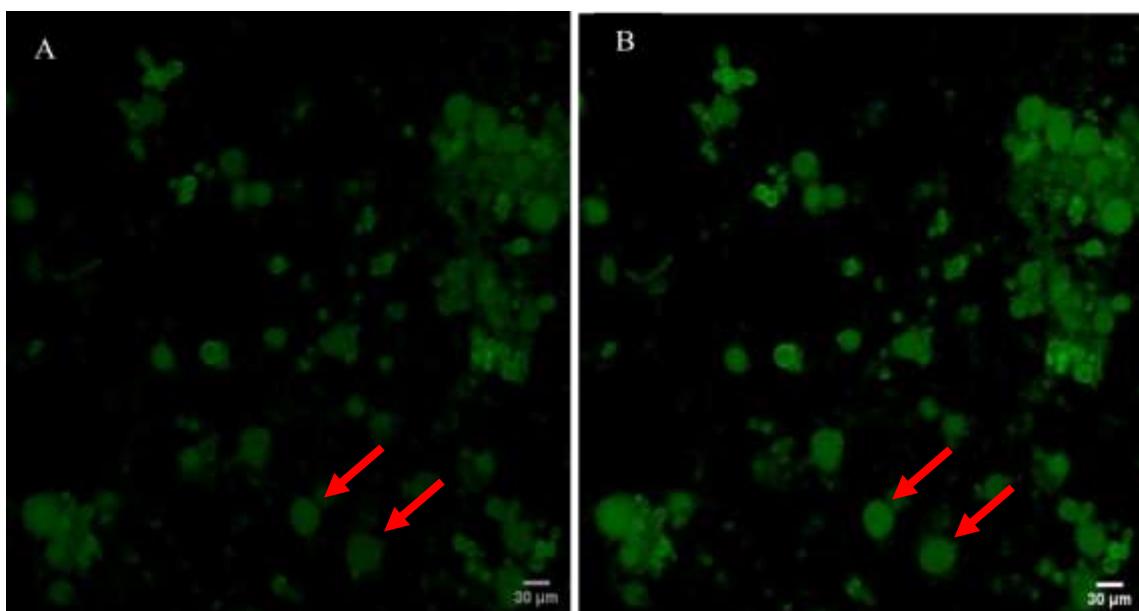
A análise da normalidade foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e as médias foram comparadas foram feitas através de teste t ou ANOVA seguida de teste de Bonferroni, no caso de comparação entre mais de duas médias. No caso de os dados obtidos não apresentarem distribuição normal, foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis, de acordo com a quantidade de médias a serem comparadas. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Experimentos *em vitro*

Avaliou-se o potencial de repouso de neurônios em culturas primárias de GRD através da microscopia confocal com o indicador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3). A glibenclamida foi administrada diretamente nos neurônios cultivados nas seguintes concentrações 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, após as imagens iniciais e uma sequência de imagens foi registrada durante 10 minutos.

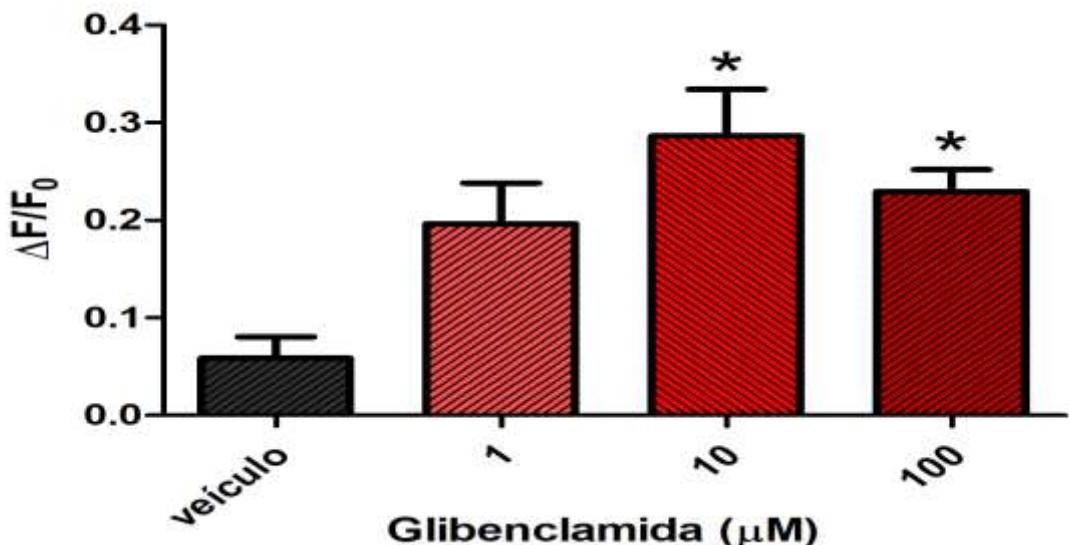
A variação de fluorescência de cada neurônio foi determinada através da seleção de ROI, regiões de interesse, para quantificação da intensidade média de fluorescência em cada célula.



**Figura 4: Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal.** Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência inicial. B: Fluorescência final, após 10 minutos da administração de glibenclamida 100  $\mu$ M. Aumento 400x.

A glibenclamida demonstrou um efeito robusto na indução da despolarização do potencial de repouso da membrana em neurônios nociceptivos, nas concentrações 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M administradas, conforme mostra a Figura 5. A avaliação quantitativa das respostas celulares revelou que todas as concentrações testadas deste agente farmacológico promoveram um aumento expressivo na fluorescência do DIBAC<sub>4</sub>(3),

evidenciando de maneira inequívoca o processo de despolarização da membrana neuronal.

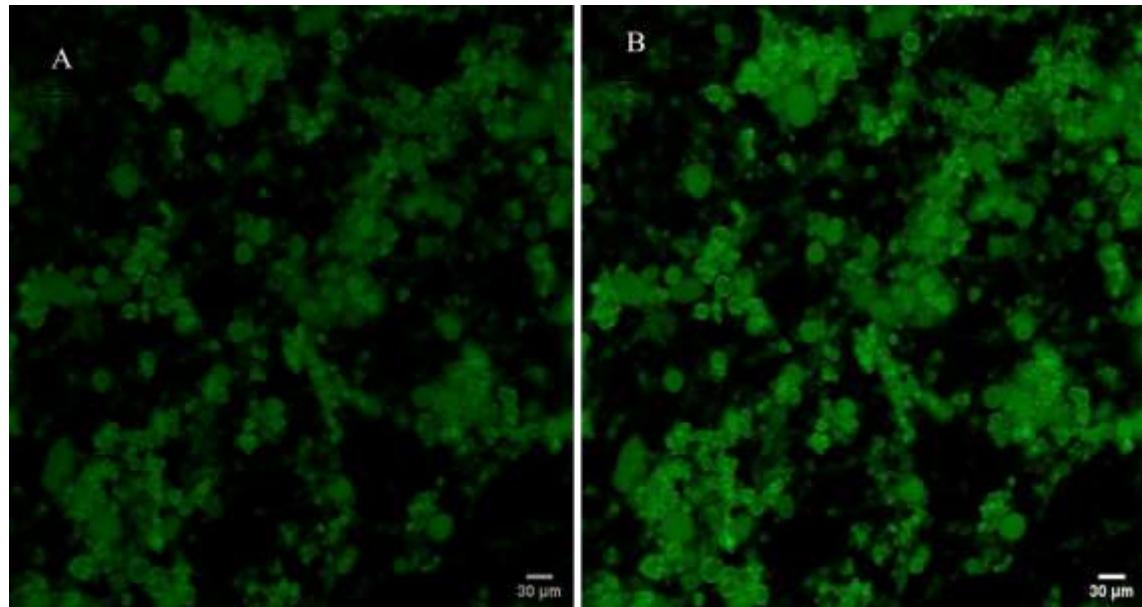


**Figura 5: Efeito da glibenclamida no potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos em cultura.** É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's após administração de glibenclamida nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M de 31 a 125 neurônios.\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

Os valores máximos de variação na fluorescência, diretamente atribuídos à ação da glibenclamida, foram mensurados da seguinte forma: para a concentração de 1  $\mu\text{M}$ , observou-se um acréscimo de  $\pm 0,196323$ ; para 10  $\mu\text{M}$ , registrou-se um valor de  $\pm 0,286196$ ,  $p < 0.05$ ; e para 100  $\mu\text{M}$ , verificou-se uma alteração de  $\pm 0,229479$ ,  $p < 0.05$ . Em contraposição, a administração do veículo (5% de DMSO em solução Hanks/Hepes) não induziu modificações significativas na fluorescência, apresentando um valor de  $\pm 0,0583911$ , o que corrobora sua neutralidade no contexto experimental estabelecido.

O resultado mostrou que a glibenclamida nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , age como inibidor do canal de  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , o que resultou em forte despolarização, como observado pelo aumento da fluorescência emitidos por DiBAC4(3), independente da concentração utilizada.

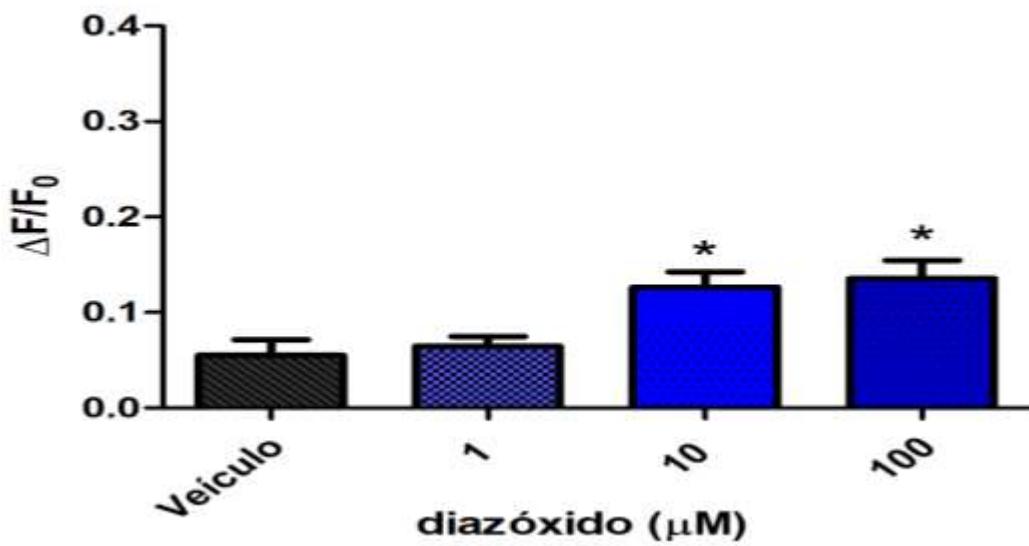
Para examinar o papel dos canais de  $K_{ATP}$ , aplicamos nas culturas de células diazóxido nas seguintes concentrações: 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, visto que este age de forma seletiva nos canais de  $K_{ATP}$  causando sua abertura.



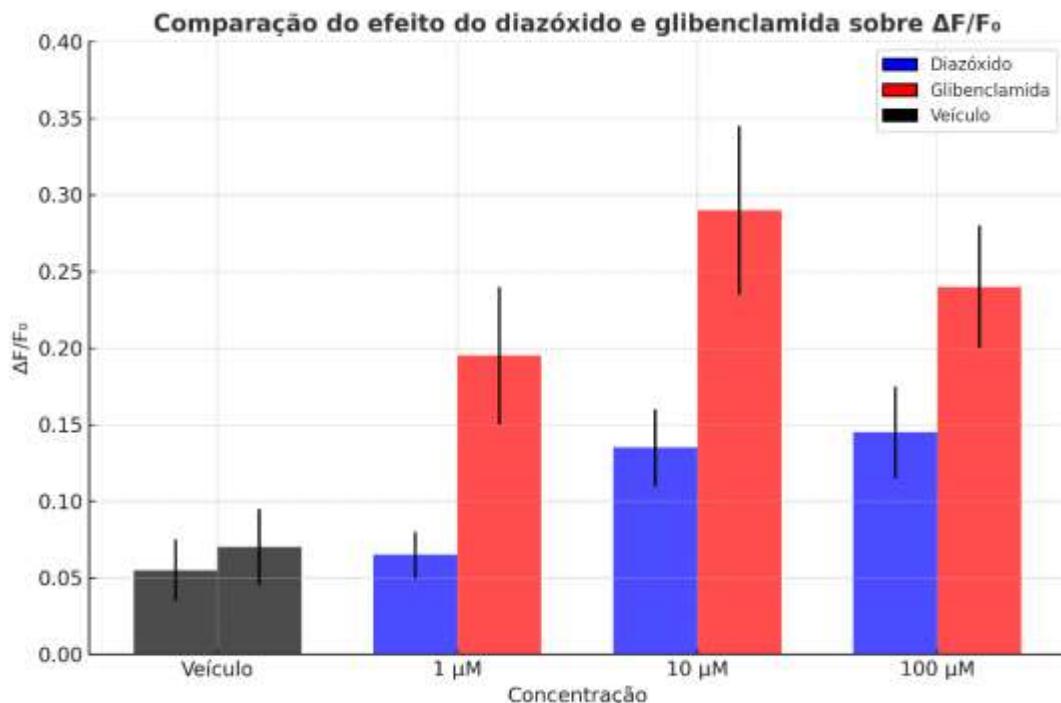
**Figura 6: Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal.** Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC4(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência basal (inicial). B: Fluorescência final, após 10 minutos da administração de diazóxido 100 $\mu$ M. Aumento 400x.

O tratamento com diazóxido revelou um efeito inesperado, evidenciado por uma resposta celular caracterizada pelo aumento da fluorescência, nas concentrações 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, demonstrado na Figura 7, o que sugere um fenômeno de despolarização o que contradiz o esperado que seria redução da fluorescência e uma hiperpolarização.

Contudo, ao confrontar essa resposta com a fluorescência decorrente da despolarização induzida pela glibenclamida na Figura 5, e ao fazermos a comparação entre as duas drogas na Figura 8, observa-se que os valores obtidos com diazóxido são consideravelmente inferiores em todas as concentrações testadas: para 1  $\mu$ M, o valor registrado foi de  $\pm 0,0646443$ ; para 10  $\mu$ M,  $\pm 0,126409$   $p < 0.05$ ; e para 100  $\mu$ M,  $\pm 0,135335$   $p < 0.05$ . Importante ressaltar que o controle experimental, constituído pelo veículo (5% de DMSO em solução Hanks/Hepes), não ocasionou variações significativas na fluorescência, apresentando um valor de  $\pm 0,0550821$ .

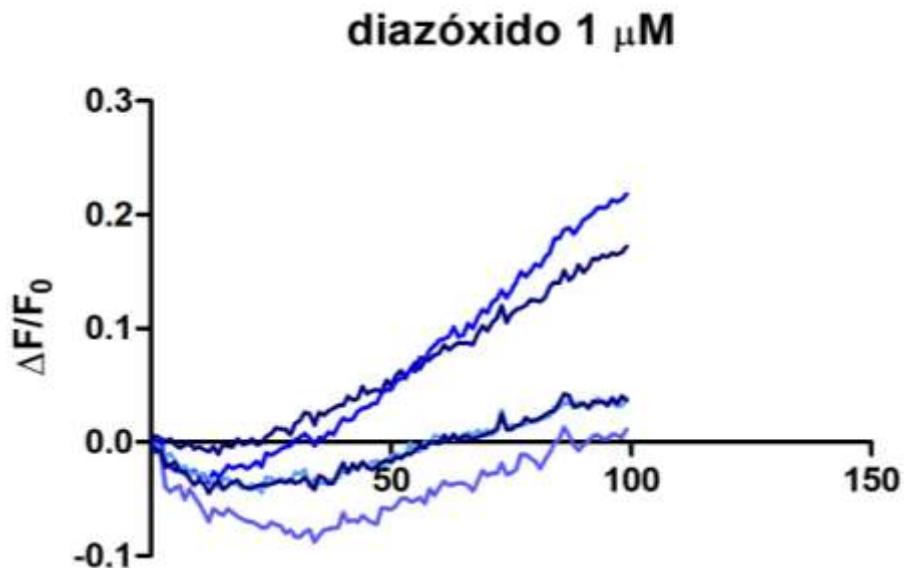


**Figura 7: Efeito do diazóxido no potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos em cultura.** É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's após administração de diazóxido nas concentrações de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M de 31 a 125 neurônios \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni.



**Figura 8: Gráfico comparativo entre glibenclamida e diazóxido.** O gráfico compara a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico, nas diferentes concentrações das drogas 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Os valores obtidos por diazóxido são inferiores ao da glibenclamida.

Inicialmente, não se esperava esse resultado de despolarização, já que o diazóxido, conforme mencionado anteriormente, ativa a abertura dos canais  $K_{ATP}$ . No entanto, a avaliação da resposta ao diazóxido durante os 10 minutos em que as imagens foram realizadas revelou que há uma fase inicial de hiperpolarização do neurônio, seguida pela subsequente despolarização deste conforme se pode observar no gráfico abaixo na Figura 9.



**Figura 9: Efeito do diazóxido (1  $\mu$ M) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico.** O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga.

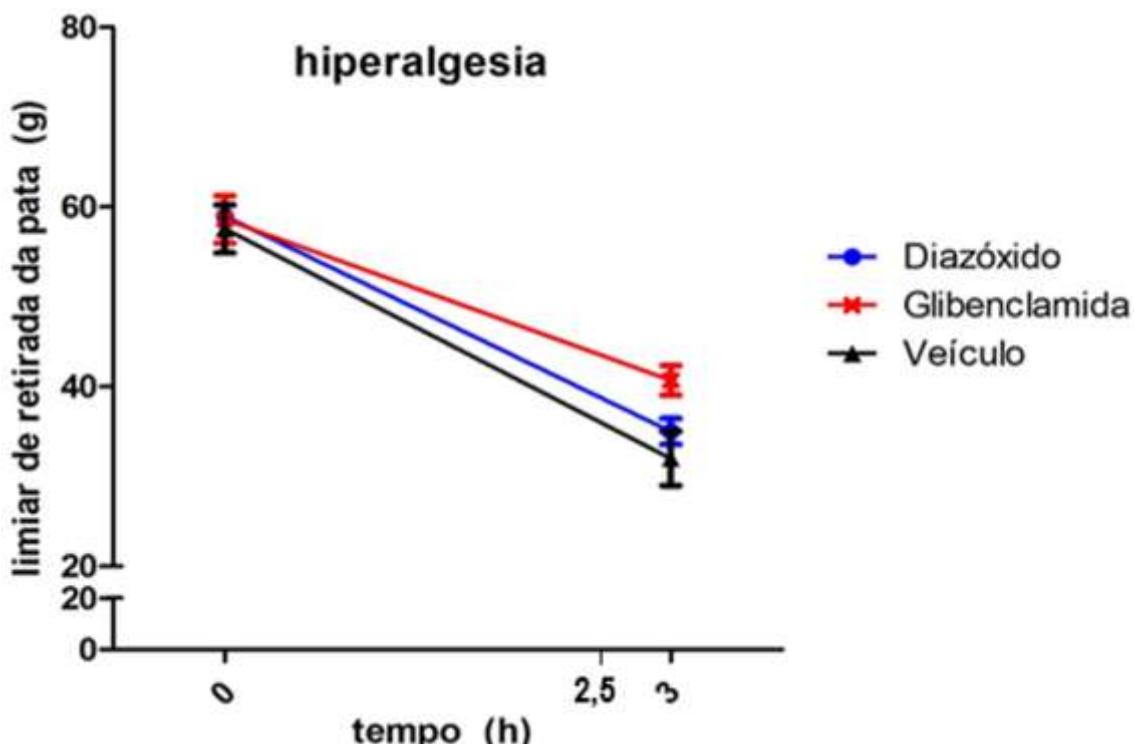
#### 4.2. Experimentos *em vivo*

##### 4.2.1. Teste da hiperalgesia induzida por carragenina:

Com intuito de investigar o efeito da hiperalgesia nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal *in vivo*, medimos os limiares de nocicepção mecânica na pata traseira de ratos submetidos a injeções diretamente no gânglio da raiz dorsal (L5) direito. O teste eletrônico de Von Frey determinou os limites de nocicepção mecânicos da pata traseira direita.

O grau de hipernocicepção foi medido pela diferença na pressão medida antes e depois do experimento, e foi expresso em gramas. O (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP), foi avaliado antes e após 3 horas da administração intraplantar de

carrazenina na concentração (100 µg/ 50 µL). A administração intratecal de veículo (5% de DMSO em 10 µL de salina), glibenclamida (50 µg/ 10 µL) ou diazóxido (50 µg/ 10 µL) por via intratecal ocorreu duas horas e meia após a administração de carrazenina, ou seja, 30 minutos antes da avaliação do (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP). A figura 6 ilustra o impacto imediato de injeções intratecais de glibenclamida, diazóxido na sensibilidade mecânica no início e após as 3 horas.



**Figura 10: Teste de hiperalgesia induzida por carrazenina.** O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado após 3h, da administração intratecal de veículo (5% de DMSO em 10 µL de salina), glibenclamida (50 µg/ 10 µL) ou diazóxido (50 µg/ 10 µL), mediante uma injeção intraplantar subcutânea de carrazenina (100 µg/50 µL). Dados mostrados como média ± EPM (n=6) dados comparados por ANOVA no tempo de 3 horas, não houve diferença significativa. \* p<0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

Podemos observar que no geral houve uma redução no limiar de sensibilidade mecânica em todos os grupos. Notou-se um aumento da hiperalgesia inflamatória induzida pela carrazenina em todos os grupos, todavia não tivemos um impacto significativo no efeito da carrazenina, conforme podemos observar na figura 10.

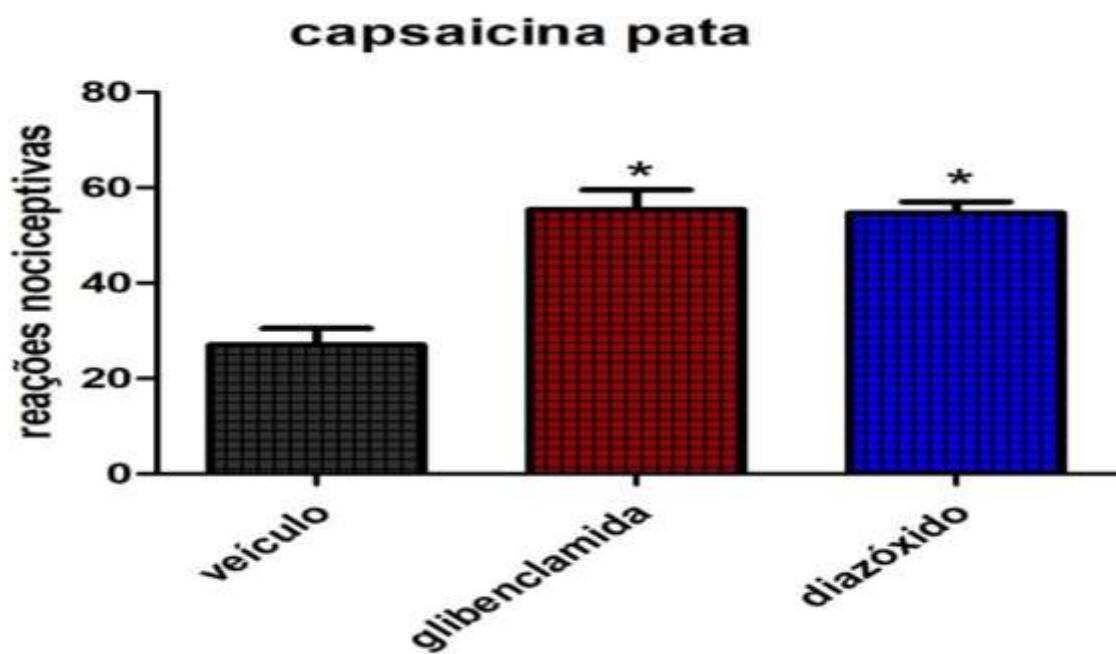
#### 4.2.2. Teste de nocicepção induzido por capsaicina:

A capsaicina, inicialmente, estimula os neurônios sensoriais, resultando em

sensação de dor, queimação e vasodilatação (JANCSÓ & SÁNTHA, 2015). A capsaicina foi usada para medir a dor direta nos neurônios, sem a necessidade de inflamação. Este estudo investigou se a nocicepção provocada pela capsaicina poderia ser influenciada pela glibenclamida e pelo diazóxido ácido.

As reações nociceptivas foram avaliadas durante 5 minutos após administração de capsaicina de 50  $\mu$ l contendo 10  $\mu$ g de capsaicina (em NaCl 0,9% contendo 5% de DMSO. Foi registrado o número de sacudidas ou lambidas da pata (reações nociceptivas). A injeção intratecal de veículo (5% de DMSO em 10  $\mu$ L de salina), glibenclamida (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) ou diazóxido (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) por via intratecal foi realizado 30 minutos antes da injeção de capsaicina na pata dos animais.

Como resultado, observamos o aumento da intensidade da hiperalgesia provocada pela capsaicina, tanto na glibenclamida quanto no diazóxido, conforme demonstrado na figura 11.



**Figura 11: Teste de nocicepção induzida por capsaicina.** As reações nociceptivas foram avaliadas durante 5 minutos após administração de capsaicina de 50  $\mu$ l contendo 10  $\mu$ g de capsaicina (em NaCl 0,9% contendo 5% de DMSO. Foi registrado o número de sacudidas ou lambidas da pata (reações nociceptivas). A injeção intratecal de veículo (5% de DMSO em 10  $\mu$ L de salina), glibenclamida (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) ou diazóxido (50  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) por via intratecal foi realizado 30 minutos antes da injeção de capsaicina na pata dos animais. Dados mostrados como média  $\pm$  EPM (n=6) \* p<0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

## 5. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, analisou-se o impacto imediato, agudo da glibenclamida e do diazóxido nos neurônios nociceptivos de ratos. Foram avaliados os efeitos sobre a nocicepção aguda, a hiperalgesia inflamatória e sobre o potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos primários em cultura. Os resultados apoiam a noção de que a glibenclamida exerce um impacto direto nos neurônios nociceptivos, resultando na despolarização da membrana, por meio do fechamento dos canais de potássio  $K_{ATP}$ , conforme sugerido por outros estudos (DU *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2007, DE CAMPOS LIMA, 2019; ZHANG *et al.*, 2024).

Os achados deste trabalho evidenciam a importância dos canais de potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) na regulação da excitabilidade de neurônios nociceptivos primários, tanto em ambientes *in vitro* quanto *in vivo*. Entender tais sistemas é essencial para esclarecer processos fisiopatológicos ligados à dor, particularmente em situações como a neuropatia diabética, onde a disfunção desses canais tem sido frequentemente associada (DE CAMPOS LIMA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2022).

O resultado dos estudos *in vitro* com o marcador fluorescente DiBAC4(3), conforme observado na figura 5, indicaram que a glibenclamida, um bloqueador seletivo dos canais  $K_{ATP}$ , causou despolarização da membrana neuronal nas doses avaliadas de 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . Esta descoberta é consistente com pesquisas recentes que explicam a ação da glibenclamida, de que, ao bloquear os canais  $K_{ATP}$ , há a diminuição da entrada de  $K^+$ , resultando na despolarização e no aumento da excitabilidade neuronal (DU *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2021; ZHANG Y. *et al.*, 2023). A despolarização observada reforça a ideia de que os canais  $K_{ATP}$  funcionam como moduladores negativos da excitabilidade neuronal, preservando o potencial de repouso e restringindo a reação a estímulos nociceptivos (KACZMAREK & ZHANG, 2017; GAO *et al.*, 2023).

Em contrapartida, o resultado da utilização do diazóxido conforme figura 7, que é um ativador, provoca a abertura dos canais  $K_{ATP}$ , exibiu um efeito de duas fases: uma hiperpolarização inicial seguida de despolarização. Este fenômeno indica a ativação de mecanismos de compensação, como a abertura de canais de cálcio ou sódio dependentes de voltagem, como reação à hiperpolarização inicial (GIRARD *et al.*, 2023; PATEL *et*

*et al.*, 2022). Pesquisas recentes sugerem que a modulação dos canais K<sub>ATP</sub> pode estar ligada a processos de sinalização secundários, como a ativação de receptores ligados à proteína G (GPCRs) e o controle da fosforilação de proteínas quinases (WANG *et al.*, 2021; VANDEWAUW *et al.*, 2023). Essa complexidade destaca a importância de que estudos posteriores, mais detalhados a respeito dos processos moleculares que influenciam a resposta bifásica ao diazóxido, sejam realizados.

Nos experimentos *in vivo*, a administração intratecal de glibenclamida e diazóxido percebidos na figura 10, demonstrou efeitos variados em modelos de dor inflamatória e nocicepção química. No modelo de hiperalgesia induzida por carragenina, a administração espinhal de glibenclamida ou diazóxido não provocaram alterações detectáveis. Estes achados parecem contradizer resultados de outros estudos que indicam que a ativação de canais K<sub>ATP</sub> resulta em analgesia, estando envolvida no efeito analgésico periférico de opioides, dipirona, entre outros (CUNHA *et al.*, 2010; DOUCETTE *et al.*, 2021; KLEIN *et al.*, 2023; QIAN *et al.*, 2016). Tal discrepância possivelmente se deve à diferença nas vias de administração dos moduladores de canais K<sub>ATP</sub>.

Em nosso estudo, utilizamos a administração por via intratecal. Substâncias administradas por via intratecal atingem a medula espinhal, onde ocorrem as sinapses entre neurônios nociceptivos primários e secundários, mas também atingem os gânglios da raiz dorsal, onde são encontrados os corpos celulares dos neurônios nociceptivos primários, os nociceptores (JOUKAL *et al.*, 2016; FERRARI *et al.*, 2014). A intenção ao utilizar esta via de administração foi de modular a ativação dos canais K<sub>ATP</sub> neuronais, evitando um possível efeito local, em outras células envolvidas na resposta inflamatória. Nos estudos anteriores realizados por outros autores, a glibenclamida ou diazóxido foi sempre administrada localmente, na pata dos animais (DU *et al.*, 2011; RODRIGUES & DUARTE, 2000). É possível que os canais K<sub>ATP</sub> estejam envolvidos na modulação local do potencial de repouso da membrana, afetando a transdução do estímulo nociceptivo em potenciais de ação. Tal hipótese deverá ser testada em estudos posteriores. Além disso, por se tratar de um projeto-piloto, foi utilizado uma única concentração das drogas para os experimentos tanto com a glibenclamida (50 µg em 10 µL) quanto com o diazóxido (50 µg em 10 µL). A administração de diferentes doses pode ser necessária para que possamos extrair conclusões mais assertivas.

Diferente do que foi observado no experimento para avaliação do papel dos canais  $K_{ATP}$  na hiperalgesia inflamatória, no experimento com capsaicina, para avaliação da nocicepção aguda, examinado na figura 11, a glibenclamida e o diazóxido intensificaram a resposta nociceptiva. A principal ação da capsaicina é ativar o receptor TRPV1, os quais são característicos de fibras C nociceptivas. A ativação do receptor TRPV1 despolariza intensamente os neurônios nociceptivos. Neste cenário, o aumento da despolarização provocado pela glibenclamida parece intensificar a resposta. O efeito da administração de diazóxido novamente parece contraditório, visto que a abertura de canais  $K_{ATP}$  deveria resultar em hiperpolarização da membrana e redução da nocicepção. A explicação para esta contradição pode estar relacionada ao efeito observado nos experimentos *in vitro* no qual verificamos que ao inicialmente hiperpolarizar a membrana, pode ativar mecanismos compensatórios que elevam a excitabilidade (ZHANG *et al.*, 2023; LEE *et al.*, 2023).

É interessante notar que as mesmas dosagens de glibenclamida e diazóxido que não afetaram a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina afetaram a nocicepção induzida por capsaicina. Tanto o aumento de sensibilidade mecânica ao estímulo inflamatório quanto a nocicepção induzida por capsaicina são eventos que ocorrem especificamente em nociceptores associados a fibras C (AHGREN *et al.*, 1997; JULIUS, 2013). Entretanto, a administração de capsaicina ativa seletivamente os receptores TRPV1, que são receptores térmicos sensíveis a calor, e que não estão envolvidos na transdução de estímulos mecânicos. Deste modo, podemos sugerir que a atividade de canais  $K_{ATP}$  esteja relacionada à ativação dos receptores TRPV1. Esta hipótese está em consonância com pesquisas que evidenciam uma interação funcional entre os canais  $K_{ATP}$  e TRPV1 em neurônios sensoriais (LIU *et al.*, 2022). Novamente, mais experimentos são necessários e podem ajudar a esclarecer a participação dos canais  $K_{ATP}$  na modulação da dor e da hiperalgesia.

Os dados obtidos nesta pesquisa podem ter relevância significativa para o entendimento da neuropatia diabética, uma condição marcada por dor crônica e hiperexcitabilidade neuronal. Em situações de hiperglicemia, a diminuição da atividade dos canais  $K_{ATP}$  devido ao crescimento da relação ATP/ADP pode resultar na despolarização persistente dos neurônios nociceptores, contribuindo para a hiperalgesia e a dor neuropática (DE CAMPOS LIMA *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2023). Além disso, a

glibenclamida é um medicamento frequentemente usado no tratamento do diabetes e alguns estudos sugerem que o tratamento com glibenclamida pode estar associado a um maior risco de desenvolvimento de neuropatia diabética (LIU *et al.*, 2022; PABBIDI *et al.*, 2020). Bem como, diversos estudos mostram que a metformina é superior à glibenclamida em diversos aspectos como: controle glicêmico, segurança materno-fetal no diabetes gestacional, perfil metabólico em diabetes tipo 2 e melhor perfil lipídico. Portanto, a metformina deve ser preferida em relação à glibenclamida quando ambas as opções estiverem disponíveis (BODIER *et al.*, 2025; BALSELLS *et al.*, 2015; RAINS *et al.*, 1988; MERKHA, 2023).

Em contrapartida, agonistas de canais  $K_{ATP}$ , como o diazóxido, surgem como potenciais candidatos para o tratamento da dor neuropática. Porém, os resultados desta pesquisa indicam que a efetividade dessas intervenções pode ser influenciada pelo contexto fisiopatológico e pela interação com outras vias de sinalização (GIRARD *et al.*, 2023; WANG X. *et al.*, 2023). Pesquisas recentes ressaltam a relevância de criar agonistas mais direcionados aos canais  $K_{ATP}$  em neurônios nociceptivos, com o objetivo de reduzir efeitos adversos e potencializar a eficácia analgésica (WANG *et al.*, 2021; ZHANG Y. *et al.*, 2023).

Em resumo, os dados obtidos neste estudo sugerem um papel relevante dos canais  $K_{ATP}$  na modulação do potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos primários e na nocicepção e aponta para a necessidade de mais experimentos que nos permitam uma melhor compreensão dos efeitos de drogas que afetam os canais  $K_{ATP}$  sobre a sensibilidade dolorosa e a hiperalgesia.

## 6. CONCLUSÃO

1 – A administração de glibenclamida produz despolarização do potencial de repouso de neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal, sugerindo um papel dos canais  $K_{ATP}$  na excitabilidade destes neurônios.

2 – A administração de diazóxido produziu uma breve hiperpolarização, seguida de despolarização dos neurônios nociceptivos em cultura, reforçando a participação de canais  $K_{ATP}$  na modulação do potencial de repouso e indicando que existem mecanismos compensatórios que podem ser ativados quando canais  $K_{ATP}$  são ativados.

3 – A administração intratecal de glibenclamida ou diazóxido não afetaram a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina na pata de ratos. Em conjunto com os resultados de outros autores, este resultado indica que talvez canais  $K_{ATP}$  localizados nas terminações nervosas sejam mais relevantes na modulação da hiperalgesia inflamatória.

4 – A administração intratecal de glibenclamida ou diazóxido provocaram um aumento da resposta nociceptiva por injeção intraplantar de capsaicina, sugerindo uma possível interação entre os receptores TRPV1 e a atividade de canais  $K_{ATP}$ .

Futuras pesquisas devem explorar:

1. Mecanismos moleculares subjacentes à interação entre canais  $K_{ATP}$  e outros canais iônicos (e.g., TRPV1, canais de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ ).
2. Efeitos em modelos crônicos de dor, como neuropatia diabética induzida por estreptozotocina, para avaliar a eficácia terapêutica de agonistas  $K_{ATP}$  a longo prazo.
3. Desenvolvimento de fármacos mais seletivos, como moduladores alostéricos dos canais  $K_{ATP}$ , para reduzir efeitos compensatórios indesejados.

## 7. REFERÊNCIAS

1. AHLGREN, S. C.; WANG, J. F.; LEVINE, J. D. C-fiber mechanical stimulus-response functions are different in inflammatory versus neuropathic hyperalgesia in the rat. *Neuroscience*, v. 76, n. 1, p. 285-290, jan. 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00290-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00290-4). Acesso em: 27 abr. 2025.
2. AVSHALUMOV, M., CHEN, B., KOOS, T., TEPPER, J., & RICE, M. (2005). Endogenous Hydrogen Peroxide Regulates the Excitability of Midbrain Dopamine Neurons via ATP-Sensitive Potassium Channels. *The Journal of Neuroscience*, 25, 4222 - 4231. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4701-04.2005>.
3. BALSELLS, M. et al. Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The BMJ*, v. 350, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.h102>. Acesso em: 27 abr. 2025.
4. BENDER, I. (2000). Pulpal pain diagnosis--a review. *Journal of endodontics*, 26 3, 175-9. <https://doi.org/10.1097/00004770-200003000-00012>.
5. BASBAUM, A.; BAUTISTA, D.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Mecanismos celulares e moleculares da dor. *Cell*, v. 139, p. 267-284, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>. Acesso em: 7 abr. 2025.
6. BODIER, L. et al. Efficacy and safety of pharmacological treatments for gestational diabetes: a systematic review comparing metformin with glibenclamide and insulin. *Diabetes & Metabolism*, v. 101622, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2025.101622>. Acesso em: 27 abr. 2025.
7. BÖLCSKEI, K. et al. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*, v. 117, p. 368-376, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.024>. Acesso em: 27 abr. 2025.
8. CHEN, L. et al. KATP channels in nociceptors: New targets for pain control. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 22, n. 5, p. 275-291, 2021. DOI: [10.1038/s41583-021-00442-w](https://doi.org/10.1038/s41583-021-00442-w). Acesso em: 1 abr. 2025.
9. COETZEE, W. (2013). Multiplicity of effectors of the cardioprotective agent, diazoxide. *Pharmacology & therapeutics*, 140 2, 167-75. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.007>.
10. CUNHA, T. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C. M.; DUARTE, H. L.; SOUZA, G. R.; VERRI, W. A. Jr.; FUNEZ, M. I.; DIAS, Q. M.; SCHIVO, I. R.; DOMINGUES, A. C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M. M.; HOTHERSALL, J. S.; CRUZ, J. S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K $\gamma$ /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 9, p. 4442-4447, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0914733107>. Acesso em: 1 abr. 2025.

11. CUNHA, T. M.; SOUZA, G. R.; DOMINGUES, A. C.; CARREIRA, E. U.; LOTUFO, C. M.; FUNEZ, M. I.; VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K $\gamma$ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Molecular Pain*, v. 8, p. 1-8, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-10>. Acesso em: 1 mar. 2025.
12. DOUCETTE, A. et al. 15727 KATP channel prodrugs as therapeutics for chronic pain and substance abuse disorders. *Journal of Clinical and Translational Science*, v. 5, p. 8-8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/cts.2021.422>. Acesso em: 1 mar. 2025.
13. DE CAMPOS LIMA, T. de et al. Hyperglycemia induces mechanical hyperalgesia and depolarization of the resting membrane potential of primary nociceptive neurons: Role of ATP-sensitive potassium channels. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 401, p. 55-61, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.03.025>. Acesso em: 7 abr. 2025.
14. DE CAMPOS LIMA, T. de; OLIVEIRA SANTOS, D. de; MONTEIRO DA CRUZ LOTUFO, C. Chapter 13: ATP-sensitive potassium channels in pain and analgesia. In: RAJENDRAM, R. et al. (Ed.). *The Neurobiology, Physiology, and Psychology of Pain*. Academic Press, 2022. p. 139-149. ISBN 9780128205891. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820589-1.00009-9>. Acesso em: 7 abr. 2025.
15. DI MAIO, G. et al. Mechanisms of transmission and processing of pain: A narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 20, n. 4, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph20043064>. Acesso em: 31 mar. 2025.
16. DUBIN, A.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI42843>. Acesso em: 7 abr. 2025.
17. DU, X.; WANG, C.; ZHANG, H. Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. *Molecular Pain*, v. 7, p. 35, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-35>. Acesso em: 7 abr. 2025.
18. DU, X.; GAMPER, N. Potassium Channels in Peripheral Pain Pathways: Expression, Function and Therapeutic Potential. *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 6, p. 621-640, 2013. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570159X113119990042>. Acesso em: 31 mar. 2025.
19. FERRANTE, F. (1999). Recent Advances in Anaesthesia and Analgesia. *Regional Anesthesia & Pain Medicine*, 24, 489 - 489. <https://doi.org/10.1136/RAPM-00115550-199924050-00033>. Acesso em: 31 mar. 2025.
20. FERRARI, L. F. et al. A novel technique to perform direct intraganglionar

- injections in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, n. 2, p. 236-243, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.025>. Acesso em: 21 mar. 2025.
21. GARLID, K., PAUCEK, P., YAROV-YAROVOY, V., MURRAY, H., DARBENZIO, R., D'ALONZO, A., LODGE, N., SMITH, M., & GROVER, G. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation research*, 81 6, 1072-82. <https://doi.org/10.1161/01.RES.81.6.1072>. Acesso em: 31 mar. 2025.
22. GAO, R. et al. Diabetic neuropathy and KATP channel dysfunction. **Science Translational Medicine**, v. 15, n. 684, p. eabq2186, 2023. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq2186>. Acesso em: 02 mar. 2025.
23. GIRARD, M. et al. GPCR-mediated modulation of KATP channels in nociceptive neurons: Implications for neuropathic pain. **Pain Research and Management**, v. 2023, p. 1-12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/1234567>. Acesso em: 21 fev. 2025.
24. GINIATULLIN, R. Ion channels of nociception. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21103553>. Acesso em: 7 fev. 2025.
25. HAANPÄÄ, M. et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 14-27, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.031>. Acesso em: 7 fev. 2025.
26. JANCSÓ, G.; SÁNTHA, P. The foundation of sensory pharmacology: Nicholas (Miklós) Jancsó and the Szeged contribution. **Temperature (Austin)**, v. 2, n. 2, p. 152-157, 26 maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1045683>. Acesso em: 10 abr. 2025.
27. JI, R. R. et al. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. **Anesthesiology**, v. 129, n. 2, p. 343-366, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>. Acesso em: 7 abr. 2025.
28. JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 355-384, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833>. Acesso em: 13 abr. 2025.
29. KACZMAREK, L. K.; ZHANG, Y. Kv3 channels: enablers of rapid firing, neurotransmitter release, and neuronal endurance. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 4, p. 1431-1468, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2017>. Acesso em: 02 abr. 2025.
30. KAWANO, T. et al. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. **Molecular Pain**, v. 5, p. 12, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-12>. Acesso

em: 7 abr. 2025.

31. KIM, J.H. et al. TRPV1-KATP cross-talk in pain pathways. *Neuron*, v. 111, n. 3, p. 412-428, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.013>. Acesso em: 22 abr. 2025.
32. KENNEDY, H. J. et al. Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells: potential role for strategically located mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 19, p. 13281–13291, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13281>. Acesso em: 22 abr. 2025.
33. KHAN, A.; KHAN, S.; KIM, Y. Insight into pain modulation: nociceptors sensitization and therapeutic targets. *Current Drug Targets*, v. 20, n. 7, p. 775-788, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138945012066190131114244>. Acesso em: 23 abr. 2025.
34. KLEIN, A. et al. KATP channel prodrugs reduce hypersensitivity in neuropathic and inflammatory pain models, morphine-induced hypersensitivity, and reduce withdrawal behaviors in mice. ASPET 2023 Annual Meeting Abstract - Central Nervous System Pharmacology - Behavioral, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.122.166400>. Acesso em: 27 abr. 2025.
35. KOLLARIK, M.; UNDEM, B. Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1– mice. *The Journal of Physiology*, v. 555, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.054890>. Acesso em: 27 abr. 2025.
36. KOZLOWSKI, R., HALES, C., & ASHFORD, M. (1989). Dual effects of diazoxide on ATP-K<sup>+</sup> currents recorded from an insulin-secreting cell line. *British Journal of Pharmacology*, 97. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb12560.x>. Acesso em: 31 mar. 2025.
37. LAI, J. et al. Canais de sódio e hiperalgesia de tensão. *Revisão Anual da Farmacologia e da Toxicologia*, v. 44, p. 371-397, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.44.101802.121627>. Acesso em: 7 abr. 2025.
38. LEE, J. H. et al. Effect of hyperglycemia on pain threshold in alloxan-diabetic rats. *Pain*, v. 40, n. 1, p. 105-107, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90218-6). Acesso em: 7 abr. 2025.
39. LEE, K.; CHEN, J.; MACKINNON, R. Molecular structure of human KATP in complex with ATP and ADP. *eLife*, v. 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/199034>. Acesso em: 7 abr. 2025.
40. LEE, S. et al. Single-cell analysis of KATP channels in DRG neurons. *Cell Reports*, v. 42, n. 2, p. 112058, 2023. DOI: [10.1016/j.celrep.2023.112058](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112058). Acesso em: 22 abr. 2025.

41. LIU, D., PITTA, M., LEE, J., RAY, B., LAHIRI, D., FURUKAWA, K., MUGHAL, M., JIANG, H., VILLARREAL, J., CUTLER, R., GREIG, N., & MATTSON, M. (2010). The KATP channel activator diazoxide ameliorates amyloid- $\beta$  and tau pathologies and improves memory in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 22 2, 443-57. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101017>. Acesso em: 31 mar. 2025.
42. LIU, Y. et al. Dysregulation of KATP channels in diabetic neuropathy: Mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 1-15, 2022. DOI: [10.3389/fphar.2022.876543](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.876543). Acesso em: 25 abr. 2025.
43. LUO, C.; KUNER, T.; KUNER, R. Plasticidade sináptica em dor patológica. *Tendências em Neurociências*, v. 37, p. 343-355, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.04.002>. Acesso em: 7 abr. 2025.
44. LUU, W. et al. Modulation of SUR1 KATP channel subunit activity in the peripheral nervous system reduces mechanical hyperalgesia after nerve injury in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 9, p. 2251, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20092251>. Acesso em: 06 abr. 2025.
45. MACIVER, M., & TANELIAN, D. (1992). Activation of C fibers by metabolic perturbations associated with tourniquet ischemia.. *Anesthesiology*, 76 4, 617-23. <https://doi.org/10.1097/00000542-199204000-00020>. Acesso em: 31 mar. 2025.
46. MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. Pain mechanisms and management: a central perspective. *The Clinical Journal of Pain*, v. 16, n. 3, supl., p. S144-S156, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1097/00002508-200009001-00006>. Acesso em: 7 mar. 2025.
47. MATSUMOTO, N., KOMIYAMA, S., & AKAIKE, N. (2002). Pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *The Journal of Physiology*, 541. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.018267>. Acesso em: 31 mar. 2025.
48. MCDOWELL, T. Peripheral mechanisms of pain transmission and modulation. *Pain*, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-99124-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-99124-5_9). Acesso em: 7 abr. 2025.
49. MERKHAN, M. Effect of metformin, glibenclamide and insulin on lipid profile in type 2 diabetic patients. *Tikrit Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.25130/tjphs.2013.9.2.9.262.269>. Acesso em: 27 abr. 2025.
50. MESTRE, C.; PÉLISSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. *A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 32, n. 4, p. 197–200, dez. 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1056-8719(94)90087-6). Acesso em: 31 mar. 2025.
51. MILLAN, M. The induction of pain: an integrative review. *Progress in*

*Neurobiology*, v. 57, p. 1-164, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3). Acesso em: 7 abr. 2025.

52. MIKI, T.; NAGASHIMA, K.; SEINO, S. The structure and function of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 22, n. 2, p. 113–123, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1677/jme.0.0220113>. Acesso em: 05 abr. 2025.
53. MITCHELL, K. et al. Nociception and inflammatory hyperalgesia evaluated in rodents using infrared laser stimulation after Trpv1 gene knockout or resiniferatoxin lesion. *Pain* v. 155, p. 733-745, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.01.007>. Acesso em: 27 abr. 2025.
54. NEWMAN-LINDSAY S, LAKSHMINRUSIMHA S, SANKARAN D. Diazoxide for Neonatal Hyperinsulinemic Hypoglycemia and Pulmonary Hypertension. *Children (Basel)*. 2022 Dec 21;10(1):5.DOI: <https://doi.org/10.3390/children10010005>. PMID: 36670556; PMCID: PMC9856357.
55. OCAÑA, M. et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, n. 1-3, p. 203-219, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.026>. Acesso em: 7 abr. 2025.
56. OLIVEIRA, L.M. Dores. In: LENT, R. (Org.). *Neurociência da Mente e do Comportamento*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 8, p. 183-201.
57. ØRSTAVIK, K., WEIDNER, C., SCHMIDT, R., SCHMELZ, M., HILLIGES, M., JØRUM, E., HANDWERKER, H., & TOREBJÖRK, E. (2003). Pathological C-fibres in patients with a chronic painful condition. *Brain: a journal of neurology*, 126 Pt 3, 567-78. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWG060>.
58. PATEL, M.K. et al. Compensatory mechanisms in KATP channel modulation. *Journal of Physiology*, v. 600, n. 11, p. 2563-2578, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/JP282456>.
59. QIAN, L.; SHEN, S.; CHEN, J.; JI, L.; CAO, S. Peripheral KATP activation inhibits pain sensitization induced by skin/muscle incision and retraction via the nuclear factor-κB/c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, v. 14, n. 3, p. 2632-2638, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5546>. Acesso em: 27 abr. 2025.
60. RAINS, S. et al. The effect of glibenclamide and metformin on serum lipoproteins in type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, v. 5, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1988.tb01074.x>. Acesso em: 27 abr. 2025.
61. RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020. Disponível em:

- <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>. Acesso em: 7 abr. 2025.
62. RODRIGUES, A. R.; DUARTE, I. D. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *British Journal of Pharmacology*, v. 129, n. 1, p. 110-114, jan. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703038>. Acesso em: 27 abr. 2025.
63. SANTOS, G. G. dos; DIAS, E. V.; TEIXEIRA, J. M.; ATHIE, M. C. P.; BONET, I. J. M.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. The analgesic effect of dipyrone in peripheral tissue involves two different mechanisms: neuronal KATP channel opening and CB1 receptor activation. *European Journal of Pharmacology*, v. 741, p. 124–131, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.019>. Acesso em: 08 abr. 2025.
64. SARANTOPOULOS, C. et al. ATP-sensitive potassium channels in rat primary afferent neurons: the effect of neuropathic injury and gabapentin. *Neuroscience Letters*, v. 343, p. 185-189, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00383-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00383-5). Acesso em: 7 abr. 2025.
65. Sellers, E., & Koch-Weser, J. (1969). Protein binding and vascular activity of diazoxide. *The New England journal of medicine*, 281 21, 1141-5. <https://doi.org/10.1056/NEJM196911202812102>.
66. SCHOLZ, J.; WOOLF, C. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, v. 5, supl. 1, p. 1062-1067, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn942>. Acesso em: 7 abr. 2025.
67. TRACEY, D. Nociception. *Current Biology*, v. 27, p. R129-R133, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.037>. Acesso em: 31 mar. 2025.
68. VERKEST, C. et al. Migraine and two-pore-domain potassium channels. *The Neuroscientist*, v. 27, n. 3, p. 268–284, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1177/1073858420940949>. Acesso em: 31 mar. 2025.
69. VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 3, p. 391-399, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300017>. Acesso em: 02 mar. 2025.
70. VANDEWAUW, I. et al. TRPM3 as a downstream effector of KATP channels. *Pain*, v. 164, n. 1, p. e45-e59, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002763>. Acesso em: 27 abr. 2025.
71. WANG, S. et al. Controllable radical polymerization of TEMPO redox for stable and sensitive enzyme electrode interface. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 177, p. 116417, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116417>. Acesso em: 7 abr. 2025.
72. WOOLF, C.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R. Peripheral nerve injury

- triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, v. 355, p. 75-78, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/355075A0>. Acesso em: 7 abr. 2025.
73. WU, Y. et al. Structural basis of KATP channel modulation. *Science*, v. 377, n. 6609, p. eabq2149, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abq2149>.
74. YAMADA, A. et al. Usefulness and limitation of DiBAC4(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in HEK293 cells. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 86, n. 3, p. 342-350, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1254/jjp.86.342>. Acesso em: 7 abr. 2025.
75. YANG, D. et al. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell Metabolism*, v. 12, n. 2, p. 130-141, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.015>. Acesso em: 27 abr. 2025.
76. YANG, F. et al. Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of TRPV1 ion channel. *Nature Chemical Biology*, v. 11, p. 518-524, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1835>. Acesso em: 27 abr. 2025.
77. YANG, F.; ZHENG, J. Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein & Cell*, v. 8, p. 169-177, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0353-7>. Acesso em: 27 abr. 2025.
78. ZHANG, Y. et al. KATP channels as therapeutic targets for pain. *Annual Review of Pharmacology*, v. 63, p. 229-251, 2023. DOI: [10.1146/annurev-pharmtox-051921-023255](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051921-023255). Acesso em: 27 abr. 2025.
79. ZHANG, J. M. et al. Acute topical application of tumor necrosis factor alpha evokes protein kinase A-dependent responses in rat sensory neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 88, n. 3, p. 1387-1392, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.3.1387>. Acesso em: 7 abr. 2025.
80. ZHANG, Q. et al. A eucromatina histona-lisina N-metiltransferase 2 regula a expressão de subfamília T ativado por potássio-sódio 1 em neurônios sensoriais primários e contribui para a sensibilidade à dor induzida pelo remifentanil. *Boletim de Pesquisa do Cérebro*, v. 212, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.110966>. Acesso em: 7 abr. 2025.
81. ZHOU, S. Y. et al. Inhibition of gastric motility by hyperglycemia is mediated by nodose ganglia KATP channels. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 300, n. 3, p. G394-G400, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00493.2010>. Acesso em: 18 mar. 2025.
82. ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4). Acesso em: 7 abr. 2025.