

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FERNANDO ORIQUES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E DOS EFEITOS
ADVERSOS INDUZIDOS PELA FORMA RECOMBINANTE DA
PROTEÍNA Ph α 1 β EM UM MODELO DE DOR ASSOCIADO AO
CÂNCER**

**CRICIÚMA, SC
JULHO DE 2022**

FERNANDO ORIQUES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E DOS EFEITOS
ADVERSOS INDUZIDOS PELA FORMA RECOMBINANTE DA
PROTEÍNA Ph α 1 β EM UM MODELO DE DOR ASSOCIADO AO
CÂNCER**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Coorientadora: Prof. Dr. Flávia Karine Rigo

CRICIÚMA, SC

JULHO DE 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P436a Pereira, Fernando Oriques.

Avaliação da atividade antinociceptiva e dos efeitos adversos induzidos pela forma recombinante da proteína Ph α 1 β em um modelo de dor associado ao câncer / Fernando Oriques Pereira. - 2022.

46 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Coorientação: Flávia Karine Rigo.

1. Dor do câncer. 2. Dor do câncer -

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

A dissertação foi elaborada seguindo a Resolução 07/2015 do PPGCS será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

A dor é um fenômeno de escala global, sendo considerada como um problema de saúde mundial. A dor relacionada ao câncer é reportada por cerca de 70% dos pacientes, considerada um dos sintomas mais comuns de pessoas afetadas com o câncer, e muito destes pacientes não tem o controle adequado da dor, diminuindo a qualidade de vida e dificultando o tratamento do usuário. Em casos mais graves a dor pode ser incapacitante, impondo um grande investimento econômico dos serviços de saúde para o tratamento. Atualmente as linhas de cuidados para o tratamento da dor relacionada ao câncer, inclui o uso de opioides em associação com outros analgésicos como os antiinflamatórios não esteroides (AINEs). Quando a dor se torna refratária a estes tratamentos se faz necessária à administração intratecal de fármacos, dentre eles, a Ziconotida, um potente bloqueador de canais de cálcio regulados por voltagem (CCRV). Entretanto, estas alternativas terapêuticas possuem diversos efeitos colaterais, bem como o desenvolvimento da tolerância a opioides, o que dificulta o tratamento da dor oncológica, resultando novamente na diminuição da qualidade de vida do paciente. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar o possível efeito antinociceptivo e adversos causados pela administração intravenosa da forma recombinante do peptídeo $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$), que atua como bloqueador de CCRV, em modelo experimental de dor relacionado ao câncer em camundongos tolerantes ou não a morfina. Para avaliar o efeito antinociceptivo foi utilizado o modelo de dor associado ao câncer, que consiste na indução do câncer de melanoma em camundongos C57BL/6, e aplicação da proteína r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$, e avaliação da atividade antinociceptiva por filamentos von Frey. Os efeitos adversos foram avaliados através do teste de rotarod e campo aberto. Como resultado, a administração da r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$ em animais com alodinia mecânica induzida pelo câncer, com ou sem tolerância a morfina, foi capaz de aumentar o limiar mecânico, mostrando que a r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$ possui atividade antinociceptiva. A administração prévia da r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$ conseguiu recuperar a atividade antinociceptiva da morfina em animais tolerantes a este opioide. A r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$ mostrou ser segura, pois não foi observado efeitos adversos relacionados a atividade motora e comportamental após a administração intravenosa. Apesar dos resultados promissores mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos de ação da r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$.

Palavras-chave: Dor, Câncer, $\text{Ph}\alpha 1\beta$, r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$, Analgesia, Morfina

ABSTRACT

Pain is a phenomenon of global scale, being considered a global health problem. Cancer-related pain is reported by about 70% of patients, considered one of the most common symptoms of people affected with cancer, and many of these patients do not have adequate pain control, reducing quality of life and making cancer treatment difficult. In more severe cases, the pain can be disabling, imposing a large economic investment from the health services for the treatment. Currently, the lines of care for the treatment of cancer-related pain include the use of opioids in combination with other analgesics such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). When pain becomes refractory to these treatments, intrathecal administration of drugs is necessary, including Ziconotide, a potent voltage-regulated calcium channel blocker (CCRV). However, these therapeutic alternatives have several side effects, as well as the development of tolerance to opioids, which makes the treatment of cancer pain difficult, resulting again in a decrease in the patient's quality of life. Thus, the present study aimed to evaluate the possible antinociceptive and adverse effects caused by the intravenous administration of the recombinant form of the peptide Ph α 1 β (r-Ph α 1 β), which acts as a CCRV blocker, in an experimental model of cancer-related pain in mice. tolerant or not to morphine. To evaluate the antinociceptive effect, the cancer-associated pain model was used, which consists of the induction of melanoma cancer in C57BL/6 mice, and application of the r-Ph α 1 β protein, and evaluation of the antinociceptive activity by von Frey filaments. Adverse effects were assessed using rotarod and open field testing. As a result, the administration of r-Ph α 1 β in animals with cancer-induced mechanical allodynia, with or without morphine tolerance, was able to increase the mechanical threshold, showing that r-Ph α 1 β has antinociceptive activity. Previous administration of r-Ph α 1 β was able to recover the antinociceptive activity of morphine in animals tolerant to this opioid. r-Ph α 1 β proved to be safe, as no adverse effects related to motor and behavioral activity were observed after intravenous administration. Despite the promising results, further studies are needed to understand the mechanisms of action of r-Ph α 1 β .

Key words: Pain, Cancer, Ph α 1 β , r-Ph α 1 β , Analgesic, Morphine

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeitos adversos da r-Pha1β.....	27
---	-----------

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Avaliação do efeito antinocicepivo da r-Ph α 1 β e morfina.....	25
FIGURA 2 - Avaliação do desenvolvimento da tolerância a morfina.....	28
FIGURA 3 - Avaliação da atividade antinociceptiva em animais com dor associada ao câncer e tolerantes a morfina.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

Aβ	Fibras A-beta
Aδ	Fibras a-delta
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
BPA	Avulsão do plexo braquial
C	Fibras tipo C
CCI	Lesão de constrição crônica, do inglês “Chronic Constriction Injury”
CCRV	Canais para Cálcio Regulado por Voltagem
CFA	Adjuvante completo de Freund, do inglês “Complete freund's adjuvante”
CK	Creatina quinase, do inglês “Creatine Kinase”
CK-MM isoentyme”	Creatina quinase do musculo esquelético, “Creatine Kinase muscle isoentyme”
GFAP	Proteína fibrilar ácida da glia, do inglês “Glial fibrillary acidic protein”
IASP	International Association for the Study of Pain
I.V.	Injeção intravenosa
NGF	Fator de crescimento do nervo, do inglês “Nerve Growth Factor”
OMS	Organização Mundial da Saúde
Phα1β	Proteína Nativa Ph α 1 β do veneno da aranha Phoneutria nigriventer
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês “Reactive Oxygen Species”
RNS	Espécies reativas de nitrogênio, do inglês “Reactive Nitrogen Species”
r-Phα1β	Forma recombinante da Proteína Nativa Ph α 1 β do veneno da aranha Phoneutria nigriventer
S.C.	injeção subcutânea
SDF-1 Factor 1”	Fator 1 derivado de célula estromal, do inglês “Stromal Cell-Derived Factor 1”
SIRT1	Sirtuina 1
SNC	Sistema nervoso central
SNI	Lesão nervosa poupada, do inglês “Spared Nerve Injury”
SNL	Ligação do nervo espinhal, do inglês “Spinal Nerve Ligation”
SNT	Transação do nervo ciático, do inglês “Sciatic Nerve Transaction”
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês “Tumor Necrosis Factor Alpha”

TRPA1 Canal catiônico do potencial transitório anquirina 1, do inglês “Transient Receptor Potential ankyrin 1”

TRP Receptores potenciais transitórios, do inglês “Transient Receptor Potential”

TRPC Receptores potenciais transitórios canônica, do inglês “Transient Receptor Potential canonical”

TRPV Receptores potenciais transitórios vaniloide, do inglês “Transient Receptor Potential vanilloid”

TRPM Receptores potenciais transitórios melastatina, do inglês “Transient Receptor Potential melastatin”

TRPML Receptores potenciais transitórios muculipina, do inglês “Transient Receptor Potential mucolipin”

TRPP Receptores potenciais transitórios policistina, do inglês “Transient Receptor Potential polycystic”

TRPA Receptores potenciais transitórios anquirina, do inglês “Transient Receptor Potential ankyrin”

TRPN Receptores potenciais transitórios mecanorreceptores de potencial C, do inglês “Transient Receptor Potential mechanoreceptor potential C”

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
2 – OBJETIVO	18
2.1 – OBJETIVO GERAL	18
2.2 – OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 ANIMAIS	193
4 – MODELO EXPERIMENTAIS	19
4.1 - MODELO DE DOR ASSOCIADO AO CÂNCER	19
4.2 – MODELO DE TOLERÂNCIA A OPIOIDE	19
4.3 – TESTE DE HIPERALGESIA MECÂNICA POR VON FREY	20
4.4 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA FORMA RECOMBINANTE DA PHA1B NA HIPERALGESIA MECÂNICA ASSOCIADA AO TUMOR	21
5 – PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS	22
5.1 – AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO MOTOR	22
5.2 – AVALIAÇÃO PELO TESTE DE CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)	23
5.3 – AVALIAÇÃO PELO TESTE DE ROTAROD	23

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – DOR

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor, traduzido da língua inglês “International Association for the Study of Pain” (IASP), a definição da dor é descrita como “Uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante aquela associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. O processo doloroso é uma experiência pessoal, que possui característica biológica, psicológica e está ligada a fatores sociais (Trouvin e Perrot, 2019).

A dor é um fenômeno global comum e está associada diversos diagnósticos com impacto significativo na economia de um país, pois o tratamento ineficaz gera custos desnecessários. A dor crônica tem um custo considerável, em um estudo na Austrália, um país com 22,7 milhões de pessoas, o custo anual para o acompanhamento da dor crônica em pacientes, no ano de 2007, foi estimado em 34,3 bilhões de dólares ou \$10.847 por pessoa (Henschke et al., 2015).

A prevalência da dor crônica no Brasil varia entre 23,02% a 76,17% da população estudada, apresentando uma média nacional de 45,59%, sendo o sexo feminino mais afetado por este tipo de dor. A região do centro-oeste do Brasil é onde se concentra a maior prevalência (56,25%) (Aguiar et al., 2021)

A experiência dolorosa atua de forma a proteger o organismo da lesão em potencial ou já instalada, respondendo com o reflexo de retirada, cessando o evento danoso, com a finalidade de proteger a integridade do organismo, funcionando como um mecanismo de sobrevivência (Bourne et al., 2014). De maneira superficial, a fisiologia da dor ocorre através do reconhecimento do estímulo nocivo por receptores, chamados de nociceptores. O estímulo nocivo é aquele que pode provocar dano no tecido, como alta pressão mecânica, temperaturas extremas (<17°C e >43°C em mamíferos), e substâncias químicas como bases e ácidos (Sneddon, 2018).

1.2 – FISIOLOGIA DA DOR

A dor e nocicepção possuem significados diferentes. A dor esta relacionada ao evento de forma consciente, é a sensação da experiência dolorosa perceptível e compreendida pelo sujeito (Ringkamp et al., 2018). A nocicepção é o mecanismo

fisiológico através da ativação dos nociceptores frente a um estímulo nocivo atual ou potencial (Ellison, 2017).

O mecanismo envolvido na percepção da dor pelo indivíduo, constitui quatro etapas: (1) transdução, (2) transmissão, (3) modulação e (4) percepção. A primeira etapa (transdução), ocorre nos terminais dos neurônios aferentes primários (nociceptores), responsáveis por identificar diferentes tipos de estímulos nocivos que conseqüentemente induzem a geração de potencial elétrico através da ativação dos canais de transdução expressos na membrana axonal. Caso o estímulo seja suficiente, será gerado um potencial de ação, promovendo a propagação do estímulo através do sistema nervoso. Durante a transmissão, os nociceptores periféricos que estão localizados nos gânglios da raiz dorsal, transmitem seus impulsos para os neurônios de segunda ordem localizados na medula espinhal, onde são projetados para o tálamo, estruturas do tronco cerebral e diencefalo. Ao final, o tronco cerebral e diencefalo formam os neurônios de terceira ordem, onde são projetados para vários sítios corticais (Ringkamp et al., 2018).

As fibras aferentes primárias que estão localizados na periferia do corpo humano, são classificadas em diferentes tipos de acordo com a sua velocidade de resposta, presença ou não de mielinização e diâmetro das mesmas. Atualmente os nociceptores estão divididos em três categorias: Os nociceptores A-delta ($A\delta$) são de médio calibre (1-5 μm), possuem mielina, conduzem impulsos a 2 a 20m/s (Koltzenburg et al., 1997; Lee e Neumeister, 2020). Os nociceptores A-beta ($A\beta$) são de maior calibre (6-12 μm), mielinizadas, e tem velocidade de condução entre 30 a 70 m/s, são chamados de mecanorreceptores, responsáveis pela transmissão de estímulos não nocivos (Bourne et al., 2014; Sneddon, 2018; Lee e Neumeister, 2020). Os nociceptores do tipo C (C) são de menor calibre (0.02 – 1.5 μm), não mielinizadas, com velocidade de condução < 2 m/s, e são receptores predominantes nos nervos periféricos. Os nociceptores $A\delta$ e C são responsáveis pelo reconhecimento de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos, e podem ser chamados de receptores polimodais (Sneddon, 2018; Lee e Neumeister, 2020).

As terminações dos nociceptores, encontradas nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (especialmente lâminas I e II) apresentam canais para cálcio regulados por voltagem (CCRV) que se abrem em resposta a um potencial de ação, permitindo o influxo de Ca^{2+} , e conseqüentemente liberando

neurotransmissores envolvidos no processamento da dor, como substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato que, por sua vez, irão estimular seus respectivos receptores em neurônios de segunda ordem (Zamponi et al., 2009).

Em relação a sua duração, a dor pode ser classificada em dois grandes grupos, que são a dor aguda e a dor crônica. A dor aguda tem a utilidade de proteger o organismo, respondendo a um estímulo nocivo através do reflexo de retirada, interrompendo a exposição ao agente causador do dano, este tipo de resposta é mediado principalmente pelos nociceptores A δ . A respeito da dor crônica, não há uma utilidade ou benefício para o paciente. O estado de dor crônica é definido por apresentar duração de no mínimo três meses e envolve elementos de sensibilização central e periférica, sendo primariamente mediado por nociceptores do tipo C (Lee e Neumeister, 2020). A sensibilização periférica é capaz de promover uma redução do limiar de ativação dos nociceptores, enquanto a sensibilização central gera uma responsividade aumentada da medula espinhal aos estímulos sensoriais (Schaible, 2006). Geralmente, devido à sensibilização, ocorre um aumento na magnitude da percepção da dor, caracterizado por uma resposta exacerbada de dor a estímulos nociceptivos (hiperalgesia) ou inócuos (alodínia), ou ainda por manifestação de dor na ausência de qualquer estímulo externo (dor espontânea) (Besson, 1999). Estes eventos responsáveis por facilitar o processo doloroso são geralmente apresentados por pacientes acometidos por doenças inflamatórias, como a artrite, por dores neuropáticas e por diferentes tipos de câncer (Mantyh et al., 2002a; Mantyh, 2006; Nijs et al., 2019).

Em pacientes acometidos pelo câncer, a dor pode estar relacionada ao tumor em si, ou pode ser resultado de diagnósticos, procedimentos terapêuticos ou efeitos adversos causado pelo tratamento. De fato, a dor relacionada ao câncer envolve aspectos como a etimologia do câncer e características pessoais do paciente acometido. Um estudo de meta análise que avaliou 122 estudos (n= 4199) mostrou que 55% dos pacientes com câncer relataram dor durante o tratamento, e 40% relataram episódios dolorosos após o tratamento do câncer (Oh e Han, 2013)

A fisiopatologia da dor associada ao câncer é complexa, envolve muitos fatores através da interação das células do câncer com o sistema nervoso central e periférico e o sistema imunológico. Estudos demonstram que os nociceptores

parecem estar envolvidos nesse processo doloroso (Leppert et al., 2016; Oosterling et al., 2016). O tumor é composto de diferentes tipos de células, além das tumorais, incluindo células do sistema imune, tais como macrófagos, neutrófilos e células T que secretam vários fatores que sensibilizam ou excitam diretamente neurônios aferentes primários através de receptores que detectam e transmitem sinais a partir estímulos nocivos produzidos em tais células. A lesão no local faz com que induza a liberação de mediadores como substância P. Outros mediadores envolvidos durante os quadros dolorosos são as citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandinas e fator de crescimento do nervo (NGF). Estes mediadores também aumentam a permeabilidade vascular e liberação de substância P (Leppert et al., 2016)

1.3 – MANEJO FARMACOLÓGICO DA DOR ASSOCIADO AO CÂNCER

Considerando que a dor relacionada ao câncer envolve diversos aspectos, o tratamento para o alívio desta dor se torna um desafio para os profissionais da área da saúde. Estudos demonstram que cerca de 43% dos pacientes relataram que não atingiram o alívio adequado da dor relacionado ao câncer (Deandrea et al., 2008), e cerca de 10 a 20% dos pacientes morrem sem o alívio da dor (Tay e Ho, 2009). Estes desfechos estão provavelmente relacionados ao perfil multifatorial e a complexidade de mecanismos envolvidos na geração e manutenção da dor associada aos tumores. Deste modo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reuniu especialistas da área e elaborou diretrizes para auxiliar os profissionais no controle da dor associado ao câncer, criando um documento denominado “Guia para Tratamento da Dor no Câncer”, caracterizado por uma escala analgésica de três degraus. Primeiramente, são indicados anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), caso não sejam capazes de provocarem alívio da dor, são introduzidos opioides fracos, como a codeína. Em situações de persistência da dor, o opioide fraco deve ser substituído por um forte, como por exemplo a morfina e a oxicodona (World Health Organization, 2018).

É importante ressaltar que a morfina continua sendo a terapia mais utilizada e mais eficaz para o controle da dor oncológica, especialmente para aquelas dores moderadas ou intensas. Entretanto, o uso crônico desse opioide é limitado pelo desenvolvimento de tolerância analgésica, e efeitos adversos como náusea, vômito, depressão respiratória, aumento da sensibilidade a dor (hiperalgesia), perda de memória, pesadelos e mioclonia (Wiffen et al., 2017). Estudos demonstram a eficácia

da escada analgésica proposta pela OMS, onde cerca de 71-86% dos pacientes têm atingido níveis satisfatórios de analgesia, entretanto, alguns almejam níveis ainda maiores que possam melhorar a qualidade de vida destes pacientes. Uma porcentagem significativa de pacientes apresenta efeitos adversos e/ou ineficácia no controle adequado da dor, geralmente associado aos opioides em doses altas, sendo necessário um novo degrau para o tratamento da dor associado ao câncer. Novas técnicas como o bloqueio neuraxial, através da administração intratecal de substâncias tem demonstrado eficácia no tratamento (Liu et al., 2017).

Em vista disso, estudos investigando a eficácia e a segurança de novos medicamentos analgésicos ou até mesmo que auxiliem na terapia com analgésicos disponíveis atualmente (como os opioides), vem crescendo consideravelmente. A participação dos CCRV do tipo N na ação analgésica em pacientes oncológicos pode ser evidenciado em humanos com o medicamento Prialt®, que tem como princípio ativo a ziconotida, através da aplicação intratecal (Staats et al., 2004). A ω -conotoxina, forma nativa da Ziconotida, é um composto isolado a partir do veneno do caracol marinho, *Conus magus*, que bloqueia seletivamente CCRV do tipo N (Olivera et al., 1987; Miljanich e Ramachandran, 1995). Entretanto, este medicamento possui reações adversas cognitivas e neuropsiquiátricas importantes, além disso, alguns pacientes demonstraram depressão do sistema nervoso central (SNC), ataxia, náusea, hipotensão e níveis elevados da creatina quinase (Bruel e Burton, 2016).

Está bem estabelecido que os CCRV participam do processo de sinalização nociceptiva, uma vez que a propagação e processamento do sinais dolorosos são modulados por uma série de canais iônicos e receptores diferentes, e dentre eles, destacam-se os CCRV (Altier et al., 2007). Os CCRV são classificados de acordo as propriedades biofísicas e farmacológicas em duas classes principais de canais para cálcio, de acordo com o potencial de membrana necessário para abertura destes canais. Os canais para cálcio ativados por baixa voltagem (~ -60mV, tipo T), e os canais ativados por alta voltagem (~ -30mV, tipos, L, N, P, Q, R) (Zamponi et al., 2015).

O envolvimento dos CCRV dos tipos L, N e P/Q na transmissão dolorosa pode ser evidenciado quando se leva em consideração o fato de que a ativação desses canais induz a liberação de neurotransmissores nociceptivos como o glutamato, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Takahashi e Momiyama, 1993).

1.4 – O PAPEL DA Ph α 1 β NOS PROCESSOS NOCICEPTIVOS

Devido aos efeitos adversos e janela terapêutica estreita da ziconotida, bem como a via de administração pouco favorável para tratamento, buscam-se novas substâncias que possuam efeito analgésico na dor relacionada ao câncer. A forma nativa da proteína Ph α 1 β (Ph α 1 β), presente no veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, popularmente conhecida como aranha armadeira, atua bloqueando preferencialmente os CCRV do tipo N (Christo e Mazloomdoost, 2008). Os efeitos analgésicos da Ph α 1 β em modelos de dor inflamatória e neuropática *in vivo*, mostraram maior eficácia quando comparados a ω -conotoxina (Souza et al., 2011).

O Ph α 1 β também demonstrou atividade analgésica em um modelo de dor neuropática em camundongos, através da administração intratecal (Rosa et al., 2014). Estudos mais recentes mostram que a forma recombinante da proteína Ph α 1 β (r-Ph α 1 β), produz efeito analgésico em modelo de dor neuropática e fibromialgia, administrado via endovenosa (Rigo et al., 2020a; Mendes et al., 2021).

Estudos da dor relacionado ao câncer mostram o uso da forma nativa da proteína Ph α 1 β administrado via intratecal, promovendo atividade analgésica em camundongos submetidos ao modelo de dor relacionada ao câncer com células de melanoma (B16-F10) quando comparados a ω -conotoxina (Rigo et al., 2013). Neste estudo também é possível verificar que Ph α 1 β foi capaz de reverter a atividade analgésica em camundongos tolerantes a morfina. Mais adiante, uma dose de Ph α 1 β (30 pmol/site, intratecal) foi capaz de recuperar parcialmente os efeitos analgésicos da morfina (Rigo et al., 2013).

Os estudos citados anteriormente com a forma nativa da Ph α 1 β e r-Ph α 1 β demonstram resultados promissores com atividade analgésica. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos antinociceptivo e adversos da r-Ph α 1 β em modelo experimental de dor relacionado ao câncer, em camundongos tolerantes ou não a morfina, através da administração endovenosa, uma vez que esta via de administração é menos complexa quando comparada a via intratecal, facilitando seu uso e diminuindo complicações.

Considerando os efeitos limitantes dos atuais tratamentos da dor relacionada ao tumor, com fármacos opioides, se torna imprescindível a busca por novas substâncias analgésicas mais seguras. Além disso, vem aumentando a procura

por compostos capazes de auxiliar ou potencializar o efeito terapêutico dos fármacos analgésicos atuais, de forma a minimizar a manifestação de efeitos adversos e melhorar a eficácia clínica deles, promovendo uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

2 – OBJETIVO

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar em camundongos tolerantes ou não a morfina, os possíveis efeitos antinociceptivo e adversos da forma recombinante da proteína Ph α 1 β (r-Ph α 1 β) em modelo experimental de dor relacionada ao câncer.

2.2 – OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar os possíveis efeitos antinociceptivos e adversos induzidos pela administração intravenosa da r-Ph α 1 β .
- Observar o possível efeito antinociceptivo da administração intravenosa da r-Ph α 1 β em camundongos com câncer e tolerantes a morfina;
- Investigar o efeito da pré-administração intravenosa da r-Ph α 1 β na eficácia antinociceptiva em camundongos tolerantes a morfina em modelos de dor associado ao tumor;

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a pesquisa foram utilizados 128 camundongos Black C57BL/6, composto de 64 machos e 64 fêmeas (30-40g, com 28-35 dias), para uma amostragem que reproduza a atividade terapêutica entre gêneros. Os animais foram obtidos do Centro de Experimentação Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Estes foram alojados em caixas de polietileno, com comida e água ad libitum e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro (a luz é ligada às 7 h da manhã), com temperatura controlada de 22 ± 1 °C. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da UNESC, através do protocolo número 24/2021

4 – MODELO EXPERIMENTAIS

4.1 - MODELO DE DOR ASSOCIADO AO CÂNCER

Para indução de dor associada ao tumor foram utilizadas células B16-F10, uma variante altamente invasiva de melanoma B16 derivado de camundongos C57BL/6 (Poste, 1980).

As células de melanoma foram cultivadas em monocamada utilizando meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/streptomicina. Para a inoculação do tumor, as células foram ressuspendidas em tampão fosfato (10^6 células/mL), e após foi injetado 30 μ l da suspensão de células ou veículo (tampão fosfato) subcutaneamente na região plantar da pata direita traseira conforme descrito previamente (Sasamura et al., 2002).

4.2 – MODELO DE TOLERÂNCIA A OPIOIDE

A tolerância a opioides foi induzida utilizando o protocolo de administração repetida de morfina, adaptado a partir de (Marshall e Weinstock, 1971). O protocolo consiste na administração de doses crescentes de morfina (10+10+15; 15+15+20; 20+20+25 mg/kg, s.c.) durante 3 dias. Em resumo, os camundongos receberam 3 injeções subcutâneas de morfina por dia, com um intervalo de 4 a 5 horas entre cada injeção. Foi administrado 10, 10 e 15 mg/kg de morfina no primeiro dia; 15, 15 e 20 mg/kg no segundo dia, e assim sucessivamente. O incremento de 5 mg/kg na última injeção de cada dia do tratamento tem como propósito minimizar a precipitação de síndrome de abstinência durante a noite. No quarto dia, o limiar mecânico dos

camundongos foi verificado através do teste von Frey, e então os animais receberam a dose-desafio de morfina (dose utilizada para verificar o desenvolvimento da tolerância ao efeito antinociceptivo - 10 mg/kg, s.c.) e seu limiar mecânico foi novamente mensurado, para verificar o desenvolvimento de tolerância.

Este modelo de tolerância a opioides tem como objetivo mimetizar as situações de pacientes acometidos com câncer que fazem uso de fármacos opioides. O uso frequente de opioides como a morfina, faz com que ele diminua seu efeito analgésico devido a internalização de receptores μ , diminuindo seu limiar de dor, ou seja, perdendo sua eficácia.

4.3 – TESTE DE HIPERALGESIA MECÂNICA POR VON FREY

A hiperalgesia mecânica foi avaliada com filamentos de von Frey (0,02-10 g para camundongos). O limiar de 50% de resposta foi determinado pelo método de *up-and-down* de (Dixon, 1980), de acordo com (Chaplan et al., 1994). Para isso, a pata traseira dos animais foi estimulada com um de uma série de filamentos de von Frey com incrementos logarítmicos crescentes. O filamento foi aplicado durante 5 segundos. Na ausência de retirada da pata, a resposta é considerada negativa, e o próximo filamento mais calibroso foi utilizado. No caso de resposta de retirada positiva, o filamento imediatamente menos calibroso foi aplicado. É considerada como resposta positiva a retirada da pata do contato com o filamento ou comportamento de sacudir ou lambear a pata no momento ou imediatamente após a estimulação. Em casos de ambulação ou de movimentos não relacionados à resposta nociceptiva no momento da aplicação do filamento, a resposta foi considerada ambígua, e nova estimulação foi então realizada. Foram realizadas 6 medidas. No caso de 4 respostas positivas ou negativas desde a primeira aplicação, o teste foi finalizado (Chaplan et al., 1994).

O conjunto de 6 ou 4 respostas obtido foi utilizado para o cálculo do limiar 50% de resposta (Dixon, 1965), como mostrado a seguir:

$$\text{Limiar 50\% (g)} = 10 [X_f + k] \text{ onde}$$

X_f = valor do último filamento de von Frey usado (em log);

k = valor tabelado para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (Dixon, 1965);

= diferença média (em log) entre os estímulos.

Uma redução significativa do limiar 50% de resposta dos animais será considerada hiperalgesia mecânica.

4.4 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA FORMA RECOMBINANTE DA Ph α 1 β . NA HIPERALGESIA MECÂNICA ASSOCIADA AO TUMOR

Primeiramente foi avaliado o limiar mecânico basal dos animais e após os camundongos foram inoculados com células de melanoma (B16-F10) ou salina 0.9% (Poste, 1980). Então, após 21 dias foi reavaliado o limiar mecânico dos animais para verificar uma redução em pelo menos 50% do limiar mecânico. Em seguida, os animais foram divididos em dois grupos, um grupo recebeu PBS I.V. e outro recebeu r-Ph α 1 β . Foram avaliados os efeitos antinociceptivo (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 horas pós-tratamento) e adversos 1 hora após a administração intravenosa da forma recombinante da Ph α 1 β (0,2; 0,6; 1,8 mg/kg i.v.) ou PBS (85 μ L/100g i.v.).

Para verificar a capacidade da r-Ph α 1 β de produzir efeito antinociceptivo em animais tolerantes à morfina, um grupo diferente de animais recebeu doses crescentes de morfina (a partir do 21^o dia após inoculação do tumor). Um dia antes de iniciar o protocolo de indução de tolerância, foi avaliado o limiar mecânico dos camundongos e após administrado morfina (10 mg/kg) ou salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea (Marshall e Weinstock, 1971). Os animais foram divididos em dois grupos; um grupo recebeu administrações repetidas de salina e o outro de morfina por 3 dias em doses crescentes. No quarto dia, os animais então tolerantes ao efeito antinociceptivo da morfina (S.C.), receberam PBS ou r-Ph α 1 β (0,6mg/kg), por via intravenosa, 2 horas após a administração da dose-desafio de morfina (10 mg/kg, s.c.) e logo após foi avaliado o decurso temporal (15 minutos até 4 horas após sua administração). Além disso, um grupo diferente de animais também tolerante a morfina recebeu uma nova injeção de morfina (10 mg/kg, s.c.), 300 minutos após a aplicação da r-Ph α 1 β , e logo após o limiar mecânico dos animais foi reavaliado 30, 60 e 120 minutos.

Ao total foram realizados nove grupos (G1 até G9), composto de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas) em cada grupo. O G1, G2 e G3 não houve aplicação das células B16-F10. G1 foi o grupo controle de tolerância a morfina, com aplicação de salina, enquanto o grupo G2 e G3 receberam morfina. Logo então o G2 foi tratado com PBS enquanto o G3 foi tratado com r-Ph α 1 β .

A partir do grupo G4 até o G7 foi realizado o modelo de dor associado ao câncer (MEL) com aplicação das células B16-BL6. Sendo o G4 o grupo que não recebeu tratamento, com administração de salina e PBS. O G5 foi induzido tolerância a morfina tratado com PBS enquanto o G7 foi tratado com r-Phα1β. O G6.1, G6.2 e G6.3 foi realizado a administração da r-Phα1β em concentrações diferentes para avaliar a menor dose necessária para obtenção da atividade analgésica.

Esquema de grupos, modelos e tratamentos			
Grupo	N fêmea	N macho	Modelo e Tratamento
G1	4	4	PBS + Salina + r-Phα1β
G2	4	4	PBS + MT + PBS
G3	4	4	PBS + MT + r-Phα1β
G4	4	4	MEL + Salina + PBS
G5	4	4	MEL + MT + PBS
G6.1	4	4	MEL + Salina + r-Phα1β [1]
G6.2	4	4	MEL + Salina + r-Phα1β [2]
G6.3	4	4	MEL + Salina + r-Phα1β [3]
G7	4	4	MEL + MT + r-Phα1β

5 – PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS

5.1 – AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO MOTOR

Foi observado o aparecimento ou não de comportamentos motores anormais, como serpenteado de cauda, tremores do corpo e eventual manifestação de alodinia dinâmica. Para quantificar os efeitos adversos acima mencionados, foi utilizada uma escala de 7 pontos descrita por (Smith et al., 2002). A presença de serpenteado intenso e contínuo da cauda e tremores intensos do corpo todo foi contabilizado 3 pontos para cada um dos comportamentos, 2 pontos foi considerado quando o serpenteado de cauda for contínuo e moderado e os tremores do corpo forem leves, com ou sem abertura dos membros posteriores e 1 ponto foi contabilizado para cada movimento leve e não contínuo da cauda, ligeira agitação ou tremor do corpo e alodinia dinâmica. A ausência de tais comportamentos foi considerado 0 pontos. A avaliação dos efeitos adversos foi realizada imediatamente após a administração da substância a ser avaliada e no pico do efeito antinociceptivo da mesma nos camundongos. Os dados também foram expressos como a soma dos

pontos dividido pelo número de animais no respectivo grupo (Malmberg e Yaksh, 1994).

5.2 – AVALIAÇÃO PELO TESTE DE CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)

O teste de campo aberto é uma técnica utilizada para medir a atividade locomotora e a exploração espontânea de um novo ambiente em estudos com animais (Seibenhener e Wooten, 2015). O teste foi realizado em uma caixa de madeira (40cm/60cm/50cm), onde o piso é dividido em nove quadrados iguais. O animal foi cautelosamente colocado no centro da caixa para explorar livremente a área durante 5 minutos. Neste período, foi contado quantas vezes o animal cruzou entre um quadrado e outro e quantas vezes ele ficou apoiado apenas nas patas traseiras (com as dianteiras suspensas). Essas respostas são típicas de roedores, e consideradas indicadores de atividade locomotora e exploratória. O teste foi realizado 1 hora após a aplicação da r-Ph α 1 β (pico do efeito).

5.3 – AVALIAÇÃO PELO TESTE DE ROTAROD

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de rotarod (Dunham e Miya, 1957). O procedimento consiste em colocar os camundongos sobre uma roda giratória durante o período de dois minutos e então contar o número de quedas e o tempo que levou desde a primeira queda.

6 – RESULTADOS

6.1 – EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA E r-Ph α 1 β EM UM MODELO DE HIPERALGESIA ASSOCIADA AO TUMOR

Os camundongos inoculados por células de melanoma (B16-F10) apresentaram hiperalgesia mecânica, caracterizada pela redução significativa do limiar de resposta mecânico de $1,178 \pm 0,4$ antes da inoculação, para $0,08 \pm 0,003$, 21 dias após a inoculação ($***P < 0,0001$; teste t de Student). As três doses da r-Ph α 1 β , mostraram atividade antihiperalgésica, quando comparadas com o limiar mecânico de 21 dias após a inoculação das células B16F10 (BT), em que as doses de 0,02 e 0,06mg/kg mostraram maior diferença estatística do que a dose o grupo 0,006mg/kg, quando comparados com limiar BT (Fig 1A) em que $***P < 0,0001$ e $**P < 0,0009$. A r-Ph α 1 β (0,06mg/kg I.V.) e a morfina (10mg/kg S.C.) foram capazes de reverter a hiperalgesia mecânica provocada pelo tumor. A morfina apresentou atividade antihiperalgésica 30 minutos após sua aplicação via S.C (Fig. 1C). A aplicação da r-Ph α 1 β por via intravenosa, na dose de 0,06mg/kg apresentou atividade antihiperalgésica 30 minutos após a administração, e seu efeito persistiu por um período de no máximo de 2 horas (Fig. 1B). É importante salientar que os animais que receberam apenas o veículo (PBS – 50uL) não apresentaram qualquer mudança na hiperalgesia mecânica induzida pelo tumor, através da análise estatística dos limiares mecânicos.

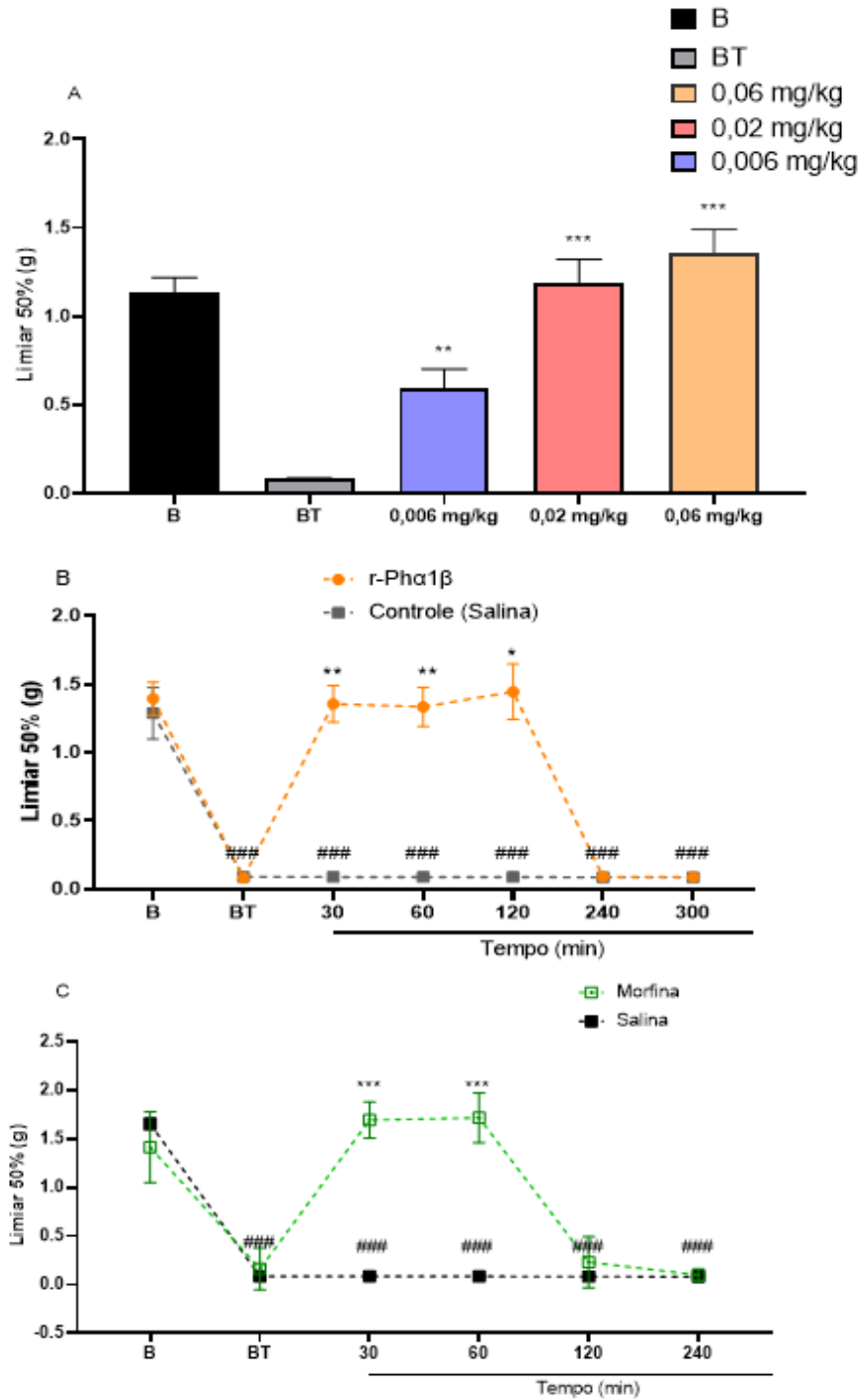


Figura 1. Avaliação do efeito antinocicepivo da r-Phα1β e morfina em animais submetidos ao modelo de dor associada ao câncer induzido por células B16F10 (BT). Em (A), a curva de dose, 30 minutos após administração via I.V. em animais. A curva de tempo após administração da r-Phα1β (0,06mg/kg) via I.V. em (B), e (C) após administração de morfina (10mg/kg) via S.C. O limiar mecânico dos animais foi verificado pelo teste de vonFrey. A análise estatística do limiar mecânico foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido por teste de Bonferroni. A diferença estatística está expressa em **P<0,0009 e ***P<0,0001, quando comparados com BT e ###P<0,0001 quando comparados com B.

6.2 – EFEITOS ADVERSOS APRESENTADOS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DA r-Phα1β.

Também foi avaliado o desenvolvimento de efeitos adversos comportamentais seguidos da administração da r-Phα1β em animais com ou sem a inoculação das células B16F10. A avaliação dos efeitos adversos foi realizada 1 hora após a administração I.V. da r-Phα1β (pico do efeito antinociceptivo) ou PBS. Quando administrada 21 dias após a inoculação das células B16F10, a r-Phα1β não apresentou nenhuma alteração nos resultados de open field, rotarod e score, quando comparados com os animais que foram aplicados PBS devido ao alto valor de erro padrão encontrados na amostra.

ATIVIDADE LOCOMOTORA E COMPORTAMENTAL

		Open Field				Rotarod		Score
Droga		Crossing	Rearing	Central Square	Lat. 1ª Queda	Nº Quedas	Score	
Animais com tumor	não tolerantes	r-Phα1β	38,71 ± 13,40	50,14 ± 11,01	10,14 ± 2,70	23,28 ± 11,85	2,00 ± 0,84	0
		Controle (PBS)	48,28 ± 18,78	38,85 ± 3,70	8,00 ± 1,27	15,57 ± 6,09	1,42 ± 0,36	0
	tolerantes	r-Phα1β	42,37 ± 15,49	28,75 ± 6,81	6,87 ± 2,40	65,00 ± 25,44	1,00 ± 0,6	0
		Controle (PBS)	36,37 ± 13,26	25,37 ± 3,02	6,25 ± 1,37	14,87 ± 3,62	1,37 ± 0,32	0
Animais sem tumor	não tolerantes	r-Phα1β	95,25 ± 20,89	18,62 ± 5,49	4,37 ± 1,85	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0
	tolerantes	r-Phα1β	66,62 ± 11,97	25,62 ± 5,77	5,25 ± 2,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0
		Controle (PBS)	77,00 ± 11,10	34,62 ± 4,55	6,25 ± 0,97	18,62 ± 12,49	0,37 ± 0,26	0

Tabela 1 – Efeitos adversos avaliados após a administração intravenosa de r-Phα1β ou PBS (controle) sobre o comportamento de camundongos inoculados por células B16F10

Os dados foram avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido por teste de Tukey para Open field, rotarod e score, comparando os resultados entre si para cada teste. Os valores mostram a média dos resultados obtidos seguido por erro padrão.

6.3 – AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA TOLERÂNCIA A MORFINA

Com a finalidade de avaliar o desenvolvimento de tolerância a morfina, os animais que foram inoculados por células B16F10, foram divididos em dois grupos e submetidos ao protocolo de tolerância a morfina (Fig 2). Um grupo recebeu doses crescentes de morfina durante 3 dias consecutivos enquanto o outro grupo recebeu doses repetidas de solução a 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). No quarto dia (BM), todos os animais receberam uma dose de morfina 10mg/kg (dose desafio). Os animais que receberam salina durante o protocolo, aumentaram o valor de limiar mecânico de 0,0835g (BM), para 1,5590g, 30 minutos após a administração S.C. de morfina em que $***P<0,0001$. Enquanto os animais que receberam morfina durante o protocolo, não demonstraram diferença estatística, confirmando assim o desenvolvimento da tolerância da morfina.

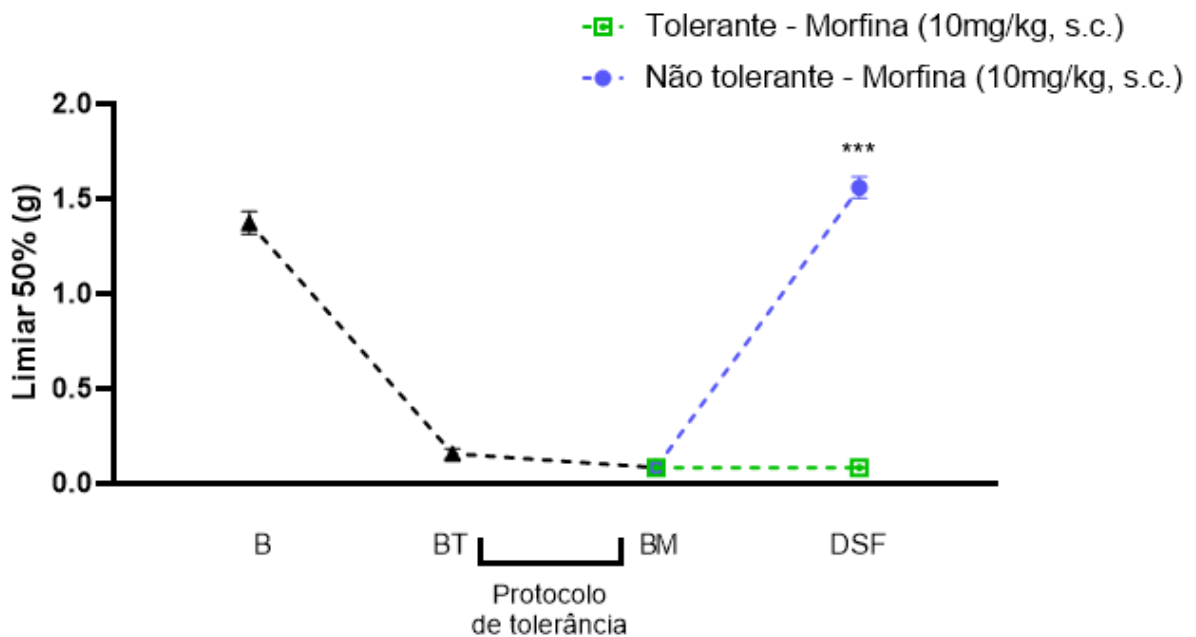


Figura 2. Avaliação do desenvolvimento da tolerância a morfina em animais com dor associada ao câncer (BT). Verificação da tolerância através da administração da dose desafio (DSF) (morfina 10mg/kg S.C.), 24 horas após a última dose do protocolo de tolerância. O limiar mecânico foi verificado pelo teste de vonFrey e a análise estatística foi realizada através da análise (ANOVA) de duas vias, seguido por teste de Bonferroni. A diferença estatística está expressa $***P<0,0001$ quando comparados com limiar mecânico após protocolo de tolerância (BM).

6.4 – EFEITO ANTINOCICEPTIVO E CAPACIDADE DE REVERSÃO DA TOLERÂNCIA A MORFINA DA r-Phα1β EM ANIMAIS INOCULADOS POR CÉLULAS B16F10 E TOLERANTES A MORFINA

A administração da r-Phα1β (0,06mg/kg) via I.V. demonstrou o aumento do limiar mecânico, relacionado a atividade antihiperálgica, em animais inoculados por células B16F10 e tolerantes a morfina, com início do seu efeito 30 minutos após sua aplicação, persistindo durante 120 minutos (Fig 3). Os animais que receberam uma nova dose de morfina 10mg/kg via S.C., 300 minutos após a r-Phα1β, mostraram aumento do limiar mecânico quando comparados com o limiar mecânico BT, mostrando a possível capacidade da r-Phα1β em reverter a tolerância provocada pela morfina.

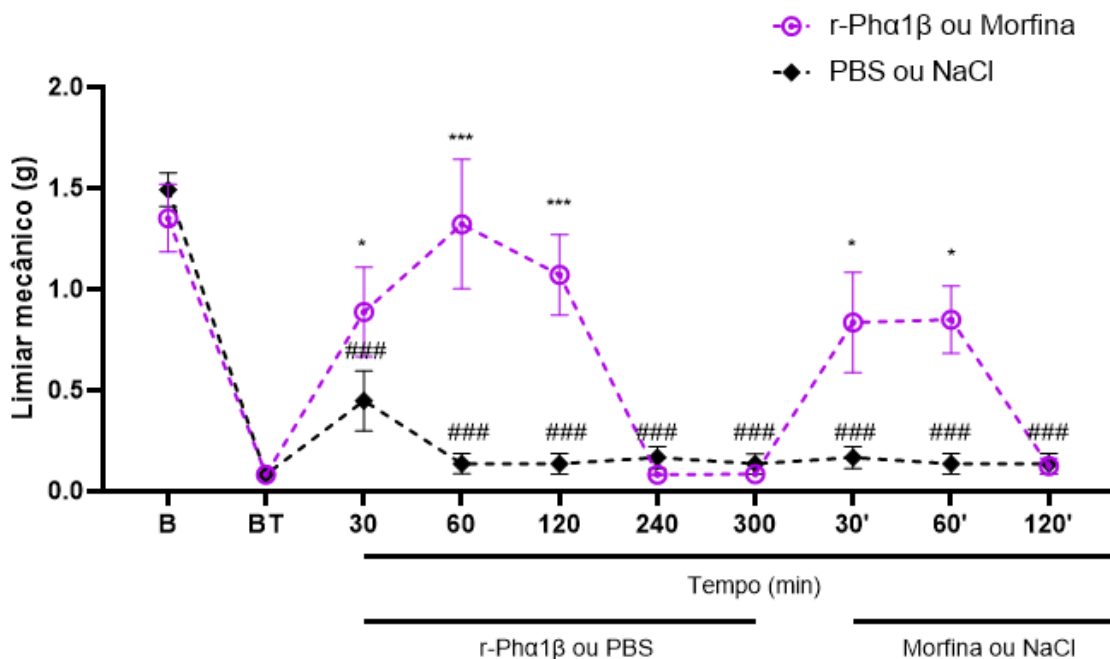


Figura 3. Avaliação da atividade antinociceptiva em animais com dor associada ao câncer e tolerantes a morfina (BT). Curva de tempo após a administração da r-Phα1β (0,06mg/kg I.V.) ou PBS (30μL I.V.). Avaliação da reversão da tolerância a morfina e curva de tempo, através de uma dose de morfina (10mg/kg S.C.) ou NaCl (0,1ml/kg S.C.), 300 minutos após a administração da r-Phα1β. O limiar mecânico foi verificado através do teste de vonFrey. A análise estatística foi realizada pelo teste (ANOVA) de duas vias, seguido por teste de Bonferroni. A diferença estatística está expressa em *P<0,05 e ***P<0,0001 quando comparado com limiar mecânico BT, e ###P<0,0001 quando comparados com limiar mecânico B.

7 – DISCUSSÃO

A dor relacionada ao câncer é um dos sintomas prevalentes e que torna o sujeito incapacitante, sendo necessário um manejo clínico logo no início do desenvolvimento do tumor, associado com um tratamento eficaz. Atualmente os opioides são praticamente os únicos analgésicos que são capazes de controlar a dor severa relacionada ao câncer. Entretanto, a terapia com opioides possui efeitos colaterais, que incluem a tolerância analgésica, sedação e constipação intestinal, o que limita o uso destas drogas para o tratamento da dor associada ao câncer (Plante e Vanitallie, 2010; Rigo et al., 2013). O câncer de pele, melanoma, na fase de metástase, está associada com dor moderada e intensa e muitas vezes requer cuidados paliativos através da terapia com morfina (Negin et al., 2003). A atividade analgésica da forma nativa da $\text{Ph}\alpha 1\beta$, assim como a r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (CTK 01512-2) tem demonstrado seu efeito analgésico em modelos de dor inflamatória, neuropática, e relacionado ao câncer (Souza et al., 2013; Diniz et al., 2014; Tonello et al., 2014; Rigo et al., 2017), caracterizado pela inibição reversível dos canais para cálcio regulados por voltagem CCRV do tipo N, P/Q e R, com uma seletividade maior para CCRV do tipo N (Vieira et al., 2005). No presente estudo, foi possível observar que a administração I.V. da r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$, apresentou atividade antinociceptiva sem a presença de efeitos adversos comportamentais, o que também foi demonstrado em outros estudos utilizando a administração r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$ via intratecal e I.V. (Rigo et al., 2017, 2020).

A r- $\text{Ph}\alpha 1\beta$ é capaz de bloquear reversivelmente os CCRV, entretanto novos estudos sugerem que a toxina também atua bloqueando o canal catiônico do potencial transitório anquirina (TRPA1) (Tonello et al., 2017). O TRPA1 é um canal catiônico não seletivo e está expresso nos neurônios somatossensoriais localizados nos gânglios da raiz dorsal, e estão associados a estímulos nocivos de substâncias químicas e a compressão mecânica (Kádková et al., 2017; Meents et al., 2019). Este canal faz parte de uma família de receptores potenciais transitórios (TRP) que são divididos em 7 grupos de acordo com sua função: TRPC (canônica), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPML (muculipina), TRPP (policistina), TRPA (anquirina), e TRPN (mecanorreceptores de potencial C) (Chen et al., 2014). O canal TRPA1 compõe um dos mecanismos importantes no processo doloroso (Andrade et al., 2012; Nassini et al., 2014), e também estão presentes em quadros de dor inflamatória e

neuropática (Andrade et al., 2012). A dor relacionada ao câncer possui uma etimologia complexa, com caráter inflamatório e neuropático associada ao crescimento da massa tumoral (Yoon E Oh, 2018; Russo e Sundaramurthi, 2019), deste modo, o efeito antinociceptivo da r-Ph α 1 β na dor relacionada ao câncer, pode ser devido a capacidade de bloqueio dos canais TRPA1, além dos CCRV. Além disso, um estudo realizado com a Ph α 1 β , mostrou que ela é capaz de diminuir a resposta nociceptiva estimulada por isotiocianato de alila, um agonista de TRPA1, administrado por via intraplantar e intratecal, diminuindo hiperalgesia mecânica e térmica em um modelo de dor neuropática induzida por bortezomibe (Tonello et al., 2017).

Estudos tem demonstrado que o aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), bem como o aumento do influxo de cálcio, desempenham um papel importante no processo doloroso, inclusive aquela induzida por câncer (Kallenborn-gerhardt et al., 2012; Ogawa et al., 2016). A interação das ROS e a sinalização de cálcio é bidirecional, ao mesmo tempo que as ROS regulam a sinalização de cálcio celular, o próprio cálcio celular também é essencial para a produção de ROS (Görlach et al., 2015). Como citado anteriormente, os canais TRPA1 participam do processo doloroso, e alguns estudos tem mostrado a ligação entre a produção excessiva de ROS e RNS através da ativação do canal TRPA1 (Carrasco et al., 2018). O mecanismo celular não é completamente compreendido, entretanto os estudos mostram que a dor também é induzida por ativação dos receptores TRPA1, como na dor diabética periférica (Andersson et al., 2015; Jardín et al., 2017), na dor induzida por lesão na medula espinhal (Park et al., 2015; Klafke et al., 2016) e na dor induzida por quimioterápicos (Naziroğlu e Braidly, 2017).

As evidencias sugerem que existe uma ligação entre o influxo de cálcio celular e a produção das ROS/RNS, que ocorre em quadros inflamatórios (Görlach et al., 2015) e na dor neuropática (Sajic, 2014). Os efeitos da Ph α 1 β sobre a geração de ROS e mediadores inflamatórios foram observados em alguns modelos de dor. Na dor visceral induzida por capsaicina, a Ph α 1 β foi capaz de reduzir os níveis de ROS e influxo de cálcio, sendo mais eficaz que a ω -conotoxina MVIIA (Diniz et al., 2014). Acredita-se que o maior efeito analgésico da Ph α 1 β possa ser explicado por associação de dois mecanismos, o bloqueio dos CCRV (Vieira et al., 2005), e bloqueio dos canais TRPA1 (TONELLO et al., 2017). Com os estudos realizados até o momento, é possível entender que o efeito analgésico da r-Ph α 1 β é complexo,

envolve mecanismos de bloqueio da sinalização dolorosa relacionada ao cálcio, e caráter anti-inflamatório associado ao bloqueio de TRPA1 e ROS. Embora não tenhamos avaliado a produção de ROS, já está bem estabelecido que a diminuição de cálcio intracelular, diminui a produção de ROS e talvez esse bloqueio dos CCRV seja importante para diminuir a nocicepção apresentada pelos animais com câncer (DINIZ et al., 2014).

O estado de dor crônica está presente em pacientes com câncer, e incluem a alodinia (presença de dor sob estímulos inócuos), relacionados a inflamação periférica devido ao crescimento da massa tumoral (SAMAD et al., 2001). As células da glia no corno dorsal estão relacionadas a inflamação e pela manutenção da condição dolorosa (TAPPE et al., 2006, p. 200; MILLIGAN; WATKINS, 2009; SORGE et al., 2015). No quadro de dor, a micróglia e astrócitos entram em estado de reatividade, formam conglomerados nos centros terminais dos nociceptores (SORGE et al., 2015; ADAMS; GALLO, 2018). Por exemplo, um desequilíbrio na homeostase de glutamato por captação via astrócitos leva a um quadro de sensibilização central e manutenção da dor (FALNIKAR et al., 2016). Da mesma forma, o estado de reatividade da micróglia é capaz de mediar a hipersensibilidade mecânica induzida pelo fator estimulador de colônias 1 (CSF1) e ATP derivado dos neurônios lesionados (COULL et al., 2005; GUAN et al., 2016). Os estudos sugerem que quando ocorre a ativação da micróglia, há a liberação de mediadores inflamatórios responsável pela ativação dos astrócitos (Aguilhon et al., 2012; Parpura et al., 2012). A administração da Ph α 1 β via intratecal conseguiu reverter a alodinia mecânica, em um modelo de alodinia induzido via adjuvante completo de Freund (CFA). Além disto, a Ph α 1 β parece demonstrar a capacidade anti-inflamatória, através da redução da reatividade da glia analisado por teste imunofluorescência da proteína fibrilar ácida da glia (GFAP). Ao contrário da ω -conotoxina MVIIA, a administração intratecal da Ph α 1 β , conseguiu diminuir o número de astrócitos proliferativos que são induzidos pela inflamação (Tenza-ferrer et al., 2019). Apesar do uso da forma nativa da Ph α 1 β via intratecal, sugere-se que a sua forma recombinante também desempenha um papel anti-inflamatório, e conseqüentemente induz antinocicepção, observado nesta pesquisa através do aumento do limiar mecânico no teste de von Frey. Vale ressaltar que as mudanças dos fenótipos nas células da glia dependem da sinalização de cálcio. Estas células apresentam uma variedade de canais para cálcio, que quando recebem o

influxo deste íon provoca o aumento de expressão gênica resultando no aumento de substâncias neuro-ativas em resposta de diversos estímulos, incluindo a inflamação.

O uso da r-Phα1β demonstrou a capacidade de reverter parcialmente a tolerância ao efeito antinociceptivo, provocada pelo uso contínuo de morfina. O desenvolvimento da tolerância analgésica é um dos efeitos colaterais mais comuns com o uso de doses repetidas de opioides (Plante e Vanitallie, 2010). Através de um modelo de dor associada ao câncer com células de melanoma, é possível reproduzir o modelo de tolerância induzida por opioides, provocado por doses consecutivas de morfina por três dias seguidos (Rigo et al., 2013). No quarto dia, uma dose desafio de morfina já se torna incapaz de reduzir a hiperalgesia mecânica sugerindo a tolerância analgésica, resultado este reproduzido na presente. É possível observar neste estudo que a administração I.V. r-Phα1β, 2 horas antes da aplicação de morfina, foi capaz de recuperar o efeito analgésico deste opioide, também reproduzido em outro estudo utilizando a forma nativa da Phα1β por via intratecal (Rigo et al., 2013).

É bem conhecido o fato de que a ação antinociceptiva da morfina ocorre devido a ativação dos receptores μ-opioides, levando a ativação dos canais de potássio e inibição dos CCRV, resultado na diminuição da excitabilidade neuronal em diversas áreas do SNC (Law, 2000). O uso de opioides em animais sem os genes para expressão ou com bloqueio espinhal dos CCRV, resulta no aumento do efeito antinociceptivo e reduz a tolerância induzida por morfina (Fukuizumi et al., 2003; Yokoyama et al., 2004; Dogrul et al., 2005; Yan et al., 2010), demonstrando que a diminuição de cálcio intracelular possa ser uma das razões pela qual a r-Phα1β recupera o efeito antinociceptivo da morfina nos animais tolerantes com dor associada ao câncer (Tonello et al., 2014). Já está descrito na literatura que o uso de doses repetidas de morfina leva tolerância analgésica, entretanto a infusão contínua da Phα1β não foi capaz de provocar este efeito, mantendo sua atividade antinociceptiva em um modelo de dor neuropática em ratos (ROSA et al., 2014)

Vale ressaltar que já foram relacionados outros mecanismos de reversão da tolerância, como o envolvimento da SIRT1, uma enzima que pertence à família das histonas desacetilases dependentes de NAD⁺ (He et al., 2014). Foi observado que assim como a r-Phα1β, o resveratrol, um agonista de SIRT1, foi capaz de aumentar o efeito analgésico da morfina (Tsai et al., 2012), bem como diminuir a tolerância provocada pelo mesmo (He et al., 2014), sugerindo uma novo alvo de investigação

para estudos futuros para melhor descrever as possíveis ações da r-Phα1β em outros alvos. Importante salientar que a Ziconotida (bloqueador de CCCR_V do tipo N), não apresentou modulação da tolerância analgésica induzida pelo opioide (Mcgivern, 2007), reforçando que a reversão da tolerância pode estar relacionada a um mecanismo que não depende dos CCCR_V, pelo menos não dos canais do tipo N, exclusivamente.

Atualmente, a ziconotida é uma opção terapêutica, para pacientes com dor associada ao câncer ou a AIDS, quando outros medicamentos não possuem respostas satisfatórias (Rauck et al., 2009). Entretanto a ziconotida está aprovada para uso via intratecal, e possui uma janela terapêutica estreita (Souza et al., 2008), produzindo efeitos adversos importantes mesmo em doses analgésicas (Penn e Paice, 2000; Staats et al., 2004; Schmidtko et al., 2010), e também é responsável pelo aumento dos níveis de creatina quinase (CK) da isoforma ligado ao musculo esquelético (CK-MM), onde foram reportados dois casos de falência renal aguda e rbdomiólise (dor muscular) associada à altos níveis de CK-MM (Lynch et al., 2006; Smith e Deer, 2009; Pope et al., 2017), o que não é observado com o uso I.V. da r-Phα1β. Uma administração I.V. de 0,2 mg/kg de ziconotida em ratos com neuropatia diabética não apresentou efeito analgésico e conseqüentemente os animais apresentaram hipotensão diastólica (Kolosov et al., 2010). A infusão contínua via intratecal da ziconotida em cachorros não alterou a pressão sanguínea, entretanto a administração I.V. em bolus resultaram numa diminuição na média da pressão arterial sistólica e diastólica, acompanhada de taquicardia e diminuição da frequência respiratória (Yaksh et al., 2012). A administração I.V. da ω-conotoxin MVIIA, forma nativa da ziconotida, resultou na queda dos níveis da pressão arterial em ratos, em um modelo de dose dependente (Bowersox et al., 1992). O mesmo pode ser observado com a administração I.V. da ω-conotoxin MVIIA em coelhos, resultando na diminuição da pressão arterial e taquicardia (Wright et al., 2000). Ao contrário da ziconotida, a administração I.V. da r-Phα1β proporcionou efeitos analgésicos em modelos de dor neuropática, sem a presença de efeitos colaterais cardíacos e sem alterações bioquímicas (Rigo et al., 2020). A segurança no uso I.V. da r-Phα1β, sugere ser superior a ziconotida via intratecal e I.V., uma vez que no presente estudo, a r-Phα1β mostrou efeito analgésico na dor associada ao câncer, sem alteração motoras e comportamentais. Além disso, outro estudo que avaliou o efeito antinociceptivo da

r-Phα1β administrado via I.V. em modelos de dor neuropática induzida por quimioterápicos reforçam os resultados da presente pesquisa, já que não houve manifestação de alterações comportamentais (Rigo et al., 2020). Assim, o uso concomitante da morfina e r-Phα1β poderia ser uma estratégia para modular a dor nos pacientes oncológicos, tanto pela própria analgesia, como também pela modulação dos efeitos adversos da morfina de maneira mais segura, se extrapolarmos para a clínica.

O perfil analgésico associada a Phα1β e sua forma recombinante, já vem sendo demonstrado ao longo dos anos, ser superior a ω-conotoxina MVIIA, bem como seu perfil de segurança associada relacionada a efeitos colaterais é bem tolerado. Este resultado pode ser explicado por muitos fatores, que incluem as diferentes afinidades entre as toxinas na ligação dos CCRV do tipo N, e em outros tipos de CCRV (Lewis et al., 2000; Winqvist et al., 2005; Altier et al., 2007). Diferente da ω-conotoxina MVIIA, Phα1β age em outros tipos de CCRV que estão envolvidos na transmissão do estímulo doloroso como os CCRV P/Q, R e L o que pode melhorar sua ação analgésica e ausência de efeitos adversos indesejáveis (Vieira et al., 2005).

Os CCRV do tipo N presente na medula espinhal desempenham um papel importante na liberação de neurotransmissores que atuam na resposta nociceptiva, como o glutamato. A ω-conotoxina MVIIA tem a capacidade de diminuir a excitabilidade neuronal e neurotransmissão (Miljanich e Ramachandran, 1995), bem como a Phα1β, mostrou a capacidade em diminuir a liberação de glutamato, em um modelo de formalina, devido a inibição do influxo de cálcio. Além disso, os nervos terminais que foram extraídos da medula espinhal dos animais foram tratados com capsaicina, uma substância que ativa os nociceptores, e após a administração da Phα1β, o mesmo reduziu a liberação de glutamato, numa potência três vezes maior do que ω-conotoxina MVIIA (Souza et al., 2008). Este estudo sugere que os CCRV do tipo N, podem estar associados a liberação de glutamato na medula espinhal quando associados a inflamação induzida por formalina (Gruner e Silva, 1994). Deste modo, a diminuição da liberação de neurotransmissores dos nervos pré-sinápticos, devido a redução do influxo de cálcio, pode provocar a redução da atividade nos neurônios do corno dorsal e desta forma, resultar em analgesia.

A dor relacionada ao câncer, também está associada com a lesão das fibras neurais sensoriais, através da compressão mecânica ou proteólise direta

(produção de enzimas proteolíticas por células tumorais que danificam as fibras neurais sensoriais e sinápticas), devido ao crescimento desenfreado da massa tumoral (Mantyh et al., 2002). Os CCRV e seus inibidores desempenham papel importante em dor neuropática (Yaksh, 2006). Diversos modelos de dor neuropática desenvolvidas em animais, como lesão de constrição crônica (CCI) no nervo ciático, ligação do nervo espinhal (SNL), lesão nervosa poupada (SNI), avulsão do plexo braquial (BPA) e transeção do nervo ciático (SNT), mostram que a dor neuropática está associada a isquemia, ativação dos macrófagos e aumento de citocinas e outras manifestações de neuroinflamação (Lee e Wolfe, 2000; Zimmermann, 2001; Üçeyler e Sommer, 2006; Dubový, 2011). O uso da Ph α 1 β via intratecal mostrou atividade analgésica em modelo de neuropatia por constrição parcial e total do nervo ciático (SOUZA et al., 2008). Uma pesquisa em que foi utilizado modelo de neuropatia diabética em ratos, mostrou que a administração intratecal da Ph α 1 β foi capaz de reduzir a hipersensibilidade em ratos com neuropatia diabética induzida por estreptozotocina, bem como demonstrou a diminuição do influxo de cálcio e interleucina-6 (IL-6) (Silva Junior et al., 2020). Neste mesmo estudo, a Ph α 1 β também foi responsável por diminuir a hipersensibilidade induzida pela administração do fator 1 derivado de célula estromal (SDF-1) (Silva Junior et al., 2020). O SDF-1 é uma quimiocina que está envolvida na fisiopatologia da dor associada a neuropatia diabética (Bhangoo et al., 2007, 2009; Menichella et al., 2014). O SDF-1 liga-se ao receptor CXCR-4, aumentando o influxo de cálcio e excitabilidade dos neurônios da raiz do corno dorsal, responsável pelo desenvolvimento da dor associada a neuropatia diabética (Menichella et al., 2014).

Estudos posteriores mostraram que a administração I.V. da r-Ph α 1 β também possui efeito analgésico em modelo de dor neuropática de constrição parcial do nervo ciático, sem a manifestação de efeitos adversos nos parâmetros bioquímicos (Rigo et al., 2020). Portanto, os efeitos da administração da Ph α 1 β e r-Ph α 1 β na dor neuropática, reforçam a atividade analgésica na dor relacionada ao câncer encontrado no presente estudo, uma vez que o tumor está associado a lesão das fibras neurais.

O presente estudo apresenta limitações importantes. Dentre elas, podemos citar a investigação da reversão da tolerância da morfina provocada pela administração da r-Ph α 1 β , onde os mecanismos atualmente não estão totalmente esclarecidos na literatura. O uso de doses prévias de r-Ph α 1 β , bem como

bloqueadores ou agonistas de receptores associados a tolerância à morfina são essenciais para maior compreensão deste mecanismo. Atualmente existe apenas um fármaco, que atua como bloqueador dos CCRV, e tem como princípio ativo a zicononida, vem sendo utilizado como analgésico em pacientes em que a morfina não atingiu seu potencial terapêutico, entretanto este medicamento está aprovado para uso via intratecal. Deste modo, atualmente não existe nenhum medicamento analgésico administrado via I.V., que atue como bloqueador dos CCRV para realizar comparações da atividade analgésica para referência.

8 - CONCLUSÃO

A administração intravenosa da r-Ph α 1 β apresentou efeito analgésico em animais com hiperalgesia associada ao câncer, tolerantes ou não tolerantes a morfina. Uma única dose da r-Ph α 1 β foi capaz de recuperar parcialmente o efeito analgésico da morfina em animais hiperalgésicos.

Os resultados na presente pesquisa são promissores, entretanto o mecanismo da r-Ph α 1 β sobre a atividade analgésica e a capacidade de reversão da tolerância a morfina não está totalmente claro. Maiores estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos de ação da r-Ph α 1 β .

REFERÊNCIAS

ADAMS, K. L.; GALLO, V. The diversity and disparity of the glial scar. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 9–15, jan. 2018.

- AGUIAR, D. P. et al. Prevalence of chronic pain in Brazil: systematic review. **BrJP**, v. 4, p. 257–267, 1 set. 2021.
- AGULHON, C. et al. Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, 2012.
- ALTIER, C. et al. Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 24, 2007.
- ANDERSSON, D. A. et al. Streptozotocin Stimulates the Ion Channel TRPA1 Directly: INVOLVEMENT OF PEROXYNITRITE *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 24, p. 15185–15196, 12 jun. 2015.
- ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 189–204, fev. 2012.
- BESSON, J. M. **The neurobiology of pain**. **Lancet**, 1999.
- BHANGOO, S. K. et al. CXCR4 chemokine receptor signaling mediates pain hypersensitivity in association with antiretroviral toxic neuropathy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 5, p. 581–591, jul. 2007.
- BHANGOO, S. K. et al. Increased Chemokine Signaling in a Model of HIV1-Associated Peripheral Neuropathy. **Molecular Pain**, v. 5, p. 1744-8069-5–48, 1 jan. 2009.
- BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. **Basic anatomy and physiology of pain pathways**. **Neurosurgery Clinics of North America**, 2014.
- BOWERSOX, S. S. et al. Cardiovascular effects of omega-conopeptides in conscious rats: mechanisms of action. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 20, n. 5, p. 756–764, 1 jan. 1992.
- BRUEL, B. M.; BURTON, A. W. Intrathecal therapy for cancer-related pain. **Pain Medicine (United States)**, v. 17, n. 12, 2016.
- CARRASCO, C. et al. Neuropathic Pain: Delving into the Oxidative Origin and the Possible Implication of Transient Receptor Potential Channels. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, 1994.
- CHEN, J. et al. Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. **BioScience Trends**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014.
- CHRISTO, P. J.; MAZLOOMDOOST, D. **Interventional pain treatments for cancer pain**. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **Anais...**2008.
- COULL, J. A. M. et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 1017–1021, dez. 2005.
- DA SILVA JUNIOR, C. A. et al. The inhibitory effect of Ph α 1 β toxin on diabetic neuropathic pain involves the CXCR4 chemokine receptor. **Pharmacological Reports**, v. 72, n. 1, p. 47–54, 1 fev. 2020.

DE SOUZA, A. H. et al. Antiallodynic effect and side effects of Ph α 1 β , a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with ω -conotoxin MVIIA and morphine. **Toxicon**, v. 58, n. 8, 2011.

DE SOUZA, A. H. et al. An Evaluation of the Antinociceptive Effects of Ph α 1 β , a Neurotoxin from the Spider *Phoneutria nigriventer*, and ω -Conotoxin MVIIA, a Cone Snail *Conus magus* Toxin, in Rat Model of Inflammatory and Neuropathic Pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 33, n. 1, p. 59–67, 1 jan. 2013.

DEANDREA, S. et al. **Prevalence of undertreatment in cancer pain. A review of published literature. Annals of Oncology**, 2008.

DINIZ, D. M. et al. Effects of the calcium channel blockers Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA on capsaicin and acetic acid-induced visceral nociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 126, p. 97–102, 1 nov. 2014.

DIXON, W. J. The Up-and-Down Method for Small Samples. **Journal of the American Statistical Association**, v. 60, n. 312, 1965.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 20, 1980.

DOGRUL, A. et al. Spinal L-Type Calcium Channel Blockade Abolishes Opioid-Induced Sensory Hypersensitivity and Antinociceptive Tolerance: **Anesthesia & Analgesia**, p. 1730–1735, dez. 2005.

DUBOVÝ, P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, Axotomy, Neuronal Plasticity and Recovery of Function. v. 193, n. 4, p. 267–275, 1 jul. 2011.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, 1957.

ELLISON, D. L. **Physiology of Pain. Critical Care Nursing Clinics of North America**, 2017.

FALNIKAR, A. et al. GLT1 overexpression reverses established neuropathic pain-related behavior and attenuates chronic dorsal horn neuron activation following cervical spinal cord injury: GLT1 Overexpression Reverses Neuropathic Pain-Related Behavior. **Glia**, v. 64, n. 3, p. 396–406, mar. 2016.

FUKUIZUMI, T.; OHKUBO, T.; KITAMURA, K. Spinally delivered N-, P/Q- and L-type Ca²⁺-channel blockers potentiate morphine analgesia in mice. **Life Sciences**, v. 73, n. 22, p. 2873–2881, out. 2003.

GARCIA MENDES, M. P. et al. Effects of intravenous administration of recombinant Ph α 1 β toxin in a mouse model of fibromyalgia. **Toxicon**, v. 195, 2021.

GÖRLACH, A. et al. Calcium and ROS: A mutual interplay. **Redox Biology**, v. 6, p. 260–271, 1 dez. 2015.

GRUNER, W.; SILVA, L. R. Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 2800–2808, 1 maio 1994.

GUAN, Z. et al. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 94–101, jan. 2016.

- HE, X. et al. Resveratrol attenuates morphine antinociceptive tolerance via SIRT1 regulation in the rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 566, p. 55–60, 30 abr. 2014.
- HENSCHKE, N.; KAMPER, S. J.; MAHER, C. G. **The epidemiology and economic consequences of pain.** Mayo Clinic Proceedings. **Anais...**2015.
- JARDÍN, I. et al. TRPs in Pain Sensation. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.
- KÁDKOVÁ, A. et al. Molecular Basis of TRPA1 Regulation in Nociceptive Neurons. A Review. **Physiological Research**, p. 425–439, 30 jun. 2017.
- KALLENBORN-GERHARDT, W. et al. NADPH Oxidase-4 Maintains Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 30, p. 10136–10145, 25 jul. 2012.
- KLAFKE, J. Z. et al. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 468, n. 2, p. 229–241, 1 fev. 2016.
- KOLOSOV, A.; GOODCHILD, C. S.; COOKE, I. CNSB004 (Leconotide) Causes Antihyperalgesia Without Side Effects When Given Intravenously: A Comparison with Ziconotide in a Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain. **Pain Medicine**, v. 11, n. 2, p. 262–273, fev. 2010.
- KOLTZENBURG, M.; STUCKY, C. L.; LEWIN, G. R. Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. **Journal of Neurophysiology**, v. 78, n. 4, 1997.
- LAW, P.-Y.; WONG, Y. H.; LOH, H. H. Molecular Mechanisms and Regulation of Opioid Receptor Signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 389–430, abr. 2000.
- LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. **Pain: Pathways and Physiology** Lee GI, Neumeister MW. **Pain: Pathways and Physiology.** *Clin Plast Surg* 2020;47. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2019.11.001>. **Clinics in Plastic Surgery**, 2020.
- LEE, S. K.; WOLFE, S. W. Peripheral Nerve Injury and Repair: **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 8, n. 4, p. 243–252, jul. 2000.
- LEPPERT, W. et al. **Pathophysiology and clinical characteristics of pain in most common locations in cancer patients.** **Journal of Physiology and Pharmacology**, 2016.
- LEWIS, R. J. et al. Novel ω -Conotoxins from *Conus catus* Discriminate among Neuronal Calcium Channel Subtypes *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 45, p. 35335–35344, 10 nov. 2000.
- LIU, W. C. et al. **Multidimensional Treatment of Cancer Pain.** **Current Oncology Reports**, 2017.
- LYNCH, S. S.; CHENG, C. M.; YEE, J. L. Formulary Forum: Intrathecal Ziconotide for Refractory Chronic Pain. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, n. 7–8, p. 1293–1300, jul. 2006.
- MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: Blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 8, 1994.
- MANTYH, P. W. et al. **Molecular mechanisms of cancer pain.** **Nature Reviews Cancer**, 2002a.

- MANTYH, P. W. et al. Molecular mechanisms of cancer pain. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 201–209, mar. 2002b.
- MANTYH, P. W. **Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. Nature Reviews Neuroscience**, 2006.
- MARSHALL, I.; WEINSTOCK, M. **Quantitative method for assessing one symptom of the withdrawal syndrome in mice after chronic morphine administration [12]. Nature**, 1971.
- MCGIVERN, J. G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 1, p. 69–85, fev. 2007.
- MEENTS, J. E.; CIOTU, C. I.; FISCHER, M. J. M. TRPA1: a molecular view. **Journal of Neurophysiology**, v. 121, n. 2, p. 427–443, 1 fev. 2019.
- MENICHELLA, D. M. et al. CXCR4 Chemokine Receptor Signaling Mediates Pain in Diabetic Neuropathy. **Molecular Pain**, v. 10, p. 1744-8069-10–42, 14 ago. 2014.
- MILJANICH, G. P.; RAMACHANDRAN, J. **Antagonists of neuronal calcium channels: Structure, function, and therapeutic implications. Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 1995.
- MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23–36, jan. 2009.
- NASSINI, R. et al. The TRPA1 channel in inflammatory and neuropathic pain and migraine. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 167, p. 1–43, 2014.
- NAZIROĞLU, M.; BRAIDY, N. Thermo-Sensitive TRP Channels: Novel Targets for Treating Chemotherapy-Induced Peripheral Pain. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.
- NEGIN, B. P. et al. Symptoms and signs of primary melanoma: Important indicators of Breslow depth. **Cancer**, v. 98, n. 2, p. 344–348, 15 jul. 2003.
- NIJS, J. et al. **Treatment of central sensitization in patients with chronic pain: time for change? Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 2019.
- OGAWA, N.; KUROKAWA, T.; MORI, Y. Sensing of redox status by TRP channels. **Cell Calcium**, Ca signaling and ROS (Part A). v. 60, n. 2, p. 115–122, 1 ago. 2016.
- OH, P. J.; HAN, S. J. Meta-analysis of psychosocial interventions to reduce pain in patients with cancer. **Journal of Korean Academy of Nursing**, v. 43, n. 5, 2013.
- OLIVERA, B. M. et al. Neuronal Calcium Channel Antagonists. Discrimination between Calcium Channel Subtypes Using co-Conotoxin from *Conus magus* Venom. **Biochemistry**, v. 26, n. 8, 1987.
- OOSTERLING, A. et al. Neuropathic Pain Components in Patients with Cancer: Prevalence, Treatment, and Interference with Daily Activities. **Pain Practice**, v. 16, n. 4, 2016.
- PARK, J. et al. Acrolein contributes to TRPA1 up-regulation in peripheral and central sensory hypersensitivity following spinal cord injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 5, p. 987–997, dez. 2015.

- PARPURA, V. et al. Glial cells in (patho)physiology: Glial cells in (patho)physiology. **Journal of Neurochemistry**, v. 121, n. 1, p. 4–27, abr. 2012.
- PENN, R. D.; PAICE, J. A. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. **Pain**, v. 85, n. 1, p. 291–296, 1 mar. 2000.
- PLANTE, G. E.; VANITALLIE, T. B. Opioids for cancer pain: the challenge of optimizing treatment. **Metabolism, Towards a New Therapeutics for Pain: Pathogenesis and Clinical Aspects**. v. 59, p. S47–S52, 1 out. 2010.
- POPE, J. E. et al. The Pharmacology of Spinal Opioids and Ziconotide for the Treatment of Non-Cancer Pain. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 2, p. 206–216, 1 fev. 2017.
- POSTE, G. Surface molecules and tumour-cell metastatic properties. **Biochemical Society transactions**, v. 8, n. 6, 1980.
- RAUCK, R. L. et al. Intrathecal Ziconotide for Neuropathic Pain: A Review. **Pain Practice**, v. 9, n. 5, p. 327–337, set. 2009.
- RIGO, F. K. et al. Spider peptide Ph α 1 β induces analgesic effect in a model of cancer pain. **Cancer Science**, v. 104, n. 9, 2013a.
- RIGO, F. K. et al. Spider peptide Ph α 1 β induces analgesic effect in a model of cancer pain. **Cancer Science**, v. 104, n. 9, p. 1226–1230, set. 2013b.
- RIGO, F. K. et al. The spider toxin Ph α 1 β recombinant possesses strong analgesic activity. **Toxicon**, v. 133, p. 145–152, jul. 2017.
- RIGO, F. K. et al. Analgesic and side effects of intravenous recombinant Ph α 1 β . **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, 2020a.
- RIGO, F. K. et al. Analgesic and side effects of intravenous recombinant Ph α 1 β . **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, p. e20190070, 2020b.
- RINGKAMP, M.; DOUGHERTY, P. M.; RAJA, S. N. Anatomy and Physiology of the Pain Signaling Process. Em: **Essentials of Pain Medicine**. [s.l: s.n.].
- ROSA, F. et al. Ph α 1 β , a peptide from the venom of the spider phoneutria nigriventer shows antinociceptive effects after continuous infusion in a neuropathic pain model in rats. **Anesthesia and Analgesia**, v. 119, n. 1, 2014.
- RUSSO, M. M.; SUNDARAMURTHI, T. An Overview of Cancer Pain: Epidemiology and Pathophysiology. **Seminars in Oncology Nursing, Cancer Pain**. v. 35, n. 3, p. 223–228, 1 jun. 2019.
- SAJIC, M. Mitochondrial Dynamics in Peripheral Neuropathies. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 4, p. 601–620, ago. 2014.
- SAMAD, T. A. et al. Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471–475, mar. 2001.
- SASAMURA, T. et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. **European Journal of Pharmacology**, v. 441, n. 3, 2002.

- SCHAIBLE, H. G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 177, 2007.
- SCHMIDTKO, A. et al. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1569–1577, 1 maio 2010.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, 2015.
- SMITH, H. S.; DEER, T. R. Safety and efficacy of intrathecal ziconotide in the management of severe chronic pain. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 5, p. 521–534, 2009.
- SMITH, M. T. et al. The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. **Pain**, v. 96, n. 1–2, 2002.
- SNEDDON, L. U. **Comparative physiology of nociception and pain. Physiology**, 2018.
- SORGE, R. E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081–1083, ago. 2015.
- SOUZA, A. H. et al. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph α 1 β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. **PAIN**, v. 140, n. 1, p. 115–126, 15 nov. 2008.
- STAATS, P. S. et al. Intrathecal Ziconotide in the Treatment of Refractory Pain in Patients with Cancer or AIDS: A Randomized Controlled Trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 1, 2004.
- TAKAHASHI, T.; MOMIYAMA, A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. **Nature**, v. 366, n. 6451, 1993.
- TAPPE, A. et al. Synaptic scaffolding protein Homer1a protects against chronic inflammatory pain. **Nature Medicine**, v. 12, n. 6, p. 677–681, jun. 2006.
- TAY, W.; HO, K. Y. **The role of interventional therapies in cancer pain management. Annals of the Academy of Medicine Singapore**, 2009.
- TENZA-FERRER, H. et al. Ph α 1 β Spider Toxin Reverses Glial Structural Plasticity Upon Peripheral Inflammation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 306, 10 jul. 2019.
- TONELLO, R. et al. Action of Ph α 1 β , a Peptide From the Venom of the Spider Phoneutria nigriventer, on the Analgesic and Adverse Effects Caused by Morphine in Mice. **The Journal of Pain**, v. 15, n. 6, p. 619–631, 1 jun. 2014.
- TONELLO, R. et al. The peptide Ph α 1 β , from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 1, p. 57–69, jan. 2017.
- TROUVIN, A. P.; PERROT, S. **New concepts of pain. Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, 2019.

TSAI, R.-Y. et al. Resveratrol Regulates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Expression and Suppresses Neuroinflammation in Morphine-Tolerant Rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 115, n. 4, p. 944–952, out. 2012.

ÜÇEYLER, N.; SOMMER, C. Wallerian degeneration and neuropathic pain. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 3, n. 3, p. 351–356, 1 set. 2006.

VIEIRA, L. B. et al. Inhibition of High Voltage-Activated Calcium Channels by Spider Toxin PnTx3-6. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 3, p. 1370–1377, 1 set. 2005.

WIFFEN, P. J. et al. **Opioids for cancer pain - an overview of Cochrane reviews**. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2017.

WINQUIST, R. J.; PAN, J. Q.; GRIBKOFF, V. K. Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 489–499, 15 ago. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents**. [s.l.: s.n.].

WRIGHT, C. E. et al. Cardiovascular and autonomic effects of ω -conotoxins MVIIA and CVID in conscious rabbits and isolated tissue assays: ω -Conotoxins CVID and MVIIA in conscious rabbits. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 7, p. 1325–1336, dez. 2000.

YAKSH, T. L. Calcium Channels As Therapeutic Targets in Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 1, Supplement, p. S13–S30, 1 jan. 2006.

YAKSH, T. L. et al. Pharmacokinetic Analysis of Ziconotide (SNX-111), an Intrathecal N-Type Calcium Channel Blocking Analgesic, Delivered by Bolus and Infusion in the Dog. **Neuromodulation: Technology at the Neural Interface**, v. 15, n. 6, p. 508–519, 1 dez. 2012.

YAN, L.-D. et al. Spinal antinociception of synthetic omega-conotoxin SO-3, a selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, and its effects on morphine analgesia in chemical stimulus tests in rodent. **European Journal of Pharmacology**, v. 636, n. 1–3, p. 73–81, jun. 2010.

YOKOYAMA, K. et al. Blocking the R-type (Cav2.3) Ca²⁺ channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 3516–3519, dez. 2004.

YOON, S. Y.; OH, J. Neuropathic cancer pain: prevalence, pathophysiology, and management. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 33, n. 6, p. 1058–1069, nov. 2018.

ZAMPONI, G. W. et al. **Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways**. **Brain Research Reviews**, 2009.

ZAMPONI, G. W. et al. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, 2015.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, SPRING 2001. v. 429, n. 1, p. 23–37, 19 out. 2001.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 396

Com início às 09h (nove horas) do dia doze de agosto de 2022 (dois mil e vinte e dois), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **FERNANDO ORIQUE PEREIRA**, sob a orientação do **Prof. Dr. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA**, intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E DOS EFEITOS ADVERSOS INDUZIDOS PELA FORMA RECOMBINANTE DA PROTEÍNA Ph α 1 β EM UM MODELO DE DOR ASSOCIADO AO CÂNCER**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Gabriela dos Santos Trevisan (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 12h (doze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 12 (doze) de agosto de 2022 (dois mil e vinte e dois).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo