

Robson da Costa

**PAPEL DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA NEUROPATIA  
PERIFÉRICA INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO  
PACLITAXEL**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Farmacologia  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau  
de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. João B.  
Calixto

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Costa, Robson

Papel dos receptores cininérgicos na neuropatia  
periférica induzida pelo quimioterápico paclitaxel [tese]  
/ Robson da Costa ; orientador, João Batista Calixto -  
Florianópolis, SC, 2013.

171 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Quimioterapia. 3. Neuropatia  
periférica. 4. Cininas. 5. TRPV4. I. Calixto, João  
Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

## **Agradecimentos**

Meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor João B. Calixto, pela orientação e ensinamentos durante os anos de iniciação científica, mestrado e doutorado;

Ao Jarbas M. Siqueira Jr. e à Camila D'Agostin Donadel, por viabilizarem a aquisição do quimioterápico paclitaxel;

Ao Professor João B. Pesquero pela concessão das matrizes de animais nocautes para os receptores cininérgicos;

À Marianne N. Manjavachi e Maíra A. Bicca, pela ajuda em muitos experimentos desta tese;

Aos demais colaboradores, Emerson M. Motta, Rafael C. Dutra, Allisson F. Bento, Ana Paula Luiz e Claudia P. Figueiredo, pelo auxílio em alguns experimentos;

Ao Pedro Paulo de Souza, técnico do biotério setorial, e às técnicas de laboratório, Juliana Gonçalves, Aline Venâncio e Ana Carolina Machado, pelo apoio durante estes anos;

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro.

Muito obrigado a todos.



*Ali ficam as respostas, ali ficaram as dúvidas.*  
*Lindolf Bell (1938 – 1998)*



## Resumo

A neuropatia periférica induzida por quimioterápicos (NPIQ) é uma das principais causas de dor neuropática em humanos. Apesar de muitos esforços, atualmente não há terapia farmacológica disponível para o tratamento adequado de pacientes com dor crônica. É importante mencionar que talvez a dor crônica seja uma das áreas mais promissoras para que antagonistas dos receptores cininérgicos demonstrem eficácia clínica. Neste estudo procurou-se avaliar a contribuição de ambos os receptores  $B_1$  ( $B_1R$ ) e  $B_2$  ( $B_2R$ ) das cininas para a neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel (PTX), um quimioterápico de uso clínico amplo. Além disso, este estudo investigou o possível envolvimento do receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4) nas respostas nociceptivas das cininas em animais naïve, bem como a relevância desta interação para a neuropatia induzida pelo PTX. O tratamento com PTX induziu hiperalgesia mecânica e térmica em camundongos (linhagens C57BL/6 e CD1). A deleção do gene para os receptores  $B_1$ ,  $B_2$  ou  $B_1$  e  $B_2$  (animais duplo-nocaute) reduziu significativamente as respostas hiperalgésicas induzidas pelo PTX em comparação aos animais do tipo selvagem. De modo relevante, o tratamento intraperitoneal com os antagonistas peptídicos e seletivos para os receptores  $B_1$  e  $B_2$  (DALBK e Hoe 140, respectivamente) inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica e térmica quando testados 7 e 14 dias após o primeiro tratamento com PTX. Estes antagonistas também foram eficazes quando administrados centralmente pela via intratecal. Além disso, a injeção intracerebroventricular de DALBK (mas não de Hoe 140) foi eficaz contra a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX em estágios tardios (14 dias). Este efeito foi associado com aumento da expressão do  $B_1R$  (RNAm e proteína) no tálamo de camundongos. Apesar da eficácia contra a hiperalgesia instalada, o tratamento prolongado e preventivo com os antagonistas cininérgicos não foi eficaz em prevenir a gênese da neuropatia induzida pelo PTX. Porém, este protocolo de tratamento foi efetivo em inibir transitoriamente a hiperalgesia mecânica (por 24 h), bem como inibir expressivamente a hiperalgesia à hipotonicidade (um ativador do canal de mecanotransdução TRPV4). De fato, o canal TRPV4 demonstrou estar envolvido na hiperalgesia mecânica induzida por agonistas seletivos dos receptores  $B_1$  ou  $B_2$ , DABK e BK, respectivamente. Ainda, verificou-se que a BK sensibiliza camundongos aos ativadores do canal TRPV4 (4 $\alpha$ -PDD e hipotonicidade) por ativar a via de sinalização PLC/PKC. Corroborando este resultado, o tratamento prolongado e preventivo com os antagonistas cininérgicos preveniu a

ativação da PKC $\epsilon$  induzida pelo PTX na pata de camundongos; evento este que demonstrou ser importante para a sensibilidade aumentada a hipotonicidade em animais tratados com o quimioterápico. Os resultados do presente estudo demonstraram que as cininas agindo sobre ambos os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> desempenham papel crucial no controle da neuropatia periférica induzida pelo PTX através da sensibilização do canal TRPV4 via ativação da enzima PKC $\epsilon$ . Estas evidências suportam a ideia de que antagonistas seletivos para os receptores cininérgicos poderiam representar novas opções terapêuticas para o tratamento da dor crônica causada pela quimioterapia.

## Abstract

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is one of the leading causes of neuropathic pain in humans. Despite much effort, the available pharmacotherapies fail to provide satisfactory pain relief for patients with persistent pain. Chronic pain is perhaps the most promising area where kinin receptor antagonists could prove to be useful. In this study we sought to analyse the contribution of both B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) and B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) kinin receptors to the peripheral neuropathy induced by paclitaxel (PTX), a widely used chemotherapeutic agent. Also, we have investigated whether kinins might mediate nociception and mechanical hyperalgesia by sensitizing transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel and special attempts were made in order to assess this possible interaction in PTX-induced peripheral neuropathy in mice. PTX treatment induced a significant increase in both mechanical and thermal hyperalgesia in mice (C57BL/6 and CD1 strains). Kinin B<sub>1</sub>R, B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>R (double knockout) deficient mice presented a significant reduction in PTX-induced hyperalgesic responses in comparison to wild-type animals. Of relevance, the intraperitoneal treatment of CD1 mice with the peptide kinin B<sub>1</sub>R or B<sub>2</sub>R antagonists (DALBK and Hoe 140, respectively) significantly inhibited both mechanical and thermal hyperalgesia when tested at 7 and 14 days after the first PTX injection. DALBK and Hoe 140 were also effective against PTX-induced mechanical hyperalgesia when injected centrally by the intrathecal route. Additionally, the intracerebroventricular injection of DALBK (but not Hoe 140) was effective in preventing mechanical hyperalgesia at later stages (14 days). This effect was associated to the increase in the expression of B<sub>1</sub>R (both mRNA and protein) in the mouse thalamus. Preventive chronic treatment with kinin receptor antagonists was not able to prevent the development of PTX-induced neuropathy. However, this treatment schedule was effective in transiently inhibiting mechanical hyperalgesia (for 24 h), and expressively inhibiting hyperalgesia to a hypotonic stimulus (an activator of TRPV4 channel mechanotransduction). Indeed, the TRPV4 channel was shown to be involved in the mechanical hyperalgesia induced by the selective B<sub>1</sub>R or B<sub>2</sub>R agonists (DABK and BK, respectively), and BK sensitized the animals to TRPV4 activators (4 $\alpha$ -PDD and hypotonicity) by triggering PLC/PKC signalling pathway. Corroborating this result, the chronic and preventive treatment with kinin receptor antagonists prevented PTX-induced PKC $\epsilon$  activation in the mouse paw, which seemed to be important to limit the increased sensitivity of PTX-tested mice to

hypotonicity. The present results demonstrated that kinins acting on both B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R play a crucial role in controlling PTX-induced peripheral neuropathy by sensitizing TRPV4 channels via PKC $\epsilon$  activation. This evidence supports the notion that selective kinin receptor antagonists might represent new and attractive therapeutic options for treating the chronic pain generated by chemotherapy.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b>	A deleção do gene para os receptores cininérgicos inibe a hiperalgesia induzida pelo paclitaxel (PTX) em camundongos .....	78
<b>Figura 2:</b>	O tratamento com paclitaxel (PTX) não altera o peso ou temperatura corporal de camundongos CD1 ou C57BL/6 (selvagens ou nocautes) .....	79
<b>Figura 3:</b>	Os receptores cininérgicos não interferem expressivamente com a gênese da hiperalgesia induzida pelo PTX .....	81
<b>Figura 4:</b>	Os receptores cininérgicos contribuem para a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX .....	83
<b>Figura 5:</b>	Os receptores cininérgicos contribuem para a manutenção da hiperalgesia térmica induzida pelo PTX .....	84
<b>Figura 6:</b>	Analgésicos utilizados clinicamente contra a dor crônica são eficazes sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pelo PTX .....	86
<b>Figura 7:</b>	Os receptores cininérgicos periféricos parecem não mediar a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX .....	88
<b>Figura 8:</b>	Os receptores cininérgicos da medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX .....	90
<b>Figura 9:</b>	Os receptores cininérgicos da medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX .....	92
<b>Figura 10:</b>	O tratamento com paclitaxel (PTX) aumenta a expressão do RNAm para o B <sub>1</sub> R no tálamo de camundongos .....	94
<b>Figura 11:</b>	O tratamento com paclitaxel (PTX) não altera expressivamente os níveis do RNAm para o B <sub>2</sub> R em diferentes tecidos de camundongos .....	95
<b>Figura 12:</b>	O tratamento com paclitaxel aumenta os níveis do B <sub>1</sub> R no tálamo .....	97

<b>Figura 13:</b>	O tratamento com paclitaxel (PTX) não altera a permeabilidade da barreira hematoencefálica de camundongos .....	98
<b>Figura 14:</b>	O canal TRPV4 medeia a hiperalgesia mecânica induzida pela bradicinina (BK) .....	100
<b>Figura 15:</b>	A bradicinina (BK) sensibiliza às respostas nociceptivas causadas pelos ativadores do TRPV4 .....	103
<b>Figura 16:</b>	Os efeitos nocivos da combinação entre bradicinina (BK) e hipotonicidade dependem do canal TRPV4 e receptor B <sub>2</sub> para as cininas..	105
<b>Figura 17:</b>	A injeção periférica do agonista seletivo para o receptor B <sub>1</sub> não altera o limiar mecânico ou os efeitos nocivos induzidos pela hipotonicidade em camundongos .....	113
<b>Figura 18:</b>	O canal TRPV4 medeia a hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista seletivo do receptor B <sub>1</sub> .....	116
<b>Figura 19:</b>	Envolvimento do canal TRPV4 na neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel (PTX) .....	119
<b>Figura 20:</b>	Combinação entre antagonistas cininérgicos e antagonista do TRPV4 sobre a hiperalgesia induzida pelo PTX .....	121
<b>Figura 21:</b>	Os receptores cininérgicos contribuem para a sensibilização à hipotonicidade induzida pelo PTX .....	123
<b>Figura 22:</b>	O pré-tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores cininérgicos não alterou a translocação de PKC $\alpha$ para a membrana .....	125
<b>Figura 23:</b>	O pré-tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores cininérgicos inibe a ativação e expressão de PKC $\epsilon$ na pata de camundongos tratados com PTX .....	126
<b>Figura 24:</b>	O ativador seletivo da PKC $\epsilon$ sensibiliza camundongos à hipotonicidade .....	128
<b>Figura 25:</b>	A ativação da enzima PKC $\epsilon$ sensibiliza camundongos aos efeitos nocivos da hipotonicidade no modelo de neuropatia induzida pelo paclitaxel (PTX) .....	130

**Figura 26:** Representação dos possíveis mecanismos envolvidos no papel dos receptores cininérgicos na neuropatia induzida pelo paclitaxel (PTX) em camundongos ..... 150



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b>	Porcentagens de inibição para os tratamentos com gabapentina (Gaba), morfina e antagonistas seletivos dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> das cininas, DALBK e Hoe 140, respectivamente, sobre a hiperalgisia induzida pelo PTX .....	85
<b>Tabela 2:</b>	Efeito de diferentes inibidores sobre a nocicepção declarada induzida pela combinação de bradicinina (BK; 0,3 nmol/pata, 5 minutos antes) e hipotonicidade (10 µL de água ultrapura, 18 mOsm) .....	108
<b>Tabela 3:</b>	Efeito de diferentes inibidores sobre a hiperalgisia mecânica induzida pela combinação de bradicinina (BK; 0,3 nmol/pata, 5 minutos antes) e hipotonicidade (10 µL de água ultrapura, 18 mOsm) .....	109



## Lista de abreviaturas

<b>4<math>\alpha</math>-PDD</b>	-	4 $\alpha$ -forbol 12, 13-didecanoato
<b>ATC</b>	-	Antidepressivo tricíclico
<b>B<sub>1</sub>R</b>	-	Receptor B <sub>1</sub>
<b>B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup></b>	-	Animal com deleção gênica para o receptor B <sub>1</sub>
<b>B<sub>2</sub>R</b>	-	Receptor B <sub>2</sub>
<b>B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup></b>	-	Animal com deleção gênica para o receptor B <sub>2</sub>
<b>BHE</b>	-	Barreira hematoencefálica
<b>BK</b>	-	Bradicinina
<b>CGRP</b>	-	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>COX</b>	-	Ciclooxigenase
<b>DABK</b>	-	Des-Arg <sup>9</sup> -bradicinina
<b>DALBK</b>	-	Des-Arg <sup>9</sup> [Leu <sup>8</sup> ]-bradicinina
<b>g</b>	-	Gramas
<b>G</b>	-	Gauge
<b>GRD</b>	-	Gânglio da raiz dorsal
<b>h</b>	-	Horas
<b>Hipo</b>	-	Hipotonicidade
<b>i.c.v.</b>	-	Intracerebroventricular
<b>i.p.</b>	-	Intraperitoneal
<b>i.pl.</b>	-	Intraplantar
<b>i.t.</b>	-	Intratecal
<b>IASP</b>	-	Associação Internacional do Estudo da Dor
<b>Iso</b>	-	Isotonicidade
<b>ISRS</b>	-	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
<b>min</b>	-	Minutos
<b>NPIQ</b>	-	Neuropatia periférica induzida por quimioterápico
<b>Osm</b>	-	Osmolaridade
<b>PGE<sub>2</sub></b>	-	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	-	Proteína quinase A
<b>PKC</b>	-	Proteína quinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	-	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	-	Fosfolipase C
<b>PTX</b>	-	Paclitaxel
<b>s</b>	-	Segundos
<b>s.c.</b>	-	Subcutânea
<b>SNC</b>	-	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	-	Substância P
<b>TRP</b>	-	Receptor de potencial transitório
<b>v.o.</b>	-	Via oral



## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
DOR .....	28
DOR NEUROPÁTICA .....	30
NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS .....	33
TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA .....	36
SISTEMA CALICREÍNAS-CININAS .....	40
PAPEL DAS CININAS NA DOR .....	42
INTERAÇÃO ENTRE CININAS E RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO .....	45
RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 4 (TRPV4) .....	47
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
OBJETIVO GERAL .....	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>3 - MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>PARTE I - ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL</b> .....	<b>51</b>
1 – ANIMAIS .....	51
2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	52
2.1 – Tratamento com o quimioterápico paclitaxel .....	52
2.2 – Experimentos comportamentais .....	52
<i>Avaliação da hiperalgesia mecânica</i> .....	52
<i>Avaliação da hiperalgesia térmica</i> .....	53
<i>Nociceção declarada</i> .....	53
2.3 – Administração intratecal (i.t.) de drogas .....	54
2.4 – Administração intracerebroventricular (i.c.v.) de drogas .....	54
2.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	55
2.6 – Imunoistoquímica .....	57
2.7 – Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica .....	59
3 – PROTOCOLOS .....	59
3.1 - Investigação da participação dos receptores cininérgicos na hiperalgesia induzida pelo PTX .....	59
3.2 - Avaliação do envolvimento dos receptores cininérgicos na gênese na hiperalgesia induzida pelo PTX....	60

3.3 - Avaliação do envolvimento dos receptores cininérgicos na manutenção na hiperalgesia causada pelo PTX .....	60
3.4 - Efeito da gabapentina e morfina sobre a hiperalgesia induzida pelo PTX .....	61
3.5 - Efeito do tratamento periférico com antagonistas dos receptores cininérgicos sobre a hiperalgesia causada pelo PTX .....	61
3.6 - Efeito da injeção periférica de agonistas dos receptores cininérgicos sobre a nocicepção declarada em animais tratados com PTX .....	61
3.7 - Efeito do tratamento intratecal (i.t.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) com antagonistas dos receptores cininérgicos sobre a hiperalgesia causada pelo PTX .....	62
<b>PARTE II - INTERAÇÃO ENTRE RECEPTORES CININÉRGICOS E TRPV4: RELEVÂNCIA PARA A NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL .....</b>	<b>62</b>
1 – ANIMAIS .....	62
2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	63
2.1 – Experimentos comportamentais .....	63
<i>Nocicepção declarada</i> .....	63
<i>Avaliação da hiperalgesia mecânica</i> .....	64
2.2 - Hiperlgesia mecânica induzida pelo PTX .....	64
2.3 - Sensibilidade à hipotonicidade em animais tratados com PTX .....	65
2.4 – Imunodeteccção de proteínas por <i>western blot</i> .....	65
3 – PROTOCOLOS .....	68
3.1 - Efeito do tratamento com um antagonista seletivo para o canal TRPV4 sobre a nocicepção declarada e hiperalgesia mecânica induzidas pela BK .....	68
3.2 - Avaliação do possível efeito sensibilizador da BK sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo agonista seletivo do canal TRPV4 ou pela hipotonicidade .....	68
3.3 - Efeito do tratamento com diferentes antagonistas e inibidores sobre a nocicepção declarada e hiperalgesia mecânica induzidas pela combinação de BK e hipotonicidade .....	69
3.4 - Efeito da injeção intraplantar (i.pl.) do agonista seletivo do receptor B <sub>1</sub> sobre o limiar mecânico de camundongos .....	70

3.5 - Avaliação do possível efeito sensibilizador do agonista seletivo do receptor B <sub>1</sub> sobre as respostas nociceptivas induzidas pela hipotonicidade .....	70
3.6 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de DABK .....	70
3.7 - Avaliação da co-injeção intratecal (i.t.) do peptídeo DABK e agonista seletivo do canal TRPV4 ou solução hipotônica sobre o limiar mecânico de camundongos .....	71
3.8 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX .....	71
3.9 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo do TRPV4 sobre a nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com PTX .....	71
3.10 - Efeito da combinação de antagonistas cininérgicos e do canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX .....	72
3.11 - Efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre a nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com PTX .....	72
3.12 – Efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre a expressão das enzimas PKC $\alpha$ e PKC $\epsilon$ em animais tratados com PTX .....	73
3.13 - Avaliação do possível efeito sensibilizador do peptídeo $\psi$ εRACK sobre as respostas nociceptivas induzidas pela hipotonicidade .....	73
3.14 - Efeito do tratamento com um inibidor seletivo da PKC $\epsilon$ sobre a nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com PTX .....	73
<b>SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS .....</b>	<b>74</b>
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>75</b>
<b>4 - RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
<b>PARTE I - ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL .....</b>	<b>76</b>
1 - Indução de hiperalgesia mecânica e térmica pelo tratamento com paclitaxel em camundongos .....	76
2 - Investigação da participação dos receptores cininérgicos na hiperalgesia pelo paclitaxel .....	76

3 - Avaliação do envolvimento dos receptores cininérgicos na gênese da hiperalgisia causada pelo paclitaxel .....	80
4 - Avaliação do envolvimento dos receptores cininérgicos na manutenção na hiperalgisia causada pelo paclitaxel .....	82
5 - Efeito do tratamento com gabapentina ou morfina sobre a hiperalgisia induzida pelo paclitaxel .....	84
6 - Efeito do tratamento periférico com antagonistas dos receptores cininérgicos sobre a hiperalgisia causada pelo paclitaxel .....	87
7 - Efeito da injeção periférica de agonistas dos receptores cininérgicos sobre a nocicepção declarada em animais tratados com paclitaxel .....	87
8 - Efeito do tratamento intratecal com antagonistas dos receptores cininérgicos sobre a hiperalgisia causada pelo paclitaxel .....	89
9 - Efeito do tratamento intracerebroventricular com antagonistas dos receptores cininérgicos sobre a hiperalgisia causada pelo paclitaxel .....	91
10 - Quantificação do RNAm para os receptores cininérgicos após o tratamento com paclitaxel .....	93
11 - Quantificação da expressão do B <sub>1</sub> R no tálamo após o tratamento com paclitaxel .....	96
12 - Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica ao corante azul de Evans em animais tratados com paclitaxel .....	98
<b>PARTE II - INTERAÇÃO ENTRE RECEPTORES CININÉRGICOS E TRPV4: RELEVÂNCIA PARA A NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL .....</b>	<b>99</b>
1 - Efeito do tratamento o antagonista seletivo para o canal TRPV4 sobre as respostas nociceptivas induzidas pela bradicinina .....	99
2 - Avaliação do possível efeito sensibilizador da bradicinina ao agonista seletivo do canal TRPV4 .....	101
3 - Avaliação do possível efeito sensibilizador da bradicinina à hipotonicidade .....	102
4 - Efeito do tratamento com antagonistas seletivos para o canal TRPV4 e receptores cininérgicos sobre as respostas nociceptivas induzidas pela combinação de bradicinina e hipotonicidade .....	104

5 - Avaliação do envolvimento de produtos de ciclooxigenases e da liberação de catecolaminas nas respostas nociceptivas induzidas pela combinação de bradicinina e hipotonicidade .....	106
6 - Avaliação do envolvimento da enzima fosfolipase A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) nas respostas nociceptivas induzidas pela combinação de bradicinina e hipotonicidade .....	106
7 - Avaliação do envolvimento da enzima proteína quinase A (PKA) Nas respostas nociceptivas induzidas pela combinação de bradicinina e hip.....	107
8 - Avaliação do envolvimento das enzimas fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C (PKC) Nas respostas nociceptivas induzidas pela combinação de bradicinina e hipotonicidade .....	110
9 - Avaliação do envolvimento do canal TRPV1 nas respostas nociceptivas induzidas pela combinação de bradicinina e hipotonicidade .....	111
10 - Efeito da injeção intraplantar do agonista seletivo do receptor B <sub>1</sub> sobre o limiar mecânico de camundongos .....	111
11 - Avaliação do possível efeito sensibilizador do agonista seletivo do receptor B <sub>1</sub> sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo hipotonicidade .....	112
12 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intratecal de DABK .....	114
13 - Avaliação da co-injeção intratecal do peptídeo DABK e agonista seletivo do canal TRPV4 sobre o limiar mecânico de camundongos .....	114
14 - Avaliação da co-injeção intratecal do peptídeo DABK e solução hipotônica sobre o limiar mecânico de camundongos .....	115
15 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo paclitaxel .....	117
16 - Efeito da administração intraplantar de solução hipotônica em animais tratados com paclitaxel .....	117
17 - Efeito da combinação de antagonistas cininérgicos e do canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo paclitaxel .....	120

18 - Efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre a nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com paclitaxel .....	122
19 - Efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre os níveis das enzimas PKC $\alpha$ e PKC $\epsilon$ após o tratamento com paclitaxel .....	124
20 - Avaliação do possível efeito sensibilizador do peptídeo $\psi$ εRACK sobre as respostas nocivas induzidas pela hipotonicidade .....	127
21 - Avaliação do envolvimento da enzima PKC $\epsilon$ na nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com paclitaxel .....	129
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>131</b>
<b>6 - SUMÁRIO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>151</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>154</b>

## **1 - INTRODUÇÃO**

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que o câncer acometeu cerca de 13 milhões de pessoas mundialmente no ano de 2008, e foi responsável por 7,6 milhões de mortes (OMS, 2012a). Entre os tipos de câncer mais frequentes na população mundial encontram-se os de pulmão, mama, colorretal, estômago e próstata (OMS, 2012b). No Brasil, estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam cerca de 520 mil novos casos de câncer para o ano de 2012 (INCA, 2011).

Embora os dados e estimativas acerca da epidemiologia do câncer sejam alarmantes, a taxa de sobrevivência a estas doenças vem aumentando, e isso se deve aos avanços no tratamento do câncer obtido nas últimas décadas. A quimioterapia do câncer conta com um arsenal de fármacos que abrange centenas de quimioterápicos. Apesar da eficácia destes fármacos em limitar ou inibir o crescimento tumoral, a quimioterapia é frequentemente acompanhada de efeitos adversos que dificultam a adesão do paciente ao tratamento, podendo levar à redução da dose necessária para o efeito antitumoral ou, até mesmo, à interrupção do tratamento. Os efeitos adversos ocorrem porque os agentes citotóxicos não agem somente em células tumorais, mas também em células saudáveis. Os principais efeitos adversos associados à quimioterapia do câncer são supressão da medula óssea, lesões no trato gastrointestinal, náuseas, vômitos, queda de cabelo e neuropatia periférica (THURSTON, 2006).

A neuropatia periférica pode manifestar-se como alterações sensoriais, caracterizadas por parestesia/disestesia e dor. Estes sintomas podem ser incapacitantes, afetando as atividades diárias e a qualidade de vida dos pacientes. Além de dificultar a adesão à quimioterapia, os sintomas da neurotoxicidade sensorial podem se tornar crônicos em alguns indivíduos, manifestando-se por meses ou anos após a interrupção do tratamento. Portanto, a busca de melhorias no tratamento do câncer não consiste apenas em desenvolver novas abordagens terapêuticas específicas, mas também em descobrir

formas de amenizar ou prevenir os efeitos adversos associados à quimioterapia, especialmente a dor neuropática.

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na transmissão da dor, até o momento não há terapia eficaz para a prevenção e/ou tratamento da dor crônica. Neste contexto, vale destacar que a dor crônica é uma das principais patologias onde o sistema caliceínas-cininas, bem como seus receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, pode se tornar um importante alvo para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas clinicamente mais eficazes (CAMPOS et al., 2006; HUANG; PLAYER, 2010).

O presente estudo se propôs a estudar o possível envolvimento de receptores cininérgicos na indução e manutenção da hiperalgesia associada à neuropatia causada pelo quimioterápico paclitaxel (PTX). O PTX é um alcaloide derivado da *Taxus brevifolia* e comercializado como Taxol<sup>®</sup>, o qual é amplamente empregado no tratamento dos cânceres de próstata, mama, ovário e pulmão de células do tipo não pequenas (THURSTON, 2006). Este estudo foi motivado pelos seguintes fatores: i) aumento das estimativas mundiais de incidência de câncer; ii) limitação no uso do PTX pela ocorrência de neuropatia periférica; iii) aumento nas taxas de sobrevivência ao câncer e, conseqüentemente, das sequelas causadas pela quimioterapia; e iv) a eficácia do PTX contra alguns dos cânceres mais comuns na população mundial.

## **DOR**

A dor é um mecanismo fisiológico de defesa contra agentes nocivos externos ou lesão tecidual. Esta modalidade sensorial é fruto da ativação de neurônios sensoriais especializados, chamados de nociceptores, e de mecanismos que envolvem vias espinhais e supraespinhais. Além disso, a dor pode ser modulada por uma série de fatores comportamentais, emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (BASBAUM et al., 2009).

Considerando-se a subjetividade da dor, é importante conceituar os termos dor e nocicepção. Nocicepção refere-se

somente à percepção sensorial no sistema nervoso central (SNC), evocada pela ativação de nociceptores existentes no tecido estimulado. A dor envolve áreas corticais com ativação dos componentes discriminativo, afetivo-motivacional, cognitivo e locomotor (RIEDEL; NEECK, 2001). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial” (IASP, 2012). É importante mencionar que a sensação dolorosa é comumente acompanhada de alterações sensoriais descritas na literatura como hiperalgesia (sensibilidade aumentada a um estímulo doloroso), alodinia (percepção de estímulo inócuo como sendo doloroso) e hiperestesia (sensibilidade aumentada dos neurônios sensoriais a estímulos sensitivos) (IASP, 2012).

Após ativação de terminações sensoriais livres, o sinal nociceptivo é transmitido através de fibras aferentes primárias para os neurônios secundários do corno dorsal na medula espinhal. Estes, por sua vez, transmitem estas informações para núcleos do tálamo e tronco encefálico através de vias ascendentes que integram os tratos espinho-talâmico e espinho-reticulo-talâmico, respectivamente. A partir destes núcleos, a informação nociceptiva atinge o córtex cerebral, onde a dor é interpretada em função da ativação de diferentes áreas. Por exemplo, a ativação do córtex somatosensorial é relevante para os aspectos sensorio-discriminativos da dor (ou seja, onde está o estímulo e quão intenso ele é). Já os aspectos emocionais e aversivos da dor são associados à ativação do córtex insular, giro cingulado anterior e amígdala. A ativação do córtex pré-frontal, gânglio basal e cerebelo tem sido reportada, embora não seja clara a importância destas estruturas para a dor (JULIUS; BASBAUM, 2001; WOOLF; MA, 2007; BASBAUM et al., 2009; TODD, 2010).

As fibras aferentes primárias são divididas em três categorias (MILLAN, 1999). O primeiro grupo é constituído pelas fibras A $\alpha$  e A $\beta$ , as quais possuem corpos celulares de grande diâmetro, mielinização expressiva e condução rápida, e são responsáveis pela informação proprioceptiva (toque leve e pressão). Na segunda classe encontram-se as fibras C, as quais

são formadas por neurônios de corpos celulares de pequeno e médio diâmetro, são amielinizadas e apresentam velocidade de condução lenta (aproximadamente 0,5-2 m/s). Por fim, existem as fibras A $\delta$  pouco mielinizadas e de condução rápida, quando comparadas às fibras C (aproximadamente 5-30 m/s). A maior parte dos nociceptores é representada por fibras C e A $\delta$ , incluindo os nociceptores polimodais, que são ativados por uma variedade de estímulos mecânicos, químicos e térmicos (MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999; STUCKY et al., 2001). Em condições normais, apenas as fibras C e A $\delta$  transmitem informações nociceptivas. Porém, tem sido demonstrada a participação das três categorias de fibras sensoriais nos processos de dor persistente (WOOLF; SALTER, 2000; WOOLF, 2011).

Em relação à duração, a dor pode ser classificada em transitória, aguda ou crônica. Tanto na dor transitória como na dor aguda, a causa é bem definida e o curso de ambas é limitado, podendo desaparecer antes mesmo da remoção da causa ou do reparo do dano tecidual. No entanto, a dor crônica é geralmente causada por lesões ou doenças que superam a capacidade do organismo de reverter o quadro, podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial, estendendo-se por meses ou anos e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (LOESER; MELZACK, 1999).

## **DOR NEUROPÁTICA**

A dor neuropática é definida pela IASP como “distúrbio da função ou alterações patológicas de células nervosas” (IASP, 2012). As neuropatias que causam dor em humanos podem resultar de lesão nervosa, uso crônico de determinados fármacos (vincristina, cisplatina e paclitaxel) ou ainda estarem associadas a algumas doenças (câncer, herpes, AIDS) ou transtornos metabólicos (diabetes). As neuropatias são difíceis de diagnosticar ou tratar (JENSEN; BARÓN, 2003), e estima-se que 1 % da população mundial sofra de dor neuropática (NICHOLSON, 2000).

Estas síndromes podem apresentar uma combinação de sintomas, que incluem sintomas negativos (prejuízos sensoriais), como perda completa ou parcial da sensibilidade, e sintomas positivos como parestesia, disestesia (sensações cutâneas subjetivas como formigamento, dormência e picada) e dor. A sensação permanente de dor em queimação é relatada, e parece decorrer da atividade espontânea das fibras C nociceptivas, as quais também promovem sensibilização dos neurônios do corno dorsal na medula espinhal. Da mesma maneira, a atividade espontânea de fibras A está relacionada à parestesia e, após sensibilização do SNC, à disestesia e à dor (WOOLF; MANNION, 1999).

Os mecanismos patofisiológicos da dor neuropática envolvem eventos periféricos e centrais. Após a lesão do nervo são liberados periféricamente componentes inflamatórios em resposta à degeneração dos axônios ou células de Schwann, as quais podem ser causadas pela própria lesão ou falta de suprimento energético oriundo do corpo celular. Estes mediadores podem ser liberados a partir da fibra nervosa lesionada ou de células como neutrófilos e macrófagos que migram para o sítio da lesão. Entre os muitos mediadores químicos liberados incluem-se a serotonina, substância P (SP), histamina, bradicinina (BK), fator de ativação plaquetária (PAF), além de produtos das vias da ciclooxigenase e da lipoxigenase, os quais são capazes de sensibilizar as fibras sensoriais periféricas. Esta cascata de eventos causa aumento na expressão e/ou atividade de canais iônicos nos neurônios nociceptivos, como canais de sódio, cálcio e de potencial transitório (TRP), resultando em hiperexcitabilidade neuronal (SCHOLZ; WOOLF, 2007; REN; DUBNER, 2010). Na porção proximal à lesão forma-se um neuroma, que produz descargas ectópicas que chegam ao SNC e são interpretadas como originadas do membro lesionado (MACFARLANE et al., 1997). As descargas ectópicas periféricas provocam reorganização e alterações nas fibras sensoriais que chegam ao corno dorsal e, como consequência, a dor passa progressivamente a ser controlada por vias centrais,

resultando na sua amplificação e persistência (KUNER, 2010; WOOLF, 2011).

As projeções dos neurônios nociceptivos do GRD aos neurônios espinhais aumentam a excitabilidade através da liberação de substância P, CGRP e glutamato. O neurônio de segunda ordem, o qual é normalmente ativado pela ação do glutamato sobre os receptores do tipo AMPA, é induzido a disparar de forma espontânea (sensibilização central) através da ativação do receptor NMDA. A estimulação do neurônio de segunda ordem induz o aumento do cálcio intracelular e ativação de proteínas quinases que fosforilam proteínas intracelulares tais, como receptores NMDA, amplificando a resposta destas células (WOOLF; SALTER, 2000). A sensibilização central está implicada com o fenômeno de hiperalgesia secundária, isto é, hiperalgesia em sítios vizinhos à lesão (WOOLF, 2011).

Centralmente, ainda ocorre a perda do controle inibitório da dor, causado pela diminuição dos receptores para opióides e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e por morte de interneurônios inibitórios em virtude da excitotoxicidade neuronal. Destaca-se ainda, alterações na facilitação e na inibição descendente da dor. Além disso, as fibras A $\beta$  (de baixo limiar), que normalmente transmitem estímulos mecânicos inócuos, reorganizam-se anatomicamente e passam a estabelecer sinapse com neurônios nociceptivos de segunda ordem na medula espinhal, contribuindo para o surgimento da hiperalgesia e alodinia mecânica (MACFARLANE et al., 1997; WOOLF; MANNION, 1999; WOOLF; SALTER, 2000; KUNER, 2010). A ativação de células gliais na medula espinhal, como microglia e astrócito, também parece desempenhar um papel importante na facilitação da transmissão da dor crônica, através da liberação de mediadores pró-inflamatórios e glutamato (SCHOLZ; WOOLF, 2007; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

## **NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS**

A neuropatia periférica é um efeito adverso comum causado por diversos quimioterápicos, incluindo os derivados de platina (cisplatina, oxaliplatina, carboplatina), alcaloides da vinca (vincristina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), bortezomibe e talidomida. A neuropatia periférica induzida por quimioterápico (NPIQ) pode ocorrer de três formas: i) autonômica, ii) motora e/ou iii) sensorial. Esta última, é a forma mais frequente entre os quimioterápicos. A ocorrência de neuropatia sensorial induzida pela quimioterapia varia entre os estudos, podendo atingir até 52% para cisplatina, 45% para vincristina e 33% para o paclitaxel (ARGYRIOU et al., 2012). Contudo, a neuropatia causada pelos taxanos pode atingir entre 7 e 67% dos pacientes (SMITH et al., 1999; ARGYRIOU et al., 2005). Estas taxas podem sofrer alterações de acordo com a intensidade da dose, número de ciclos de tratamento quimioterápico, idade do paciente, duração do tratamento, coadministração de outras drogas neurotóxicas, bem como pela presença de condições predisponentes, tais como diabetes, alcoolismo ou neuropatia pré-existente (ARGYRIOU et al., 2012).

A neuropatia sensorial pode manifestar-se como parestesia ou disestesia, dor em queimação, bem como alodinia mecânica e ao frio. A neuropatia causada pelos taxanos normalmente apresenta distribuição em “luva e meia”, ou seja, inicia acometendo as extremidades dos membros superiores e inferiores, e progride para regiões proximais do corpo. Além disso, nos casos mais severos de toxicidade podem ocorrer diminuição da percepção de vibração e posição, perda das sensações de temperatura e dor, e prejuízo no reflexo de tendão. Em casos mais severos de NPIQ podem ocorrer sintomas autonômicos e/ou motores. Os sintomas autonômicos incluem distúrbios cardiovasculares (alteração na pressão arterial), gastrintestinais (constipação), hipotensão ortostática, problemas de ereção e retenção urinária; já os sintomas motores normalmente se manifestam como fraqueza distal (como fraqueza

nos pés), distúrbios de marcha e equilíbrio, e dificuldades com movimentos finos (escrever, abotoar roupas, corte e costura). O comprometimento motor, com fraqueza distal ou proximal e miopatia, pode ocorrer com os taxanos, porém é pouco frequente (CARLSON; OCEAN, 2011; ARGYRIOU et al., 2012).

A NPIQ do tipo sensorial dificulta a adesão dos pacientes ao tratamento e, frequentemente, leva a ajustes (diminuição) na dose eficaz contra o câncer ou, até mesmo, interrupção da quimioterapia. Ademais, a dor causada pela quimioterapia é um fator adicional para a diminuição da qualidade de vida do paciente oncológico, o qual normalmente já é acometido pela dor causada pela própria doença. Outro fator que reforça a importância clínica da NPIQ é o fato de que ela pode causar dor crônica, com duração de meses ou anos. Por exemplo, 35% dos pacientes tratados com derivados da platina ainda apresentaram sintomas da neuropatia periférica após 5 ou 6 anos da interrupção da quimioterapia. A neuropatia periférica causada pelos taxanos pode se resolver entre 3-6 meses após a interrupção do tratamento, mas há casos onde ela se torna crônica (PIETRANGELI et al., 2006; BROUWERS et al., 2009 apud ARGYRIOU et al., 2012, p. 5).

A dor crônica afeta severamente a qualidade de vida dos indivíduos, uma vez que é frequentemente associada com distúrbios do sono, e emocionais, como depressão e ansiedade. Adicionalmente a estes fatores, a dor crônica causada pela quimioterapia frequentemente relembra os indivíduos o período em que tiveram câncer; além de remeter a pensamentos de que o câncer pode retornar. É importante mencionar que o câncer por si só pode induzir dor crônica por afetar a integridade de fibras sensoriais ou da medula espinhal, pela infiltração de células neoplásicas ou compressão de nervos pelo tumor. Ainda, a infecção pelo vírus *Varicela zoster*, frequente em pacientes com câncer, pode causar dor crônica. É possível que haja sinergismo entre os mecanismos da dor do câncer e os da dor causada pela quimioterapia para induzir a dor crônica em pacientes oncológicos; no entanto, ainda não há estudos suficientes para dar base a tal hipótese.

O sistema nervoso periférico é vulnerável à ação tóxica de várias drogas, uma vez que é desprovido de barreira hematoencefálica (BHE). Assim, a toxicidade induzida pelos quimioterápicos pode causar danos aos neurônios sensoriais periféricos, especialmente por afetarem seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD). Estes danos podem causar a perda de fibras sensoriais (evidenciada por degeneração das terminações nervosas), influenciando a atividade das fibras remanescentes. Alguns mecanismos têm sido propostos como responsáveis pelo dano neuronal causado pela quimioterapia (JAGGI; SINGH, 2012), sendo que em relação aos taxanos, acredita-se que o efeito tóxico destes fármacos sobre os aferentes primários ocorra por atuarem sobre a dinâmica dos microtúbulos, o que impediria o funcionamento normal do citoesqueleto celular e, conseqüentemente, comprometeria o transporte axonal de proteínas, vesículas e organelas (CARLSON; OCEAN, 2011). Além disso, há fortes evidências do envolvimento de disfunção mitocondrial, levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio (excitotoxicidade neuronal) e estresse oxidativo. Tais eventos podem desencadear apoptose celular, a qual seria responsável pela degeneração de fibras sensoriais periféricas (FLATTERS; BENNETT, 2006; FIDANBOYLY; GRIFFITHS; FLATTERS, 2011; JAGGI; SINGH, 2012).

Ainda, outros mecanismos estão envolvidos na neurotoxicidade causada pelos taxanos, os quais podem ser causa ou consequência dos eventos citados acima. A produção de mediadores inflamatórios é um evento comum a muitas condições de dor crônica, entre elas a dor neuropática, especialmente a causada por lesão de nervos. Além disso, há evidências da produção destes mediadores na neuropatia causada por quimioterápicos. Utilizando-se o modelo de neuropatia induzida pelo PTX ou vincristina, Siau e colaboradores (2006) verificaram aumento no número de células de Langerhans na epiderme de roedores, as quais podem liberar mediadores como óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e fatores neurotróficos, os quais podem sensibilizar/ativar os neurônios sensoriais remanescentes.

A produção de IL-1 e TNF $\alpha$  por macrófagos no GRD de roedores também foi reportada para o modelo do PTX (LEDEBOER et al., 2007). Estudos também sugerem o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios produzidos pela microglia na medula espinhal no modelo da neuropatia induzida pelo PTX ou vincristina (JAGGI; SINGH, 2012).

Recentemente, foi verificado aumento da atividade da enzima triptase, um ativador do receptor ativado por proteínases-2 (PAR-2), na pele, GRD e medula espinhal de camundongos tratados com PTX (CHEN; YANG; WANG et al., 2011). Estes mesmos autores sugeriram que a ativação do PAR-2 levaria à sensibilização dos canais de potencial transitório TRPA1, TRPV1 e TRPV4, via ativação intracelular das proteínas quinases A (PKA) e C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), contribuindo para a hiperalgesia mecânica e térmica (CHEN et al., 2011). De fato, o envolvimento da PKA e PKC $\epsilon$  na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX foi previamente reportado (DINA et al., 2001). Além disso, o papel destas quinases na sensibilização de canais TRP é bem conhecido (WOOLF; MA, 2007). Ainda, estudos conduzidos pelo grupo do Dr. John Levine, implicaram a participação do canal TRPV4 na neuropatia causada pela vincristina e PTX (ALESSANDRI-HABER et al., 2004; 2008).

Os dados apresentados acima demonstram o avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na NPIQ, especialmente pelos taxanos. Porém, até o momento, estes avanços não repercutiram em terapias eficazes para a prevenção e/ou tratamento da NPIQ. Na próxima seção, serão apresentadas as opções atuais para o tratamento da dor neuropática e NPIQ, bem como a eficácia e efeitos adversos destas classes de fármacos.

## **TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA**

A dor neuropática é de difícil tratamento, pois a maior parte das terapias disponíveis para o tratamento da dor não costumam funcionar na maioria dos pacientes com esta patologia. O tratamento da NPIQ pode ser dividido em sintomático e

preventivo (WOLF et al., 2008; KELEY; DE-ANGELIS, 2009). O tratamento sintomático pode ser empregado tanto durante a quimioterapia, para tentar aumentar a adesão do paciente ao tratamento quimioterápico, quanto contra a dor crônica estabelecida. Já o tratamento preventivo consiste na administração de alguns compostos, durante a quimioterapia, os quais podem diminuir a ocorrência e/ou severidade da neuropatia periférica. As opções para o tratamento sintomático não são específicas para a NPIQ e consistem no emprego de fármacos utilizados para outras formas de dor neuropática. Dentre os tratamentos farmacológicos disponíveis na clínica incluem-se antidepressivos, anticonvulsivantes, analgésicos opióides e anestésicos locais.

Os antidepressivos tricíclicos (ATC), como amitriptilina e nortriptilina, têm sido utilizados no tratamento da dor neuropática de diferentes etiologias, como a neuropatia diabética. Seus efeitos analgésicos parecem ser independentes dos efeitos antidepressivos, pois em doses menores do que quando utilizados para a depressão, eles são efetivos contra a dor. Os mecanismos envolvidos no efeito analgésico destes fármacos não são bem conhecidos, mas sugere-se que envolvam a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina na medula espinhal, o que aumentaria os níveis destes neurotransmissores e controlaria a transmissão espinhal da dor. No entanto, os ATC apresentaram baixa eficácia contra a NPIQ em estudos clínicos (HAMMACK et al., 2002; KAUTIO et al., 2008). Além disso, a utilização destes fármacos é limitada em virtude de sua ação lenta (de dias a semanas) e dos seus efeitos adversos, tais como confusão mental, tontura, sedação, boca seca, retenção urinária e da toxicidade cardíaca (O'CONNOR; DWORKIN, 2009). Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como venlafaxina e duloxetina, também têm sido usados no tratamento da dor neuropática, e a eficácia contra a dor causada pela neuropatia diabética ou neuropatia pós-herpética foi comprovada em estudos clínicos. No entanto, não há estudos controlados sobre a eficácia destes fármacos na NPIQ. Os ISRSs não apresentam os efeitos

adversos causados pelos ATCs; porém, os custos do tratamento com estes fármacos são mais elevados.

Outra classe de fármacos indicada para o tratamento da dor neuropática são os anticonvulsivantes como gabapentina, pregabalina, carbamazepina, fenitoína e lamotrigina. Estes fármacos atuam reduzindo a hiperexcitabilidade de neurônios periféricos por inibirem a atividade de canais de cálcio (subunidade  $\alpha_2\text{-}\delta_1$ ; gabapentina e pregabalina) ou sódio (carbamazepina, lamotrigina). A carbamazepina e fenitoína apresentam alto índice de efeitos colaterais. A carbamazepina apresenta alívio limitado da dor neuropática, e o tratamento se torna difícil em função da janela terapêutica ser normalmente estreita e, principalmente, dos efeitos colaterais como sonolência, tonturas, sintomas gastrointestinais, edema periférico, ataxia e fadiga muscular. A gabapentina e pregabalina, drogas anticonvulsivantes mais novas, apresentam melhor tolerabilidade, embora possam causar tontura, sedação e edema periférico (O'CONNOR; DWORKIN, 2009). Apesar da eficácia contra a dor neuropática de diferentes origens (neuropatia diabética, neuralgia pós-herpética, dor do membro fantasma, polineuropatia dolorosa), a gabapentina e pregabalina foram ineficazes contra NPIQ em estudos clínicos (RAO *et al.*, 2007). Resultado semelhante foi observado para a lamotrigina (RAO *et al.*, 2008). Na prática clínica, tem sido observado que a gabapentina e pregabalina são terapias mais eficazes para o tratamento da dor neuropática em comparação aos ATCs; no entanto, os custos do tratamento com anticonvulsivantes são mais elevados.

Os analgésicos opióides (morfina, oxicodona, metadona ou tramadol), usados no tratamento da dor de diferentes etiologias, são a segunda escolha no tratamento da dor neuropática (O'CONNOR; DWORKIN, 2009). Estes fármacos são agonistas de receptores opióides ( $\delta$ ,  $\kappa$  e  $\mu$ ), e seus efeitos analgésicos se devem pela interação com estes receptores na periferia e/ou no sistema nervoso central. Periféricamente, os opióides diminuem a excitabilidade de aferentes sensoriais primários por promoverem o fechamento de canais de cálcio dependentes de voltagem e a abertura de canais de potássio. Este efeito pode ocorrer também

sobre as terminações centrais dos aferentes primários na medula espinhal. Além disso, a ação supra-medular dos opióides resulta na ativação de vias descendentes inibitórias envolvidas no controle da dor. O tramadol, além de ser um agonista  $\mu$ -opióide, também inibe a recaptção de serotonina e noradrenalina, o que pode estar associado ao seu efeito analgésico. Apesar da alta e rápida eficácia contra diferentes tipos de dor, até o presente momento não há estudos clínicos sobre o efeito dos opióides na NPIQ. O uso crônico de opióides é limitado devido ao potencial de causar dependência e tolerância. Além disso, o uso destes fármacos pode causar outros efeitos indesejados como náuseas, vômitos, constipação, sonolência e tontura (O'CONNOR; DWORKIN, 2009).

Também estão disponíveis tratamentos tópicos para da dor neuropática, incluindo o adesivo de lidocaína 5% e o gel de capsaicina 8%. Esses tratamentos funcionam localmente, diretamente no sítio de aplicação, com efeitos sistêmicos mínimos. A lidocaína atua através do bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem, enquanto a capsaicina causa dessensibilização de canais de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1). No início do tratamento, a capsaicina pode causar uma sensação de queimação no local da aplicação, que parece ser reduzida nas aplicações seguintes. Outra questão importante é que, para a aplicação tópica destes agentes, a pele deve estar intacta, sem a presença de ulcerações ou irritações cutâneas.

Alguns agentes, administrados durante a quimioterapia, têm demonstrado certa eficácia em atenuar a NPIQ. Os principais agentes que apresentaram efeitos protetores em estudos clínicos incluem: infusão de cálcio/magnésio, glutamina, vitamina E, glutatona e N-acetilcisteína. Em estudos clínicos, estes compostos foram eficazes em reduzir (de 40 a 65%) a ocorrência de NPIQ, bem como em prevenir as manifestações mais severas deste efeito adverso, quando comparados ao tratamento com placebo (WOLF et al., 2008). Os mecanismos envolvidos nestes efeitos são pouco conhecidos, mas sugere-se que para vitamina E, glutatona e N-acetilcisteína, envolvam as propriedades antioxidantes destes compostos e, conseqüentemente, redução do

estresse oxidativo em neurônios periféricos (KELEY; DE-ANGELIS, 2009).

Os dados apresentados aqui demonstram que, até o momento, não foram desenvolvidas terapias eficazes para o tratamento e/ou prevenção da NPIQ. Além disso, as opções disponíveis atualmente para o tratamento da dor são acompanhadas de muitos efeitos adversos que limitam o uso destes fármacos. Portanto, é importante que sejam realizados estudos para identificar alvos moleculares que sirvam para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a prevenção e/ou tratamento da NPIQ. Nesse sentido, será discutido em seguida o sistema caliceínas-cininas e seu potencial como alvo para o tratamento da dor neuropática.

## **SISTEMA CALICREÍNAS-CININAS**

As primeiras evidências da existência do sistema caliceínas-cininas surgiram a partir de estudos conduzidos por Abelous e Bardier em 1909, os quais demonstraram que a injeção intravenosa de urina humana causava redução da pressão sanguínea em cachorros (ABELOUS; BARDIER, 1909 apud BADER, 2011, p. 2). Anos mais tarde, Emil Karl Frey, junto com Eugen Werle e Heinrich Kraut, isolaram e caracterizaram a substância responsável pelo efeito hipotensor e a chamaram de “caliceína” (FREY, 1926; FREY et al., 1930 apud BADER, 2011, p. 2). Posteriormente, Werle descobriu que a caliceína é uma enzima que induz a liberação de uma substância, a partir de um precursor plasmático, a qual foi posteriormente chamada de “calidina”, e seu precursor de “calidinogênio” (WERLE et al., 1937; WERLE; BEREK, 1948 apud BADER, 2011, p. 2). Em estudos independentes, o brasileiro Rocha e Silva descobriu a existência da “bradicinina”, uma substância produzida a partir de globulinas plasmáticas pela ação de venenos de cobra e tripsina, que causava hipotensão e contração lenta da musculatura lisa (ROCHA-E-SILVA et al., 1949). Nos anos seguintes, uma série de estudos indicou que a calidina e bradicinina são originadas a partir dos mesmos precursores, e a estrutura de ambas substâncias

foi elucidada, revelando que a calidina é um decapeptídeo (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) e a bradicinina um nonapeptídeo (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) (WERLE et al., 1950; 1961; BOISSONAS et al., 1960; PIERCE E WEBSTER, 1961 apud BADER, 2011, p. 2). O termo “cininas” foi cunhado por Melville Schachter e se refere a esta família de peptídeos derivados dos mesmos precursores, então chamados de “cininogênios” (SCHACHTER, 1964 apud BADER, 2011, p. 2).

As cininas, incluindo a bradicinina (BK) e a calidina (Lys-BK), são peptídeos biologicamente ativos formados a partir de cininogênios através da ação proteolítica das calicreínas (KKs) plasmática ou tecidual, em resposta a estímulos fisiológicos ou durante processos patológicos (MARCEAU; REGOLI, 2004; ALHENC-GELAS; GIROLAMI, 2011). Os precursores das cininas são globulinas plasmáticas produzidas no fígado, classificados em cininogênios de alto (HK) e baixo (LK) peso molecular. Através da ação proteolítica da KK plasmática o HK origina a BK, enquanto que o LK forma a Lys-BK quando clivado pela KK tecidual. Os metabólitos ativos das cininas, des-Arg<sup>9</sup>-BK e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK, são formados pela clivagem do resíduo de arginina na extremidade C-terminal da BK e Lys-BK, respectivamente, pela ação de carboxipeptidases (tipos M e N), também chamadas de cininases I. As cininas também podem ser convertidas em metabólitos inativos pela ação de três peptidases, cininase II (ou enzima conversora de angiotensina – ECA), aminopeptidase P (AP) e endopeptidase neutra (NEP) (MOREAU et al., 2005; ALHENC-GELAS; GIROLAMI, 2011).

Uma vez produzidas, as cininas exercem vários efeitos biológicos, incluindo vasodilatação, hiperemia, aumento da permeabilidade vascular, redução da pressão sanguínea e sensibilização/ativação de fibras sensoriais nociceptivas (CALIXTO et al., 2004; 2011). As ações das cininas são mediadas através de dois subtipos de receptores acoplados à proteína G, denominados receptores B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) e B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R). O B<sub>2</sub>R apresenta alta afinidade pela BK e Lys-BK, enquanto que o B<sub>1</sub>R apresenta maior afinidade pelos metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-BK (DABK) e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (Lys-DABK) (LEEB-LUNDBERG

et al., 2005). A principal diferença entre os dois tipos de receptores cininérgicos está no padrão de expressão destas proteínas. O B<sub>2</sub>R é expresso de forma constitutiva em vários tecidos, enquanto que o B<sub>1</sub>R está geralmente ausente em condições fisiológicas, sendo rapidamente expresso por diversos tipos celulares em resposta a longos períodos de incubação tecidual *in vitro*, lesão tecidual ou infecções, ou após o tratamento com endotoxinas bacterianas, adjuvante de Freund, citocinas pró-inflamatórias, luz ultravioleta, estresse térmico, dentre outros estímulos. Dessa forma, a maioria das ações fisiológicas das cininas é mediada pelo B<sub>2</sub>R, enquanto que o B<sub>1</sub>R normalmente amplifica e perpetua a sinalização iniciada pela estimulação do B<sub>2</sub>R (CALIXTO et al., 2004).

## **PAPEL DAS CININAS NA DOR**

A BK está entre os algógenos endógenos mais potentes e o seu papel, bem como os de ambos os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, na dor tem sido extensivamente revisado (CALIXTO et al., 2000; 2001; 2004; 2011). Ambos os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> têm sido identificados no GRD e camadas superficiais do corno dorsal. A BK desempenha um papel importante na transmissão da dor por ativar diretamente fibras aferentes primárias dos tipos A $\delta$  e C, ou por liberar mediadores inflamatórios tais como prostaglandinas, óxido nítrico, neurocininas e CGRP (CALIXTO et al., 2000; 2001; 2004). Embora o RNAm para B<sub>1</sub>R esteja expresso em fibras aferentes nociceptivas primárias, estes receptores parecem não ser funcionais em neurônios do GRD de ratos, quando em cultura (DAVIS et al., 1996; SEABROOK et al., 1997). Além disso, a injeção periférica do agonista seletivo para o B<sub>1</sub>R (DABK) não foi capaz de causar nocicepção na ausência de estímulos sensibilizantes prévios (*primer*), tais como prostaglandina E<sub>2</sub> ou acetato de forbol miristato (PMA) (TONUSSI; FERREIRA, 1997; FERREIRA et al., 2008). Do mesmo modo, o edema de pata induzido pela DABK depende de estímulos inflamatórios prévios como citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL1- $\beta$ ), fator de agregação plaquetária (PAF) ou

lipopolissacarídeo (LPS) (CAMPOS et al., 1998; FERNANDES et al., 2003; PASSOS et al., 2004). Estes resultados indicam que a resposta periférica causada pela ativação do B<sub>1</sub>R depende de estímulos inflamatórios iniciais; o aumento na funcionalidade do B<sub>1</sub>R pode estar relacionado com aumento de sua expressão (FERNANDES et al., 2003; PASSOS et al., 2004; FERREIRA et al., 2008). Na medula espinhal, ambos os receptores cininérgicos estão confinados principalmente aos terminais centrais dos aferentes primários (SEABROOK et al., 1997; WOTHERSPOON; WINTER, 2000; MA et al., 2000; MA, 2001; MA; HEAVENS, 2001). Além disso, ambos os receptores são funcionais na medula espinhal, independentemente de estímulos inflamatórios prévios, uma vez que a injeção intratecal de agonistas para ambos os receptores evocou hiperalgisia térmica e mecânica em camundongos (FERREIRA et al., 2002; MEOTTI et al., dados não publicados do grupo).

A ativação do B<sub>2</sub>R foi relacionada com a fase inicial da dor inflamatória crônica, enquanto a estimulação do B<sub>1</sub>R estaria associada com processo patológico mais persistente (FERREIRA et al., 2001). Além disso, diversas evidências experimentais indicam a participação das cininas e de seus receptores na dor crônica causada por lesão de nervos (YAMAGUCHI-SASE et al., 2003; RASHID et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; QUINTÃO et al., 2008), diabetes (GABRA; SIROIS, 2002) ou câncer (SEVCIK et al., 2005; FUJITA et al., 2010). O envolvimento dos receptores cininérgicos em modelos experimentais de dor neuropática tem sido reportado desde o final da década de noventa. De fato, foi verificado aumento nos níveis do RNAm ou da proteína para os B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R das cininas no GRD de ratos após lesão por constrição crônica do nervo ciático (CCI) (PETERSEN et al., 1998; ECKERT et al., 1999; LEVY; ZOCHODNE, 2000; YAMAGUCHI-SASE et al., 2003). Rashid e colaboradores (2004) demonstraram a ocorrência da síntese *de novo* do B<sub>1</sub>R após a ligação parcial do nervo ciático (PSL) em camundongos, principalmente em neurônios mielinizados do DRG, enquanto que a expressão dos B<sub>2</sub>R encontra-se reduzida. O envolvimento de ambos os receptores cininérgicos na hiperalgisia térmica e

mecânica causada pela ligação do nervo espinhal (SNL) também foi reportado (LAI et al., 2006; WERNER et al., 2007). Lai e colaboradores (2006) demonstraram que as respostas hiperalgênicas causadas pela SNL são mediadas pela liberação de dinorfina A na medula espinhal, a qual promove dor através da sua ação sobre ambos os receptores ( $B_1R$  e  $B_2R$ ).

O uso de animais nocautes é uma ferramenta genética interessante para auxiliar no entendimento do papel dos receptores cininérgicos na dor. Camundongos nocautes para o  $B_2R$  foram desenvolvidos em meados da década de noventa (BORKOWSKI et al., 1995) e contribuíram para a consolidar a participação deste receptor em modelos experimentais de dor aguda e crônica (BOYCE et al., 1996; FERREIRA et al., 2001; 2002), corroborando dados obtidos anteriormente com antagonistas seletivos. Do mesmo modo, animais com deficiência no  $B_1R$  apresentaram hipoalgesia em modelos químicos de nocicepção, provavelmente relacionada com redução da facilitação dependente de atividade (*Wind-up*) dos reflexos espinhais nociceptivos (PESQUERO et al., 2000). Corroborando estes achados, foi demonstrado que a deleção gênica do  $B_1R$  praticamente aboliu a hiperalgesia produzida pela diabetes (induzida por streptozotocina), lesão parcial do nervo ciático ou avulsão do plexo braquial (GABRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2005; QUINTÃO et al., 2008). Mais recentemente, foram desenvolvidos animais com deleção dupla de ambos os receptores cininérgicos, os chamados animais duplo-nocautes (CAYLA et al., 2007), os quais apresentaram resposta nociceptiva reduzida em modelos agudos de dor inflamatória somática e visceral (CAYLA et al., 2012).

Antagonistas seletivos para os receptores cininérgicos têm sido amplamente utilizados nas pesquisas pré-clínicas para avaliar o envolvimento do sistema caliceínas-cininas em diferentes modelos experimentais (CAMPOS et al., 2006; MARCEAU, 2011). Além disso, o antagonista seletivo para o  $B_2R$  icatibant (Hoe 140; Firazyr®) é eficaz no tratamento de angioedema hereditário (CICARDI et al., 2010), e foi registrado em muitos países com esta finalidade (EMEA, 2011). Vários

dados na literatura demonstram que a administração de antagonistas seletivos para os B<sub>1</sub>R ou B<sub>2</sub>R reduz a hiperalgesia mecânica ou térmica em modelos de dor neuropática (RASHID et al., 2004; FERREIRA et al. 2005; WERNER et al., 2007; QUINTÃO et al., 2008). Acredita-se que antagonistas cininérgicos possam ser utilizados como novas opções terapêuticas para o tratamento da dor crônica em humanos. No entanto, o emprego de antagonistas seletivos do B<sub>2</sub>R pode ser limitado em virtude de possíveis efeitos adversos associados ao sistema cardiovascular. De fato, o tratamento crônico com Hoe 140 causou hipertensão em ratos (MADEDDU, et al., 1993; 1994); este efeito está relacionado à propriedade vasodilatadora da BK, a qual foi observada também em humanos (COCKCROFT et al., 1994). Portanto, o emprego de antagonistas seletivos para o B<sub>1</sub>R, o qual é super-expresso em condições patológicas e seu antagonismo estaria sujeito a menores efeitos adversos quando comparado ao antagonismo do B<sub>2</sub>R, poderia ser uma alternativa eficaz no tratamento da dor crônica (HUANG; PLAYER, 2010).

## **INTERAÇÃO ENTRE CININAS E RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO**

A clonagem do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), no final da década de noventa (CATERINA et al., 1997), propiciou um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na dor. O TRPV1 é um canal de cátion não-seletivo sensível ao calor nocivo e à capsaicina, envolvido na excitação e/ou sensibilização de aferentes primários por diferentes mediadores, incluindo a BK (WOOLF; MA, 2007). De fato, estudos eletrofisiológicos prévios já haviam sugerido que a despolarização de neurônios do GRD pela BK depende da ativação de canais de cátions não-seletivos (BURGESS et al., 1989 apud MIZUMURA et al., 2009, p. 56). Além disso, Cesare e McNaughton (1996) reportaram que a BK sensibiliza neurônios do DRG ao calor nocivo. Corroborando estes dados, estudos *in vivo* demonstraram que a ativação do canal TRPV1 está

envolvida na nocicepção declarada e hiperalgesia térmica causadas pela BK (CHUANG et al., 2001; FERREIRA et al., 2004). Estes eventos são mediados pela estimulação do B<sub>2</sub>R, a qual leva à ativação da proteína quinase Cε (PKCε) e consequente fosforilação do TRPV1, facilitando sua abertura (CESARE et al., 1999; CHUANG et al., 2001; FERREIRA et al., 2004). Outros mecanismos envolvidos na interação entre B<sub>2</sub>R e TRPV1 incluem a desinibição deste canal pela quebra do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) e a síntese de produtos da 12-lipoxigenase, os quais ativam o TRPV1 (MIZUMURA et al., 2009)

Alguns estudos têm sugerido também a interação entre a BK e outro membro da família de receptores de potencial transitório (TRPs), o canal TRP com domínios repetidos de anquirina tipo 1 (TRPA1). O TRPA1 é um canal de cátions não-seletivo que pode ser ativado por frio nocivo e compostos pungentes (óleo de mostarda e cinamaldeído, por exemplo) (STORY et al., 2003; BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005; 2006). Tem sido proposto que o aumento na concentração de cálcio (Ca<sup>++</sup>) intracelular causado pela BK, seja decorrente da mobilização de estoques intracelulares ou pela abertura do canal TRPV1, influencia na ativação do TRPA1 (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006). Ainda, Wang e colaboradores (2008) propuseram que o TRPA1 pode ser ativado pela BK por meio da ativação da proteína quinase A (PKA).

As evidências acerca da interação entre BK e canais TRPs se estendem também a outro membro desta família de canais catiônicos, o canal TRP vanilóide tipo 4 (TRPV4). Estudos recentes demonstraram que a BK sensibiliza o canal TRPV4 em células HEK293 (linhagem de células renais embrionárias humanas) transfectadas com o gene para este canal (FAN et al., 2009). Portanto, a ativação e/ou sensibilização do TRPV4 poderia constituir um evento secundário à ativação dos receptores cininérgicos no aferente primário e contribuir para condições dolorosas. De fato, o canal TRPV4 tem sido implicado na patofisiologia da neuropatia induzida pelo PTX em roedores (ALESSANDRI-HABER et al., 2004; 2008).

## RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 4 (TRPV4)

O TRPV4 é um canal de cátions não-seletivo ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ), o qual foi inicialmente descrito como sendo ativado por turgescência celular induzida por hipotonicidade (LIEDTKE et al., 2000). Posteriormente, outros estímulos foram demonstrados como ativadores do TRPV4 como, por exemplo, calor moderado ( $>24-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), endocanabinóides (anandamida e 2-aracdonilglicerol [2-AG]), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) e compostos naturais como bisandrografolido A (BAA) e o éster de forbol 4 alfa-forbol 12,13-didecanoato (4 $\alpha$ -PDD) (PLANT; STROTMANN, 2007; VINCENT; DUNCTON, 2011).

O TRPV4 tem sido implicado numa série de funções fisiológicas como detecção de alterações na osmolaridade tecidual e controle da secreção de água (por mecanismos centrais e renais), percepção de temperaturas amenas e controle da termoregulação cutânea, e detecção de estímulos mecânicos em diferentes células (neurônios aferentes primários, endotélio vascular, células do ducto coletor renal, urotélio e músculo detrusor da bexiga), podendo causar nocicepção, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e controle da micção. A relação do canal TRPV4 com diferentes patologias também tem sido reportada. Este receptor parece estar envolvido em doenças que acometem o fígado, pâncreas e os sistemas respiratório, cardiovascular, auditivo, urinário e sensorial (EVERAERTS et al., 2010).

Em relação ao sistema sensorial, Alessandri-Haber e colaboradores (2003) demonstraram que a diminuição da osmolaridade do meio de cultura ativa corpos celulares de fibras C no GRD de ratos, um efeito que foi mediado pelo TRPV4 e potencializado pela aplicação prévia de  $\text{PGE}_2$ . Estes autores também demonstraram que a  $\text{PGE}_2$  sensibiliza os animais à hipotonicidade tecidual, causando comportamentos sugestivos de

nociceção (ALESSANDRI-HEBER et al., 2003). Posteriormente, foi demonstrado que outros mediadores inflamatórios, como agonistas do receptor ativado por proteases-2 (PAR-2) e uma “sopa inflamatória”, composta por BK, SP, histamina, serotonina e PGE<sub>2</sub>, podem sensibilizar o TRPV4 à hipotonicidade e estímulos mecânicos (ALESSANDRI-HEBER et al., 2003; 2006; GRANT et al., 2007).

Além do envolvimento na dor inflamatória, alguns autores têm sugerido a contribuição do canal TRPV4 para a dor neuropática causada por quimioterápicos, diabetes, álcool ou constrição do GRD (ALESSANDRI-HEBER et al., 2004; 2006; 2008; GRANT et al., 2007; ZHANG et al., 2007; CHEN; YANG; WANG, 2011). Tem sido proposto que a neuropatia periférica causada pelo PTX depende do aumento de atividade do canal TRPV4 (ALESSANDRI-HEBER et al., 2004; 2008). Estes autores demonstraram que a hiperalgesia mecânica causada por este quimioterápico é prevenida pelo tratamento com oligodeoxinucleotídeo (ODN) antissenso contra o TRPV4, o qual promove diminuição da expressão deste canal em neurônios do GRD. Ainda, animais tratados com PTX apresentam maior sensibilidade à aplicação de solução hipotônica na pata, manifestada por comportamentos declarados de nociceção, quando comparado aos animais controle (ALESSANDRI-HEBER et al., 2004). Recentemente, a eficácia de antagonistas seletivos para o TRPV4 contra a hiperalgesia mecânica causada pelo PTX foi demonstrada (CHEN; YANG; WANG, 2011; MATERAZZI et al., 2012). Portanto, este canal parece ser um alvo importante para o desenvolvimento de novos analgésicos para o tratamento da NPIQ, e o entendimento dos mecanismos envolvidos na sua ativação daria maior base a esta possibilidade.

## **2 – OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar, através da utilização de animais com deleção gênica, antagonistas seletivos, de técnicas de biologia molecular e de observações comportamentais, o possível envolvimento dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas na neuropatia periférica induzida pelo quimioterápico paclitaxel em camundongos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar o envolvimento dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas na hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pelo paclitaxel, através do uso de camundongos com deleção gênica para os receptores cininérgicos;
- Avaliar a participação de ambos os receptores cininérgicos na gênese e manutenção das respostas hiperalgênicas induzidas pelo paclitaxel através da utilização de antagonistas seletivos para cada um dos receptores;
- Analisar o efeito da administração periférica de agonistas dos receptores cininérgicos sobre a nocicepção declarada em animais neuropáticos, bem como o efeito do tratamento periférico ou central com antagonistas para estes receptores sobre a manutenção da hiperalgesia mecânica;
- Investigar as possíveis alterações na expressão do receptor B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas na pata, GRDs, medula espinhal e diferentes estruturas do cérebro (hipotálamo, tálamo, hipocampo e córtex) através das técnicas de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e/ou imunistoquímica;
- Avaliar a integridade da barreira hematoencefálica espinhal e cerebral de animais tratados com paclitaxel;

- Avaliar o envolvimento do canal TRPV4 nas respostas nociceptivas induzidas por agonistas seletivos dos receptores cininérgicos, bem como o potencial destes agonistas em sensibilizar respostas nociceptivas induzidas por ativadores deste canal;
- Analisar os mecanismos envolvidos na sensibilização à hipotonicidade (um ativador do canal TRPV4) induzida pela bradicinina;
- Investigar se os receptores cininérgicos modulam a atividade do canal TRPV4 no modelo de neuropatia induzida pelo paclitaxel, através do uso de antagonistas seletivos para estes receptores;
- Analisar o possível envolvimento de proteínas quinases C (PKCs) na modulação da atividade do canal TRPV4 pelos receptores cininérgicos no modelo de neuropatia induzida pelo paclitaxel.

### 3 – MÉTODOS

#### PARTE I - ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

##### 1 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos CD1 machos (8-10 semanas) provenientes do Biotério de Criação do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) da UFSC. Em alguns experimentos foram utilizados camundongos C57BL/6 machos do tipo selvagem ou com deleção dos genes para os receptores B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>); ainda, foram utilizados animais com deleção de ambos os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (animais duplo nocaute, B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>). As matrizes dos animais C57BL/6 do tipo selvagem ou nocautes foram obtidas do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (São Paulo, Brasil). Após a obtenção das matrizes, os animais foram criados e mantidos no Biotério do LAFEX.

Todos os animais utilizados foram armazenados em ambiente com temperatura (22 ± 2 °C) e humidade (60-80%) controladas em ciclo de claro-escuro de 12 horas (luz entre 06h00min e 18h00min). Comida e água foram ofertadas *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as Diretrizes de Cuidado Animal do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH; publicação Nº 80-23), e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC (número do protocolo: PP00624).

Os animais foram distribuídos randomicamente entre os grupos experimentais (6-7 animais por grupo) e todos os experimentos comportamentais foram conduzidos de maneira cega a fim de reduzir viés experimental. O número de animais e a intensidade dos estímulos usados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes.

## 2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 2.1 – Tratamento com o quimioterápico PTX

A hiperalgesia causada por quimioterápico foi induzida pelo tratamento com PTX (PTX), segundo metodologia proposta por Polomano et al. (2001) e adaptada para camundongos (SMITH et al., 2004), com algumas modificações. O quimioterápico foi administrado durante cinco dias consecutivos, entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. O PTX foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 2 mg/Kg, diariamente, 1 vez ao dia. Animais controle receberam o veículo (NaCl 0,9%). O volume de administração das soluções foi de 10 mL/Kg.

### 2.2 – Experimentos comportamentais

#### *Avaliação da hiperalgesia mecânica*

Os animais (6-7 por grupo) foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente individuais (9 x 7 x 11 cm) localizados sobre uma plataforma de arame elevada, para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras direitas. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 1 h antes dos testes comportamentais. A frequência de resposta de retirada das patas traseiras foi obtida através de 10 aplicações consecutivas (duração de 1 s cada e intervalo de 10 s entre cada aplicação) do filamento de von Frey de 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Vinte e quatro horas antes do início do tratamento com PTX foi determinado o limiar mecânico basal. A sensibilidade ao filamento de von Frey foi avaliada em vários intervalos de tempo após o primeiro tratamento com PTX ou seu veículo. A incidência da hiperalgesia mecânica obtida para camundongos (C57BL/6 ou CD1) tratados com PTX foi de ~90%. O aumento de 2,5 vezes da porcentagem de retirada da

pata (em relação ao basal de cada animal) foi considerado como indicativo de indução da hiperalgesia mecânica.

#### *Avaliação da hiperalgesia térmica*

A hiperalgesia ao calor foi avaliada através do método de “*Paw Flick*” como descrito previamente (MENÉNDEZ et al., 2002). Um analgesímetro de calor radiante (*Tail-Flick* Analgesímetro, Albarsch, Porto Alegre, Brasil) foi usado para medir as latências de retirada da pata traseira direita dos camundongos (6-7 por grupo) frente à aplicação de um feixe de luz radiante (intensidade de 15). Vinte e quatro horas antes do início do tratamento com PTX foi determinado o limiar térmico basal. A sensibilidade ao calor foi avaliada em vários intervalos de tempo após o primeiro tratamento com PTX ou seu veículo. Com o intuito de evitar danos aos animais, o tempo máximo de exposição das patas ao feixe de luz foi de 20 s. O desenvolvimento de hiperalgesia térmica em animais tratados com PTX não foi reproduzido em todos os experimentos conduzidos na linhagem CD1, e sua incidência foi variável entre os experimentos (10 a 80 %). Assim, a eficácia de antagonistas cininérgicos foi avaliada somente quando a incidência alcançou ~80%. A queda de 2,5 vezes do limiar térmico (em relação ao basal de cada animal) foi considerada como indicativo de indução da hiperalgesia térmica.

#### *Nocicepção declarada*

O teste de nocicepção declarada foi realizado utilizando funis de vidro invertidos (15 a 20 cm de diâmetro), posicionados em frente a um espelho em ângulo de 75°, para facilitar a completa visualização dos animais. Por pelo menos 30 min antes da injeção dos algógenos, os animais foram habituados dentro do aparato experimental. Após este período de habituação, cada animal foi removido brevemente e injetado por via intraplantar (i.pl.), na pata direita traseira, com 20 µL de salina (NaCl 0,9 %) contendo bradicinina (BK; 1 e 10 nmol/pata, i.pl.) ou des-Ar<sup>9</sup>-

bradicinina (DABK; 20 nmol/pata). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina (20  $\mu$ L/pata, i.pl.). Os camundongos foram observados individualmente, imediatamente após a injeção dos estímulos, por um período de 10 min. O tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada (*licking*) foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção declarada.

### 2.3 – Administração intratecal de drogas

A administração de drogas através da via intratecal (i.t.) foi realizada de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980), com algumas modificações. As injeções foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos. Uma agulha conectada a uma microseringa (25  $\mu$ L), por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele, fixando-se entre as vértebras no espaço subdural entre os segmentos espinhais L<sub>5</sub>-L<sub>6</sub>, para a administração de um volume de 5  $\mu$ L das drogas (abaixo) ou veículo.

### 2.4 – Administração intracerebroventricular de drogas

A administração de drogas através da via intracerebroventricular (i.c.v.) foi realizada de acordo com o método descrito por Laursen e Belknap (1986), com pequenas modificações. Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (2% em 100% de O<sub>2</sub>, durante 3 min) e uma agulha (30 G; 3,0 mm de comprimento) conectada a uma microseringa (10  $\mu$ L), por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida diretamente no ventrículo lateral (coordenadas do bregma: 1 mm lateral; 1 mm rostral; 3 mm vertical) para a administração lenta (em 1 min) de um volume de 5  $\mu$ L das drogas (ver abaixo) ou veículo.

## 2.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

### *Coleta dos tecidos*

Camundongos CD1, tratados com o PTX (ou veículo), foram sacrificados por decapitação 7 e 14 dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico para a coleta das seguintes amostras teciduais: pele da pata direita, gânglios da raiz dorsal (GRD; segmentos entre L<sub>4</sub> e L<sub>6</sub>), medula espinhal (L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>), tálamo, hipotálamo, córtex pré-frontal e córtex parietal. Após a coleta, as amostras foram congeladas (-70 °C) até o dia da extração do RNA total.

### *Extração do RNA total*

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos em 1 mL de reagente de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, SP, Brazil), conforme recomendações do fabricante. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio ao homogenato, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 g, durante 15 min a 4°C). Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida submetido à centrifugação (12.000 g, 15 min, 4°C), sendo que o precipitado formado foi ressuscitado em 1 mL de etanol gelado. O RNA foi novamente centrifugado (7.000 g, 5 min, 4°C), o etanol desprezado e o precipitado dissolvido em água ultrapura. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260/280 nm. O RNA total foi estocado a -70°C até o momento do uso.

### *Confecção do DNA complementar (cDNA)*

A fim de determinar a expressão do RNAm codificador para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas em diferentes tecidos após

o tratamento com PTX, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Para a reação da transcrição reversa, amostras contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µL de oligo dT, 1 µL do mix de dNTP (10 mM) em água ultrapura para um volume final de 12 µL. Inicialmente, as amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C, resfriadas por 5 min a 4°C e acrescidas de 4 µL de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 mM e 1 µL de inibidor de RNase (2500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37°C durante 2 min e a enzima M-MLV (1 µL, 200 U) foi adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37°C durante 50 min e a inativação da reação foi realizada através da incubação das amostras a 75°C durante 15 min. O cDNA foi estocado a 4°C até a realização da reação de RT-PCR.

#### *Reação em cadeia da polimerase em tempo real*

O cDNA foi amplificado em triplicata utilizando o *kit* Master Mix TaqMan® Universal PCR, com sondas específicas para camundongos, com marcação 3' *quencher* MGB-FAM para o receptor B<sub>1</sub> (Mm00432059\_s1) e B<sub>2</sub> (Mm01339907\_m1), e 3' *quencher* MGB-VIC para GAPDH (Mm03302249\_g1), utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1 µL de cDNA, 5 µL de master mix, 0,5 µL de primer e 3,5 µL de água ultrapura, em um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 60 ciclos. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para a quantificação relativa.

## 2.6 – Imuno-histoquímica

### *Coleta dos tecidos*

Camundongos CD1, tratados com PTX (ou veículo), foram sacrificados 14 dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico para a coleta do cérebro. Para tal, os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e, imediatamente, perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%) e paraformaldeído (PFA) 4%.

### *Preparo dos cortes histológicos e reativação antigênica*

Após a remoção, os cérebros dos animais foram incluídos em parafina, e os cortes teciduais (secção coronal) de espessura de 3 µm foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropiltrióxido; Sigma-Aldrich) a 5 % em acetona PA. As lâminas foram mantidas em estufa a uma temperatura de 50 °C durante 1 h para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinados em cubas de vidro contendo xilol e reidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1 M e 820 mL de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). Após preparo da solução, as lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as

lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

### *Deteccção imunológica*

A imunodeteccção foi realizada utilizando anti-corpo anti-B<sub>1</sub>R (1:200; Alomone Labs, Jerusalem, Israel). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) em câmara úmida durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes utilizando-se PBS por 5 minutos, e a deteccção foi realizada utilizando o sistema da streptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation), incubação de 1 h, em temperatura ambiente. Após nova lavagem em PBS, as amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetra-amino-bifenil-tetra-hidrocloro) previamente diluído em PBS e peróxido de hidrogênio a 0,3%. Após a revelação, foram realizadas a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan Merck, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo na ausência do anticorpo primário nas reações. Os resultados foram obtidos através de microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i) e câmara digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA), acoplados. Imagens digitalizadas foram transferidas para o computador e a intensidade média de marcação foi determinada para a proteína de interesse através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland,

EUA). O efeito do tratamento com PTX sobre a detecção do B<sub>1</sub>R foi avaliado no tálamo, em imagens adquiridas em aumento de 400 vezes.

## 2.7 – Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE)

A permeabilidade da BHE foi avaliada através da medida do extravasamento do corante azul de Evans, conforme previamente descrito (ZHANG et al., 2010). No 7º ou 14º dias após o primeiro tratamento com PTX, os camundongos receberam 0,1 mL de azul de Evans a 2% por via endovenosa (plexo orbital). Após 1 h os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e imediatamente perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%) a fim de remover o excesso de corante intravascular. Em seguida, a região lombar da medula espinhal e o cérebro dos animais foram coletados, triturados e incubados com 600 µL de formamida a 60°C durante 24 h. Após o período de incubação, o tecido foi removido e a solução de formamida centrifugada a 20.000 g durante 20 minutos. A solução sobrenadante foi coletada e a densidade óptica determinada por leitura espectrofotométrica a 620 nm.

## 3 – PROTOCOLOS

### 3.1 - Investigação da participação dos receptores cininérgicos na hiperalgesia induzida pelo PTX

Com o intuito de avaliar o possível envolvimento dos receptores cininérgicos na hiperalgesia causada pelo PTX, foram utilizados camundongos C57BL/6 com deleção do gene (animais nocaute) para os receptores B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>), B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) e animais duplo nocaute para B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (B<sub>1</sub>B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>). Animais C57BL/6 do tipo selvagem (B<sub>1</sub>B<sub>2</sub><sup>+/+</sup>) foram utilizados como controle. Os animais foram tratados com PTX (ou veículo) e os seguintes parâmetros foram avaliados entre 7 e 21 dias após o primeiro

tratamento: hiperalgesia mecânica e térmica, peso corporal e temperatura retal dos camundongos.

### 3.2 - Avaliação do envolvimento dos receptores cininérgicos na gênese da hiperalgesia induzida pelo PTX

Neste experimento, animais da linhagem CD1 foram tratados com PTX (ou veículo) entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. Alguns grupos experimentais receberam os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (100 nmol/Kg, i.p.) e Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.), respectivamente. Outro grupo experimental recebeu uma combinação de ambos os antagonistas nas mesmas doses descritas acima. Os antagonistas foram administrados 2 vezes ao dia (a cada 12 h) até o 6º dia após o primeiro tratamento com PTX. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9%). A hiperalgesia mecânica e térmica foi avaliada entre 7 e 9 dias após o primeiro tratamento com PTX.

### 3.3 - Avaliação do envolvimento dos receptores cininérgicos na manutenção da hiperalgesia causada pelo PTX

Camundongos da linhagem CD1 foram tratados com o quimioterápico (ou veículo) e, 7 ou 14 dias após o primeiro tratamento, foram administrados com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (100 - 300 nmol/Kg, i.p.) ou Hoe 140 (30 - 100 nmol/Kg, i.p.), respectivamente. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9 %). A hiperalgesia mecânica e térmica foi avaliada entre 0 e 6 horas após a administração dos antagonistas. Outros grupos experimentais receberam tratamento repetido com os antagonistas DALBK (100 nmol/Kg) ou Hoe 140 (50 nmol/Kg), ou com a combinação de ambos os antagonistas, entre 7 e 8 dias após o primeiro tratamento com PTX. As drogas foram administradas por via i.p. a cada 12 horas. Para este protocolo de tratamento, a hiperalgesia mecânica foi avaliada entre o 8º e 11º dia após o PTX.

### 3.4 - Efeito da gabapentina e morfina sobre a hiperalgesia induzida pelo PTX

O efeito de drogas utilizadas clinicamente contra dores crônicas, gabapentina (30 mg/Kg, v.o.) ou morfina (5 mg/Kg, s.c.), foi avaliado sobre a hiperalgesia mecânica e térmica, respectivamente. As drogas foram administradas no 7º ou 14º dia após o primeiro tratamento com PTX (camundongos CD1), e as respostas hiperalgésicas foram avaliadas entre 1 e 6 horas após a administração das drogas. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9 %).

### 3.5 - Efeito do tratamento periférico com antagonistas dos receptores cininérgicos sobre a hiperalgesia causada pelo PTX

Camundongos CD1 foram tratados diariamente com o quimioterápico (ou veículo) por cinco dias e, 7 ou 14 dias após o primeiro tratamento, receberam por via intraplantar (i.pl.) os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (3 nmol/pata) ou Hoe 140 (3 nmol/pata), respectivamente. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9 %). A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 1 e 6 horas após a administração dos antagonistas.

### 3.6 - Efeito da injeção periférica de agonistas dos receptores cininérgicos sobre a nocicepção declarada em animais tratados com PTX

A resposta funcional dos receptores cininérgicos em animais tratados com o PTX foi avaliada através da capacidade de agonistas cininérgicos de causar nocicepção declarada. Para tanto, camundongos CD1 foram tratados com o quimioterápico (ou veículo) e, 7 dias após o primeiro tratamento, receberam uma injeção i.pl. dos agonistas seletivos para o receptor B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub>, respectivamente, DABK (20 nmol/pata) e BK (1 ou 10 nmol/pata). Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9 %). Após a injeção dos agonistas (ou veículo), a nocicepção

declarada foi avaliada durante 10 min (conforme o protocolo descrito no item 2.2).

3.7 - Efeito do tratamento intratecal (i.t.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) com antagonistas dos receptores cininérgicos sobre a hiperalgesia causada pelo PTX

Camundongos CD1 foram tratados com o quimioterápico (ou veículo) e, 7 ou 14 dias após o primeiro tratamento, receberam por via i.t. ou i.c.v. os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (10 pmol/sítio) ou Hoe 140 (100 pmol/sítio), respectivamente. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9%). A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 1 e 6 horas após a administração dos antagonistas.

## **PARTE II - INTERAÇÃO ENTRE RECEPTORES CININÉRGICOS E TRPV4: RELEVÂNCIA PARA A NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL**

### **1 – ANIMAIS**

Animais da linhagem CD1, os quais foram utilizados na primeira parte desta tese, passaram a apresentar agitação demasiada e dificuldade de habituação aos aparatos experimentais durante determinado período do andamento deste trabalho (observação entre setembro de 2010 e abril de 2011). Não se sabe ao certo as razões para este fato, porém, é possível que esteja relacionado a modificações no Biotério do LAFEX, as quais foram realizadas para garantir a qualidade dos animais. Portanto, na segunda parte deste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* machos (8-10 semanas) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram armazenados em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e humidade (60-80%) controladas em ciclo de claro-escuro de 12 horas. Comida e água foram ofertadas *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de

acordo com as Diretrizes de Cuidado Animal do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH; publicação Nº 80-23), e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC (número do protocolo: PP00811). Os animais foram distribuídos randomicamente entre os grupos experimentais (6-10 animais por grupo) e todos os experimentos comportamentais foram conduzidos de maneira cega a fim de reduzir viés experimental. O número de animais e a intensidade dos estímulos usados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes.

## 2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 2.1 – Experimentos comportamentais

#### *Nociceção declarada*

O teste de nociceção declarada foi realizado em compartimentos de acrílico transparente individuais (9 x 7 x 11 cm) localizados sobre uma plataforma de arame elevada, para que posteriormente fosse avaliada a sensibilidade aos filamentos de von Frey (abaixo). Os animais (8-10 por grupo) foram habituados dentro do aparato experimental, por pelo menos 1 h antes da injeção dos algógenos. Após este período de habituação, cada animal foi removido brevemente e injetado por via i.pl., na pata direita traseira, com diferentes estímulos nociceptivos (ver seção “Protocolos”). Os camundongos foram observados individualmente, imediatamente após a injeção dos estímulos, por um período de 5 minutos. O tempo em que os animais permaneceram agitando, elevando ou lambendo a pata foi cronometrado e considerado como indicativo de nociceção declarada.

### *Avaliação da hiperalgesia mecânica*

Os animais utilizados no experimento de nocicepção declarada foram submetidos a avaliação da sensibilidade mecânica. O limiar mecânico foi avaliado de acordo com o método descrito por Chaplan e colaboradores (1994). Através da superfície da plataforma de arame elevada, uma série de filamentos de von Frey (VFH, Stoelting, Chicago, USA) calibrados para produzir forças de 0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1; 1,4; ou 2 g foram aplicados perpendicularmente e em ordem crescente ou decrescente ao centro da superfície plantar da pata traseira dos animais, por um período máximo de 3 s, ou até que o animal apresentasse uma resposta de retirada da pata. O teste teve início com o filamento de 0,6 g. Na ausência de resposta, filamentos de força maior foram aplicados consecutivamente até que ocorresse a resposta de retirada da pata. Caso o filamento de 0,6 g produzisse a resposta, após um intervalo de 30 s, filamentos de força menor eram aplicados até que ocorresse novamente a resposta de retirada da pata. Os dados coletados utilizando este método, denominado *up-and-down* e proposto por Dixon (1980), foram utilizados para calcular a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata (em gramas, g). Reduções no limiar de retirada da pata caracterizaram o aparecimento de hiperalgesia mecânica. A sensibilidade aos filamentos de von Frey foi avaliada em vários intervalos de tempo após a administração i.pl. ou i.t. de diferentes substâncias (ver seção “Protocolos”), ou após 7 dias do primeiro tratamento com PTX (ou veículo).

#### 2.2 - Hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX

A neuropatia pelo PTX foi induzida conforme descrito na Parte I (item 2.1) da seção de metodologia. Neste bloco de experimentos a sensibilidade aos filamentos de von Frey foi avaliada 7 dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico. A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 0 e 6 horas após o tratamento com diferentes antagonistas (abaixo). Curiosamente, quando se utilizou o método do *up-and-down* a incidência da

hiperalgesia mecânica obtida para camundongos Swiss tratados com PTX foi de ~60%. A redução de 2,5 vezes do limiar mecânico (em relação ao basal de cada animal) foi considerada como indicativo de indução da hiperalgesia mecânica. Somente os animais que apresentaram redução do limiar mecânico foram utilizados nos experimentos.

### 2.3 - Sensibilidade à hipotonicidade em animais tratados com PTX

A neuropatia pelo PTX foi induzida conforme descrito na Parte I (item 2.1) da seção de metodologia. No 7º e 14º dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico, os animais foram submetidos ao teste de nocicepção declarada induzido pela injeção i.pl. de solução hipotônica (20 µL de água ultrapura, 18 mOsm). Animais controle receberam solução isotônica (20 µL de salina, 300 mOsm). Os comportamentos indicativos de nocicepção foram avaliados durante os primeiros 5 minutos após a administração de solução hipotônica.

### 2.4 – Imunodeteção de proteínas por *Western blot*

#### *Preparação das frações de proteínas de membrana e citosol da pele da pata de camundongos*

Amostras de pele da pata foram homogeneizadas com processador de tecidos (Tissue tearor; Biospec Products, INC., OK, EUA) em tampão de lise A gelado [Tampão A: HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditiotreitól (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1,5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml de pepstatina A, 5 µg/ml de leupeptina e 10 µg/ml de aprotinina]. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo durante 15 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm, por 60 min, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado como extrato citoplasmático. Para obtenção das proteínas de membrana o homogenato foi re-suspenso em tampão de lise A contendo 1 % de triton-X 100, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm, por

30 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado como extrato rico em membrana.

#### *Determinação da concentração de proteínas*

A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Lowry, como descrito anteriormente (LOWRY et al., 1951). De maneira breve, 4,9 mL de reativo A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em NaOH 0,1N) foram misturados a 0,1 mL de reativo B, que consiste na união de duas partes iguais de solução de tartarato de sódio e potássio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 2% e solução alcalina de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 1%, formando desta maneira o reativo C. Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de reativo C foi adicionado a 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra e estas foram incubadas durante 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado o reagente de titulação FOLIN-Ciocalteu Fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído duas vezes em água destilada a fim de conseguir uma solução final a 1N. As amostras foram incubadas por 20 min em ambiente escuro. Em seguida as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 650 nm. A curva padrão (0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 mg/mL) foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque de albumina bovina fração V (10 mg/mL) (pH 7,0) (AppliChem, St. Louis, MO, USA).

#### *Ensaio de imunodeteção*

Os extratos dos tecidos previamente preparados foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína, foram misturadas em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8),  $\beta$ -mercaptoetanol 15%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%) e fervidas por 5 min a 100°C. Quantidades iguais de proteínas para cada amostra foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (12%). A próxima etapa consistiu na transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sob as seguintes condições: 100 V e 30 mA durante 1 hora. Após

a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e tween 0,05% em água destilada) contendo leite desnatado (5%) por no mínimo 1 h, a temperatura ambiente. Após a lavagem em TBS-T (4 vezes), as membranas foram incubadas em tempo e condições apropriadas para cada anticorpo primário contra as seguintes proteínas de interesse anti- $\beta$ -actina (1:1000) ou anti-proteína quinase C isoformas  $\alpha$  e  $\epsilon$  (PKC $\alpha$  e PKC $\epsilon$ ) (1:1000), todos da Santa Cruz Biotech. Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas em TBS-T (4 vezes) e incubadas com anticorpo secundário específico (anti IgG de camundongo ou coelho) conjugado a peroxidase (1:25.000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) durante 2 h a temperatura ambiente.

Os imuno-complexos foram visualizados usando sistema de detecção de substrato quimioluminescente, SuperSignal West Femto (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, EUA) e filme radiográfico (Hyperfilm ECL) (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil), segundo recomendações do fabricante. Os filmes foram digitalizados e os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os valores expressos como unidades arbitrárias. Os níveis de  $\beta$ -actina foram quantificados nos extratos citosólicos como um controle da quantidade de proteína por poço, mas não foram utilizados para normalização dos valores densitométricos. Para a PKC $\alpha$  os valores densitométricos obtidos a partir dos extratos de membrana foram divididos pelos valores dos extratos citosólicos. Já para a PKC $\epsilon$  foram expressos os valores densitométricos absolutos para cada fração (membrana e citosol), em função de ter sido observado aumento da marcação em ambas as frações (ver seção de resultados: Item 19).

### 3 – PROTOCOLOS

3.1 - Efeito do tratamento com um antagonista seletivo para o canal TRPV4 sobre a nocicepção declarada e hiperalgisia mecânica induzidas pela BK

Neste experimento, os animais foram pré-tratados 1 h antes da injeção i.pl. de BK (3 nmol/pata em 20  $\mu$ L de salina) com o antagonista seletivo para o canal TRPV4, HC-067047 (10 mg/Kg, i.p.). Animais controle receberam somente o veículo por via i.p. (10 mL/Kg de DMSO 2%). A nocicepção declarada foi avaliada durante os primeiros 5 min após a BK (ou veículo; 20  $\mu$ L de salina), e a hiperalgisia mecânica entre 20 e 240 min após o algógeno.

3.2 - Avaliação do possível efeito sensibilizador da BK sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo agonista seletivo do canal TRPV4 ou pela hipotonicidade

A BK (0,3 nmol/pata em 10  $\mu$ L de salina) ou seu veículo (10  $\mu$ L de salina) foram injetados por via i.pl. em camundongos e, após 5 min, os animais receberam uma injeção do agonista seletivo para o canal TRPV4, 4 $\alpha$ -PDD (1 nmol/pata em 10  $\mu$ L de veículo), no mesmo local. Animais controle receberam somente o veículo (DMSO 1%). Outros grupos experimentais receberam, 5 min após a BK, uma injeção de solução hipotônica (Hipo; 10  $\mu$ L de água ultrapura, 18 mOsm) no mesmo local. Animais controle receberam solução isotônica (Iso; 10  $\mu$ L de salina, 300 mOsm). A nocicepção declarada e a hiperalgisia mecânica foram avaliadas, respectivamente, durante os primeiros 5 min e entre 15 e 120 min após a injeção de 4 $\alpha$ -PDD ou solução hipotônica.

### 3.3 - Efeito do tratamento com diferentes antagonistas e inibidores sobre a nocicepção declarada e hiperalgesia mecânica induzidas pela combinação de BK e hipotonicidade

O envolvimento de diferentes receptores e enzimas de sinalização nos efeitos nociceptivos caudados pela combinação de BK (0,3 nmol/pata) e hipotonicidade (10  $\mu$ L de água ultrapura, 18 mOsm) foi avaliado através do tratamento com diferentes antagonistas ou inibidores. As drogas foram administrados através de co-injeção com BK (5 min antes da hipotonicidade) ou sistemicamente (v.o. ou s.c.), 1 h antes da BK. As seguintes drogas foram utilizadas: antagonista seletivo para o TRPV4, HC-067047 (3  $\mu$ g/pata, em 10  $\mu$ L de DMSO 2%); antagonista peptídico e seletivo para o B<sub>1</sub>R DALBK (3 nmol/pata, em 10  $\mu$ L de salina); antagonista peptídico e seletivo para o B<sub>2</sub>R Hoe 140 (3 nmol/pata, em 10  $\mu$ L de salina); inibidor seletivo para a PLA<sub>2</sub>, PACOCF<sub>3</sub> (1 nmol/pata, em 10  $\mu$ L de etanol inferior a 0,5%); inibidor seletivo para PKA, KT-5720 (3 nmol/pata, em 10  $\mu$ L de etanol inferior a 0,5%); inibidor seletivo para a enzima PLC, U73122 (30 pmol/pata, em 10  $\mu$ L de etanol inferior a 0,5%); inibidor não-seletivo de diferentes isoformas de PKC, GF109203X (3 nmol/pata, em 10  $\mu$ L de etanol inferior a 0,5%); antagonista seletivo para o canal TRPV1, SB366791 (1 nmol/pata, em 10  $\mu$ L de etanol inferior a 0,5%); inibidor não-seletivo de COX1/2, indometacina (5 mg/Kg, v.o., em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%, volume de 10 mL/Kg); inibidor da liberação de catecolaminas, guanetidina (30 mg/kg, s.c., em salina, volume de 10 mL/Kg). O efeito dos antagonistas ou inibidores em animais controle (injeção de salina seguida por hipotonicidade) também foi avaliado. Os demais grupos controle receberam somente os veículos. A nocicepção declarada e a hiperalgesia mecânica foram avaliadas, respectivamente, durante os primeiros 5 min e 15 min após a injeção da solução hipotônica.

### 3.4 - Efeito da injeção intraplantar (i.pl.) do agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> sobre o limiar mecânico de camundongos

Os animais receberam uma injeção i.pl. do agonista seletivo do B<sub>1</sub>R, peptídeo DABK (20 nmol/pata em 20 µL de salina) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 60 e 240 min após o algógeno. Animais controle receberam somente salina (20 µL).

### 3.5 - Avaliação do possível efeito sensibilizador do agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> sobre as respostas nocivas induzidas pelo hipotonicidade

O peptídeo DABK (20 nmol/pata em 10 µL de salina) ou veículo (10 µL de salina) foram injetados por via i.pl. e, 5 min após, os animais receberam uma injeção de solução hipotônica (10 µL de água ultrapura, 18 mOsm) no mesmo local. Animais controle receberam solução isotônica (10 µL de salina, 300 mOsm). A nocicepção declarada e a hiperalgesia mecânica foram avaliadas, respectivamente, durante os primeiros 5 min e 15 min após a indução da hipotonicidade.

### 3.6 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de DABK

A fim de se avaliar o envolvimento do canal TRPV4 na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.t. do peptídeo DABK (30 nmol/sítio, 5 µL), os animais foram tratados com o antagonista seletivo para este canal, HC-067047 (0,3 e 3 µg/sítio), co-injetado com o peptídeo. Animais controle receberam somente o veículo (DMSO 2%). A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 30 e 240 min após a injeção i.t. do algógeno.

### 3.7 - Avaliação da co-injeção intratecal (i.t.) do peptídeo DABK e agonista seletivo do canal TRPV4 ou solução hipotônica sobre o limiar mecânico de camundongos

O peptídeo DABK (3 nmol/sítio) foi coadministrado com 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/sítio) ou veículo (5  $\mu$ L de DMSO 1%) por via i.t. Os animais controle receberam DABK (3 nmol/sítio) em salina (5  $\mu$ L/sítio), somente veículo (5  $\mu$ L de DMSO 1%) ou somente salina (5  $\mu$ L/sítio). Em outro experimento, o peptídeo DABK (3 nmol/sítio) foi administrado em solução hipotônica (Hipo; 5  $\mu$ L de água ultrapura, 18 mOsm) por via i.t. Os animais controle receberam DABK (3 nmol/sítio) em solução isotônica (Iso; 5  $\mu$ L de salina, 300 mOsm), somente solução hipotônica ou somente solução isotônica. Em ambos os experimentos a sensibilidade aos filamentos de von Frey foi avaliada entre 15 e 120 min após a injeção i.t.

### 3.8 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX

Camundongos foram tratados com PTX (ou veículo) e 7 dias após o primeiro tratamento receberam o antagonista seletivo para o TRPV4, HC-067047 (3 e 10 mg/Kg, i.p.). Animais controle receberam somente o veículo (DMSO 2%). A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 1 e 6 h após a administração do antagonista.

### 3.9 - Efeito do tratamento com o antagonista seletivo do TRPV4 sobre a nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com PTX

Com o intuito de confirmar o envolvimento do TRPV4 na responsividade aumentada à hipotonicidade em animais neuropáticos, o antagonista seletivo para este canal HC-067047 (3  $\mu$ g/pata) foi administrado 5 min antes da solução hipotônica. Os experimentos comportamentais foram conduzidos conforme descrito acima (item 2.3).

### 3.10 - Efeito da combinação de antagonistas cininérgicos e do canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX

Neste bloco de experimentos avaliou-se o efeito das combinações de tratamento entre DALBK (150 nmol/Kg, i.p.) ou Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.) com HC-067047 (10 mg/Kg, i.p.) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Os camundongos foram tratados com o quimioterápico ou seu veículo (controle) e, 7 dias após o primeiro tratamento, foram administrados com os antagonistas ou combinação de antagonistas. Animais controle receberam somente os veículos, ou seja, solução salina para os antagonistas cininérgicos e DMSO 2% para o HC-067047. A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 1 e 6 h após a administração dos antagonistas.

### 3.11 - Efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre a nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com PTX

Neste experimento os animais foram tratados com PTX (ou veículo) entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. Alguns grupos experimentais receberam os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (100 nmol/Kg, i.p.) e Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.), respectivamente. Os antagonistas foram administrados 2 vezes ao dia (a cada 12 h) até o 6º dia após o primeiro tratamento com PTX. No 7º dia, os antagonistas foram administrados 2 h antes do experimento comportamental. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9 %). A nocicepção declarada à hipotonicidade em animais neuropáticos foi realizada conforme descrito acima (item 2.3).

### 3.12 – Efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre a expressão das enzimas PKC $\alpha$ e PKC $\epsilon$ em animais tratados com PTX

Os animais foram tratados com PTX (ou veículo) entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. Alguns grupos experimentais receberam os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (100 nmol/Kg, i.p.) e Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.), respectivamente. Os antagonistas foram administrados 2 vezes ao dia (a cada 12 h) até o 7º dia após o primeiro tratamento com PTX, sendo que o último tratamento foi administrado 2 h antes da coleta dos tecidos. Os animais foram sacrificados, a pele da pata foi coletada e congelada a -70°C até o dia do processamento.

### 3.13 - Avaliação do possível efeito sensibilizador do peptídeo $\psi\epsilon$ RACK sobre as respostas nocivas induzidas pela hipotonicidade

O ativador seletivo da PKC $\epsilon$ , peptídeo  $\psi\epsilon$ RACK (0,1  $\mu$ g/pata em 10  $\mu$ L de salina), ou seu veículo (10  $\mu$ L de salina), foram injetados por via i.pl. Após 5 min, os animais receberam solução hipotônica (10  $\mu$ L de água ultrapura, 18 mOsm) no mesmo local. Os grupos controle receberam solução isotônica (10  $\mu$ L de salina, 300 mOsm). A nocicepção declarada e a hiperalgiesia mecânica foram avaliadas, respectivamente, durante os primeiros 5 min e 15 min após a injeção da solução hipotônica.

### 3.14 - Efeito do tratamento com um inibidor seletivo da PKC $\epsilon$ sobre a nocicepção declarada induzida por hipotonicidade em animais tratados com PTX

Neste experimento, os animais foram tratados com PTX (ou veículo) entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. Alguns animais receberam o inibidor seletivo para a PKC $\epsilon$ , peptídeo  $\epsilon$ V1-2 (9  $\mu$ g/pata), o qual foi administrado 1 vez ao dia até o 6º dia após o primeiro tratamento com PTX. No 7º dia, o

inibidor foi administrado 2 h antes do experimento comportamental. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9 %). A nocicepção declarada à hipotonicidade em animais neuropáticos foi realizada conforme descrito acima (item 2.3).

## SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

As seguintes drogas foram utilizadas no presente estudo: PTX (Laboratório Dosa S.A., Buenos Aires, Argentina); 4 $\alpha$ -forbol 12,13 didecanoato (4 $\alpha$ -PDD), azul de Evans, bradicinina (BK), des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (DABK), des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradicinina (DALBK), gabapentina, guanetidina, HC-067047, indometacina, morfina e SB366791 (todos obtidos da Sigma Chemical, Saint Louis, MO, EUA); GF109203X, KT-5720, PACOCF3 e U73122 (todas da Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). Glu-Ala-Val-Ser-Leu-Lys-Pro-Thr ( $\epsilon$ V1-2 ) e His-Asp-Ala-Pro-Ile-Gly-Tyr-Asp ( $\psi$  $\epsilon$ RACK) (ambos da GenScript USA Inc, Piscataway, NJ, EUA); Quetamina e Xilazina (Syntec do Brasil, Hortolândia, SP, Brasil); Isoflurano (Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil).

A solução estoque de PTX (6 mg/mL em Cremophor EL<sup>®</sup>) foi diluída em salina a uma concentração de 0,2 mg/mL (solução de injeção). O éster de forbol 4 $\alpha$ -PDD e o HC-067047 foram diluídos em DMSO (DMSO 1-2%). A indometacina foi diluída em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. O SB366791, GF109203X, KT-5720, PACOCF3 e U73122 foram diluídos em etanol (solução de administração não ultrapassou 0,05% de etanol). As demais drogas foram diluídas em salina.

As doses e protocolos de administração foram baseados em dados prévios do laboratório (FERREIRA et al., 2004; 2005; QUINTÃO et al., 2008; ANDRADE et al., 2008; MANJAVACHI et al., 2010).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 3-6 animais para os experimentos moleculares e de 6-10 animais para os experimentos comportamentais (conforme indicado em cada experimento). As porcentagens de inibição estão apresentadas como a média  $\pm$  erro padrão das inibições obtidas para cada experimento individual, sendo que para os experimentos com decurso temporal (horas ou dias) as porcentagens de inibição foram calculadas a partir da área sob a curva (ASC) de cada gráfico. A análise estatística dos experimentos comportamentais com decurso temporal foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni. Os demais experimentos comportamentais foram avaliados através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman Keuls. Os experimentos de imuno-histoquímica e de dosagem do corante azul de Evans foram avaliados por Teste *t* de Student. Os demais experimentos comportamentais foram analisados através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman Keuls. Valores de P menores que 0,05 foram considerados como indicativos de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

## 4 - RESULTADOS

### PARTE I - ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

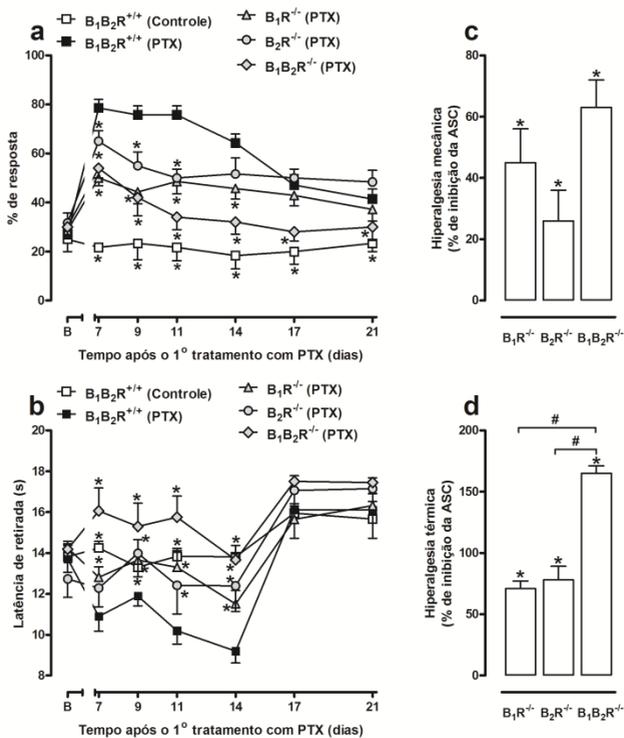
#### 1 - INDUÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA PELO TRATAMENTO COM PACLITAXEL EM CAMUNDONGOS

Como demonstrado na figura 1, o tratamento de camundongos com o quimioterápico PTX (2 mg/Kg, i.p.) causou hiperalgesia mecânica e térmica, caracterizadas, respectivamente, pelo aumento na frequência de retiradas da pata frente aplicações do filamento de von Frey e diminuição no tempo de latência de retirada da pata frente a aplicação de fonte radiante. Tais efeitos foram observados em duas linhagens diferentes de camundongos, C57BL/6 (Figura 1) e CD1 (Figura 3). A hiperalgesia foi evidenciada a partir de 7 dias após o primeiro tratamento com PTX. A hiperalgesia mecânica se manifestou por pelo menos 21 dias (Figura 1 a), enquanto que a hiperalgesia térmica se resolveu a partir do 17º dia (Figura 1 b). O tratamento com PTX não causou perda significativa de peso ou alteração na temperatura corporal dos camundongos em todas as linhagens testadas (Figura 2).

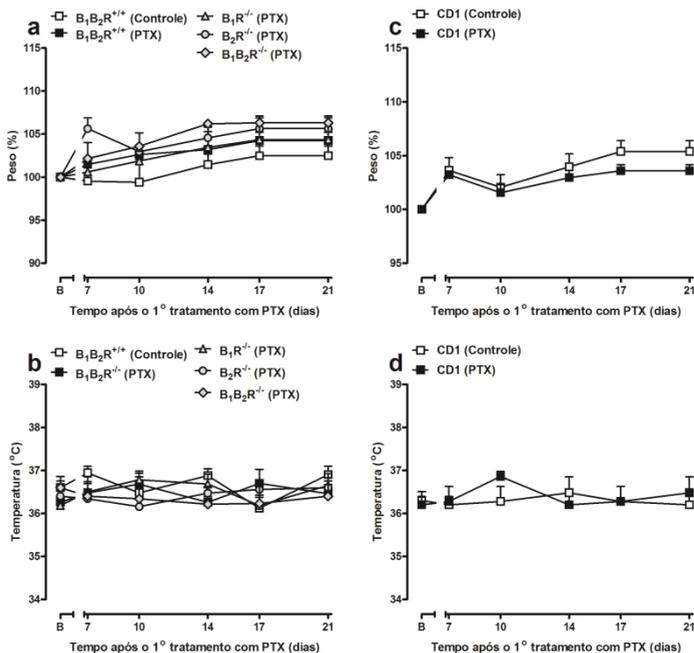
#### 2 - INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA HIPERALGESIA PELO PACLITAXEL

Neste bloco de experimentos foi avaliado o possível envolvimento dos receptores cininérgicos na hiperalgesia induzida pelo PTX, através do emprego de animais com deleção do gene para estes receptores. A figura 1 ilustra os efeitos do tratamento com PTX em animais nocautes ( $B_1R^{-/-}$ ,  $B_2R^{-/-}$  e  $B_1B_2^{-/-}$ ) para os receptores das cininas. Como pode ser observado, a hiperalgesia mecânica e térmica foi reduzida em animais com

deleção dos receptores cininérgicos ( $B_1R^{-/-}$  e  $B_2R^{-/-}$ ), bem como em animais duplo-nocaute, durante todo o período de avaliação, quando comparado aos animais do tipo selvagem ( $B_1B_2^{+/+}$ ). A deleção concomitante de ambos os receptores foi mais eficaz sobre as respostas hiperalgésicas do que a deleção de um único receptor (Figura 1 a, b e d). O tratamento com PTX não alterou significativamente o peso ou a temperatura dos animais nocautes (Figura 2).



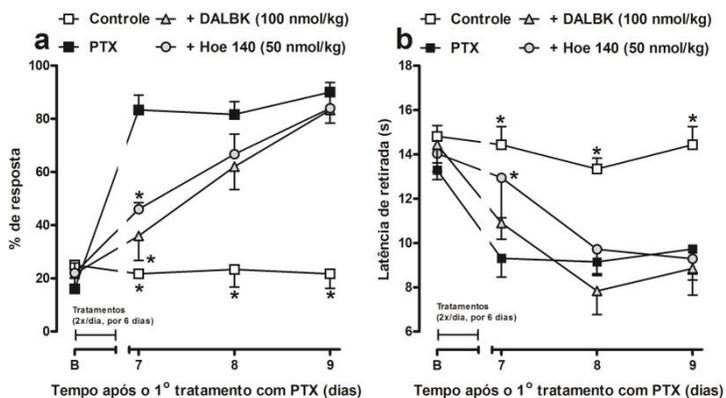
**Figura 1** - A deleção do gene para os receptores cininérgicos inibe a hiperalgesia induzida pelo paclitaxel (PTX) em camundongos. (a) Hiperalgesia mecânica causada pelo PTX em animais selvagens ( $B_1B_2R^{+/+}$ ) e nocautes para os receptores das cininas ( $B_1R^{-/-}$ ,  $B_2R^{-/-}$  e  $B_1B_2R^{-/-}$ ). (b) Hiperalgesia térmica causada pelo PTX em animais selvagens e nocautes para os receptores das cininas. (c) Porcentagem de inibição da área sobre a curva (ASC) da hiperalgesia mecânica (0 a 21 dias). (d) Porcentagem de inibição da ASC da hiperalgesia térmica (0 a 21 dias). Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo selvagem ( $B_1B_2R^{+/+}$ ) tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal. # $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo  $B_1R^{-/-}$  ou  $B_2R^{-/-}$ . ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls.



**Figura 2** – O tratamento com paclitaxel (PTX) não altera o peso ou temperatura corporal de camundongos CD1 ou C57BL/6 (selvagens ou nocautes). (a, b) Peso corporal (% em relação ao peso inicial) de animais tratados com PTX (2 mg/Kg, i.p., 1 vez ao dia, durante 5 dias). (c, d) Temperatura retal dos animais tratados com PTX. Cada grupo representa a média de 6 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: valor basal.

### 3 - AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA GÊNESE DA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PACLITAXEL

Após a constatação do envolvimento dos receptores cininérgicos na hiperalgesia induzida pelo PTX, avaliou-se o possível envolvimento destes receptores na indução deste fenômeno. A figura 3 ilustra os efeitos do pré-tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (100 nmol/Kg, i.p., 2 vezes ao dia, por 6 dias) ou Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p., 2 vezes ao dia, por 6 dias), respectivamente, sobre a indução da hiperalgesia induzida pelo PTX. Os resultados demonstram que ambos os antagonistas foram eficazes em inibir a hiperalgesia mecânica (Figura 3 a) e térmica (Figura 3 b) somente no 7º dia após o primeiro tratamento com o quimioterápico. A resposta hiperalgésica de animais tratados com os antagonistas cininérgicos retornou a partir do 8º dia, sugerindo que estes receptores não contribuem expressivamente para a gênese da hiperalgesia. Do mesmo modo, o tratamento combinado com ambos os antagonistas reduziu a hiperalgesia somente no 7º dia, com perfil semelhante ao observado para os tratamentos não combinados (dados não demonstrados).

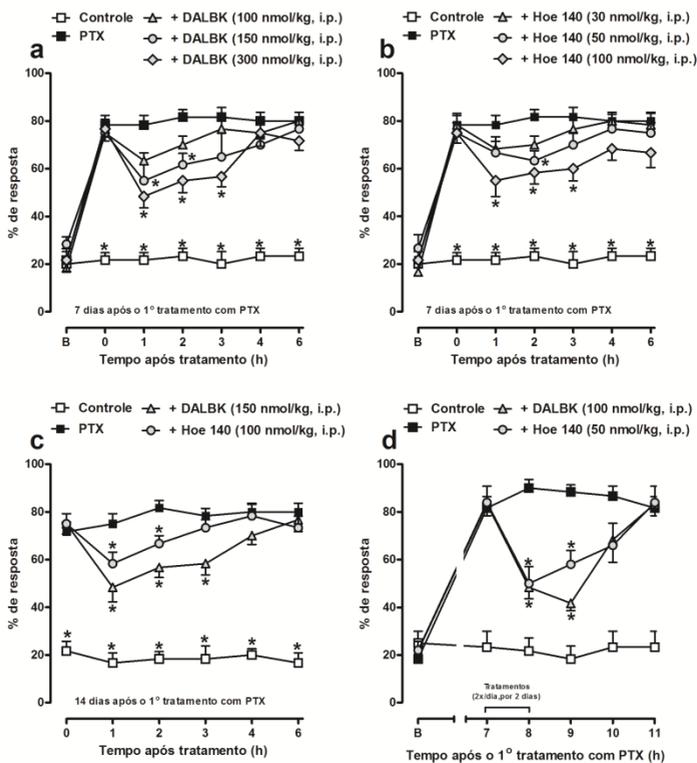


**Figura 3** – Os receptores cininérgicos não interferem expressivamente com a gênese da hiperalgesia induzida pelo PTX. Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (100 nmol/Kg, i.p., 2x ao dia) e Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p., 2x ao dia), administrados entre 0 e 6 dias após o primeiro tratamento com PTX, sobre a hiperalgesia mecânica (a) e térmica (b). Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

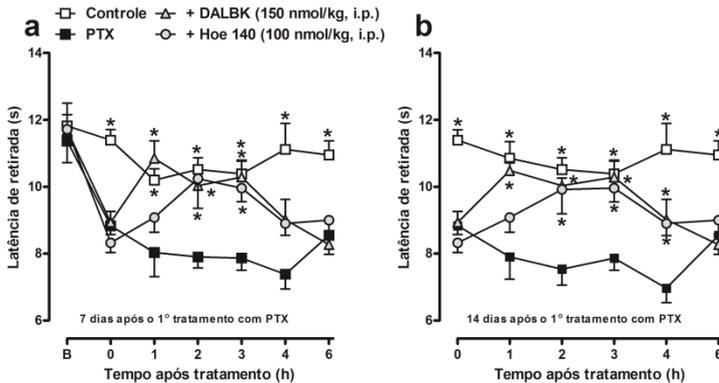
#### 4 - AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CININÉRGICOS NA MANUTENÇÃO NA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PACLITAXEL

Diante dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, procurou-se avaliar a participação dos receptores cininérgicos na manutenção da hiperalgesia induzida pelo PTX. Nas figuras 4 e 5 estão demonstrados os efeitos do tratamento com antagonistas seletivos para estes receptores sobre a manutenção da hiperalgesia induzida pelo quimioterápico. O tratamento único com DALBK (100 – 300 nmol/Kg, i.p.) ou Hoe 140 (30 – 100 nmol/Kg, i.p.) inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica no 7º (Figura 4 a, b) e 14º (Figura 4 c) dias. Resultados semelhantes foram observados sobre a hiperalgesia térmica (Figura 5). As porcentagens de inibição para estes efeitos estão demonstradas na Tabela 1.

De modo relevante, o tratamento repetido com DALBK (100 nmol/Kg, i.p.) ou Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.) durante 2 dias (a cada 12 horas) foi capaz de inibir significativamente a hiperalgesia mecânica causada pelo PTX (Figura 4 d), com inibição de  $41 \pm 2\%$  e  $36 \pm 8\%$  para DALBK e Hoe140, respectivamente. Do mesmo modo, o tratamento combinado com ambos os antagonistas foi efetivo sobre este parâmetro, porém não apresentou maior eficácia em relação aos tratamentos não combinados (dados não demonstrados).



**Figura 4** – Os receptores cininérgicos contribuem para a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (100-300 nmol/Kg, i.p.) e Hoe 140 (30-100 nmol/Kg, i.p.), administrados no 7º (a, b) e 14º (c) dias após o primeiro tratamento com PTX, sobre a hiperalgesia mecânica. (d) Efeito do tratamento com DALBK (100 nmol/Kg, i.p., 2x ao dia) e Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p., 2x ao dia), administrados entre 7 e 8 dias após o primeiro tratamento com PTX, sobre a hiperalgesia mecânica. Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.



**Figura 5** – Os receptores cininérgicos contribuem para a manutenção da hiperalgesia térmica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (150 nmol/Kg, i.p.) e Hoe 140 (100 nmol/Kg, i.p.), administrados no 7º (a) e 14º (b) dias após o primeiro tratamento com PTX, sobre a hiperalgesia térmica. Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

## 5 - EFEITO DO TRATAMENTO COM GABAPENTINA OU MORFINA SOBRE A HIPERALGESIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

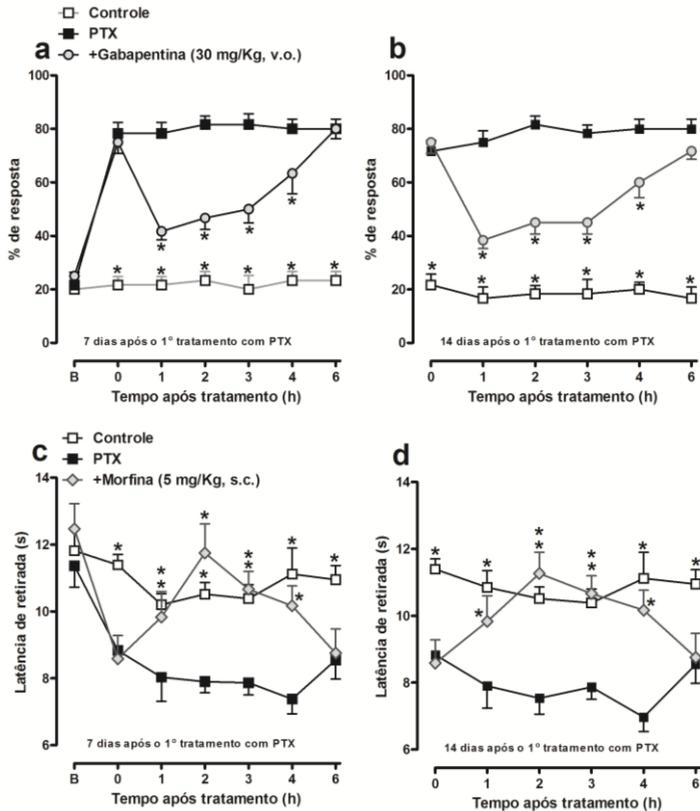
Com o intuito de comparar o efeito de antagonistas cininérgicos com fármacos utilizados clinicamente no tratamento da dor crônica, neste bloco de experimentos foi avaliado o efeito da gabapentina ou morfina, respectivamente, sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pelo PTX. O tratamento com gabapentina (30 mg/Kg, v.o.) inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica (Figura 6 a, b) no 7º e 14º dias após o primeiro tratamento com PTX. De modo semelhante, o tratamento com morfina (5 mg/Kg, s.c.) foi altamente eficaz sobre hiperalgesia térmica (Figura 6 c, d). A porcentagem de

inibição destas respostas por estes fármacos foi superior àquela causada pelos antagonistas cininérgicos quando administrados por via sistêmica (Tabela 1).

**Tabela 1** - Porcentagens de inibição para os tratamentos com gabapentina (Gaba), morfina e antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK e Hoe 140, respectivamente, sobre a hiperalgesia induzida pelo PTX.

Droga/via	Inibição (%) <sup>a</sup>			
	Hiperlgesia mecânica		Hiperlgesia térmica	
	Dia 7	Dia 14	Dia 7	Dia 14
Gaba/v.o.	38 ± 6*	43 ± 5*	N.A.	N.A.
Morfina/s.c.	N.A.	N.A.	80 ± 5*	80 ± 3*
DALBK/i.p.	23 ± 9*	25 ± 7*	39 ± 5*	37 ± 5*
Hoe 140/i.p.	28 ± 6*	10 ± 5 <sup>N.S.</sup>	54 ± 10*	50 ± 9*
DALBK/i.t.	40 ± 8*	27 ± 8*	N.A.	N.A.
Hoe 140/i.t.	23 ± 4*	27 ± 12*	N.A.	N.A.
DALBK/i.c.v.	17 ± 5 <sup>N.S.</sup>	34 ± 5*	N.A.	N.A.
Hoe 140/i.c.v.	7 ± 2 <sup>N.S.</sup>	10 ± 7 <sup>N.S.</sup>	N.A.	N.A.

<sup>a</sup>Porcentagem de inibição da área sob a curva (ASC) da hiperalgesia mecânica e térmica avaliada entre 0 e 6 horas após o tratamento com os antagonistas. N.A.: Não avaliado. N.S.: Não significativo. \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com veículo. Teste t de Student.



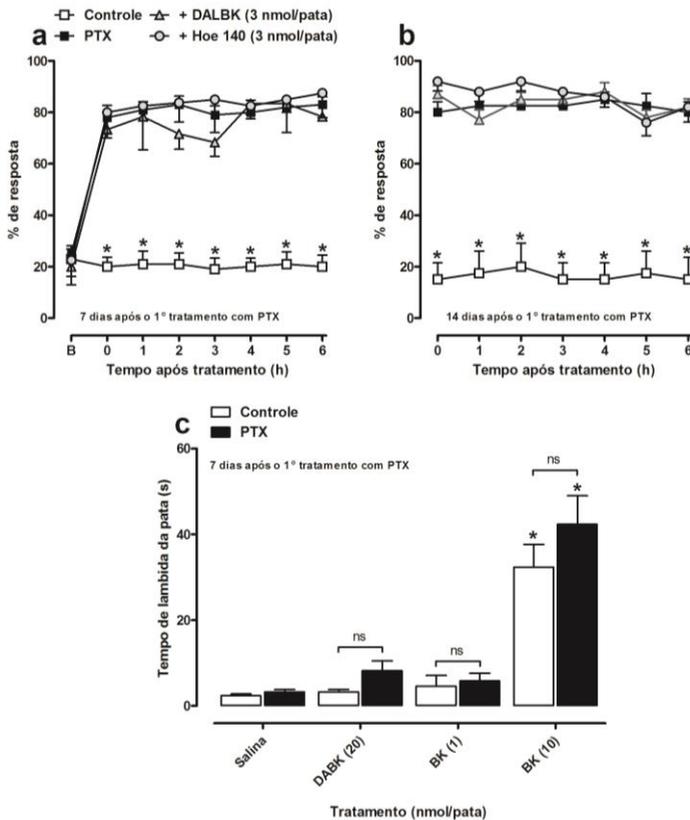
**Figura 6** – Analgésicos utilizados clinicamente contra a dor crônica são eficazes sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento com (a, b) gabapentina (30 mg/Kg, v.o.) sobre a hiperalgesia mecânica ou (c, d) morfina (5 mg/Kg, s.c.) sobre a hiperalgesia térmica, administrados no 7º (a, c) e 14º (b, d) dias após o primeiro tratamento com PTX. Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

## 6 - EFEITO DO TRATAMENTO PERIFÉRICO COM ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES CININÉRGICOS SOBRE A HIPERALGESIA CAUSADA PELO PACLITAXEL

Neste bloco de experimentos, foi avaliado o envolvimento periférico de receptores cininérgicos na hiperalgesia induzida pelo PTX, através do tratamento i.pl. com antagonistas seletivos para estes receptores. Conforme ilustrado na figura 7, o tratamento i.pl. com os antagonistas para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (3 nmol/pata) ou Hoe 140 (3 nmol/pata), respectivamente, não alterou significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo quimioterápico, quando administrados no 7º ou 14º dias. Estes resultados sugerem que os receptores cininérgicos periféricos, ao menos aqueles expressos no tecido subcutâneo plantar, não contribuem para a hiperalgesia causada pelo PTX.

## 7 - EFEITO DA INJEÇÃO PERIFÉRICA DE AGONISTAS DOS RECEPTORES CININÉRGICOS SOBRE A NOCICEPÇÃO DECLARADA EM ANIMAIS TRATADOS COM PACLITAXEL

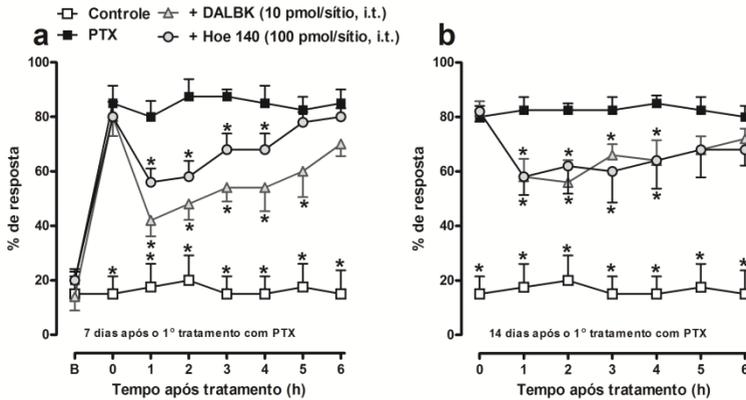
A resposta funcional de receptores cininérgicos em animais tratados com PTX foi avaliada também através da nocicepção declarada causada pela injeção i.pl. de seus agonistas. A injeção i.pl. de DABK (20 nmol/pata) não causou nocicepção quando comparada a injeção de salina, tanto em animais controle, quanto nos animais tratados com o PTX (Figura 7 c). Resultados semelhantes foram observados para a BK na dose de 1 nmol/pata (Figura 7 c). No entanto, o tratamento com BK na dose de 10 nmol/pata causou aumento no tempo gasto com comportamentos nocivos, embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos controle e PTX (Figura 7 c).



**Figura 7** – Os receptores cininérgicos periféricos parecem não mediar a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento i.pl. com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (3 nmol/pata) e Hoe 140 (3 nmol/pata), administrados no 7º (a) e 14º (b) dias após o primeiro tratamento com PTX. (c) Efeito da injeção i.pl. de agonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, DABK (20 nmol/pata) e BK (1 e 10 nmol/pata), respectivamente, sobre a nocicepção declarada em animais tratados com veículo ou PTX. Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). (a) e (b) \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal. (c) \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com salina (i.pl.). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

## 8 - EFEITO DO TRATAMENTO INTRATECAL COM ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES CININÉRGICOS SOBRE A HIPERALGESIA CAUSADA PELO PACLITAXEL

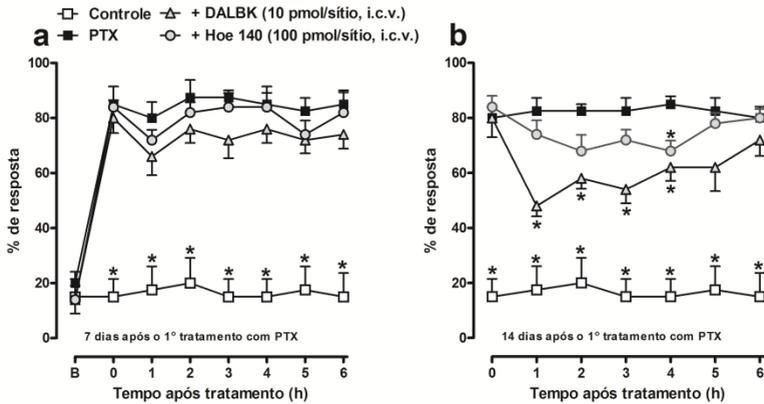
A participação de receptores cininérgicos espinhais na hiperalgesia induzida pelo PTX foi avaliada pelo tratamento i.t. com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (10 pmol/sítio) e Hoe 140 (100 pmol/sítio), respectivamente. A figura 8 demonstra que ambos os tratamentos foram eficazes em inibir a hiperalgesia mecânica causada pelo PTX no 7º e 14º dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico (Figura 8 a, b). As porcentagens de inibição para estes efeitos estão demonstradas na Tabela 1. Portanto, receptores cininérgicos expressos na medula espinhal parecem ser importantes para a manutenção da hiperalgesia induzida pelo PTX.



**Figura 8** – Os receptores cininérgicos da medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento i.t. com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (10 pmol/sítio) e Hoe 140 (100 pmol/sítio), administrados no 7º (a) e 14º (b) dias após o primeiro tratamento com PTX. Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

## 9 - EFEITO DO TRATAMENTO INTRACEREBROVENTRICULAR COM ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES CININÉRGICOS SOBRE A HIPERALGESIA CAUSADA PELO PACLITAXEL

O envolvimento de receptores cininérgicos supraespinhais na hiperalgesia induzida pelo PTX foi avaliado pelo tratamento i.c.v. com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (10 pmol/sítio) e Hoe 140 (100 pmol/sítio), respectivamente. O tratamento com DALBK inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica no 14º dia após o primeiro tratamento com PTX (Figura 9 b), embora não tenha sido eficaz quando administrado no 7º dia (Figura 9 a). Já o tratamento com Hoe 140 não foi eficaz sobre este parâmetro em ambos os períodos de tempo avaliados (Figura 9 a, b). As porcentagens de inibição para estes efeitos estão demonstradas na Tabela 1. Estes resultados sugerem que o B<sub>1</sub>R expresso no cérebro medeia a manutenção da hiperalgesia induzida pelo PTX.

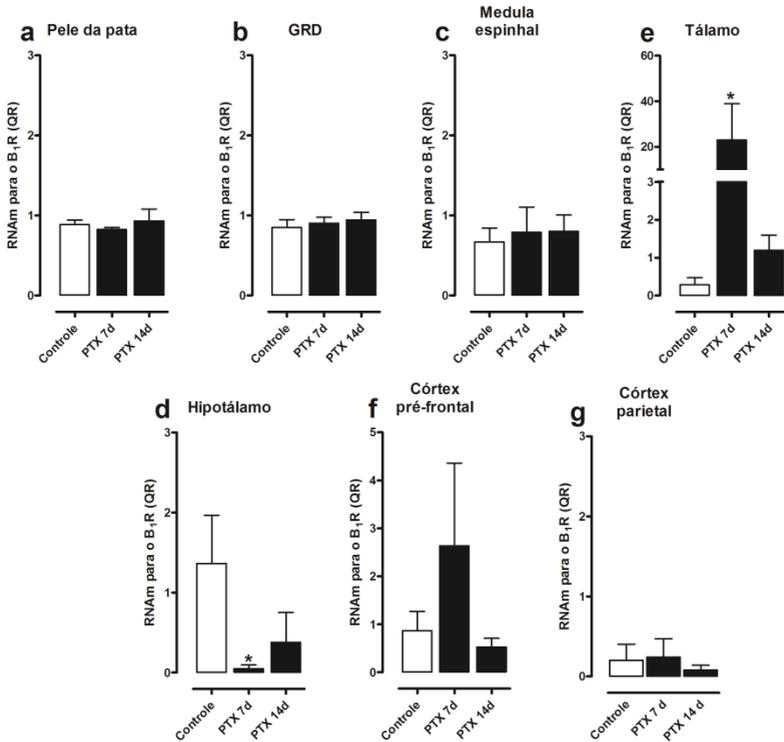


**Figura 9** – Os receptores cininérgicos da medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento i.c.v. com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, DALBK (10 pmol/sítio) e Hoe 140 (100 pmol/sítio), administrados no 7º (a) e 14º (b) dias após o primeiro tratamento com PTX. Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com PTX (■). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

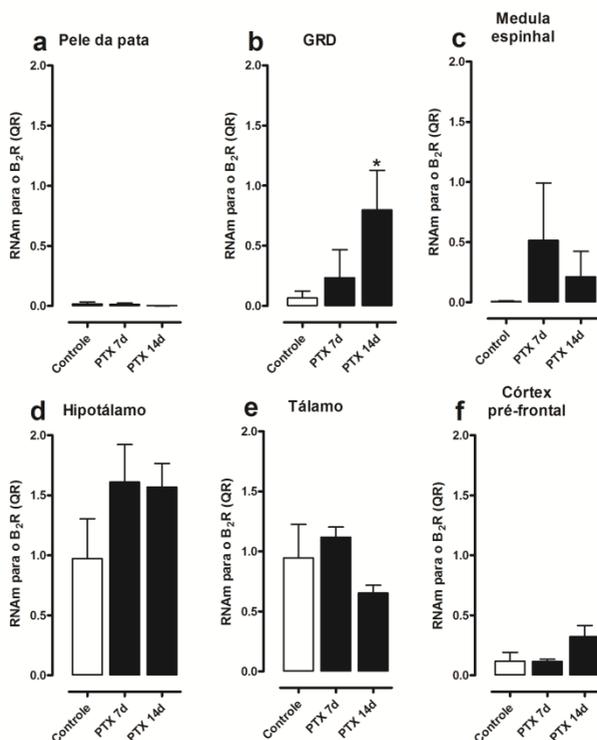
## 10 - QUANTIFICAÇÃO DO RNAm PARA OS RECEPTORES CININÉRGICOS APÓS O TRATAMENTO COM PACLITAXEL

Neste bloco de experimentos procurou-se avaliar se o tratamento com PTX altera a expressão dos receptores cininérgicos em tecidos envolvidos na detecção ou transmissão do estímulo nociceptivo. Conforme representado na figura 10, detectou-se expressão basal do RNAm para o receptor B<sub>1</sub> na pele, GRD, medula espinhal, tálamo, hipotálamo, córtex pré-frontal e córtex parietal. O tratamento com PTX não alterou significativamente a expressão deste receptor na pele, GRD, medula espinhal, córtex pré-frontal e córtex parietal. No entanto, foi observado aumento significativo dos níveis de RNAm para o B<sub>1</sub> no tálamo (Figura 10 e). Curiosamente, o tratamento com PTX reduziu no nível do receptor B<sub>1</sub> no hipotálamo (Figura 10 d).

Do mesmo modo que para o receptor B<sub>1</sub>, detectou-se expressão basal do RNAm para o B<sub>2</sub> em todos os tecidos avaliados (Figura 11). Curiosamente, 14 dias após o primeiro tratamento com PTX, foi observado aumento significativo do transcrito para o B<sub>2</sub> (Figura 11b) no GRD. Nas demais estruturas, não foi observada diferença estatística para a expressão do RNAm do B<sub>2</sub> entre o grupos controle e tratados com o PTX.



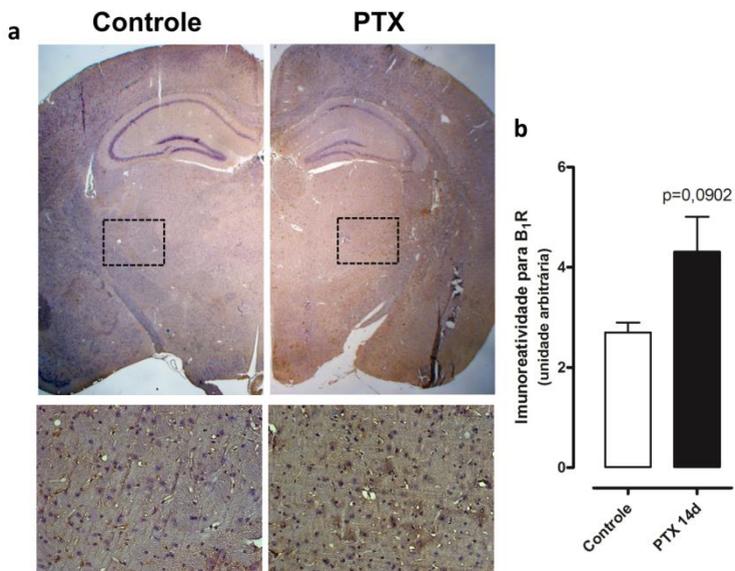
**Figura 10** – O tratamento com paclitaxel (PTX) aumenta a expressão do RNAm para o B<sub>1</sub>R no tálamo de camundongos. Expressão do RNAm para o B<sub>1</sub>R (a) na pele da pata, (b) gânglios da raiz dorsal (segmentos L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>), (c) medula espinal (segmentos L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>), (d) hipotálamo, (e) tálamo e (f) córtex pré-frontal. Cada grupo representa a média de 4-6 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo tratado com PTX. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. QR: quantificação relativa em relação ao GAPDH.



**Figura 11** – O tratamento com paclitaxel (PTX) não altera expressivamente os níveis do RNAm para o  $B_2R$  em diferentes tecidos de camundongos. Expressão do RNAm para o  $B_2R$  (a) na pele da pata, (b) gânglios da raiz dorsal (segmentos  $L_4$ - $L_6$ ), (c) medula espinhal (segmentos  $L_4$ - $L_6$ ), (d) hipotálamo, (e) tálamo e (f) córtex pré-frontal. Cada grupo representa a média de 4-6 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo tratado com PTX. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. QR: quantificação relativa em relação ao GAPDH.

## 11 – QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO B<sub>1</sub>R NO TÁLAMO APÓS O TRATAMENTO COM PACLITAXEL

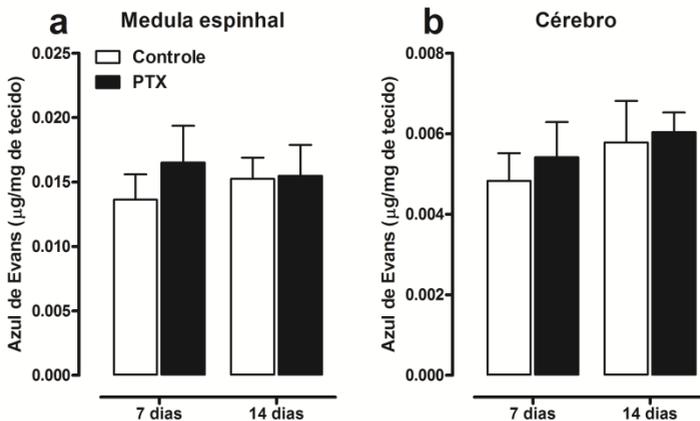
Tendo em vista a eficácia do tratamento i.c.v. com DALBK apenas no 14<sup>o</sup> após o primeiro tratamento com PTX, bem como o aumento da expressão do RNAm para o B<sub>1</sub>R no tálamo, analisou-se por imunistoquímica os níveis de expressão do B<sub>1</sub>R no tálamo de animais tratados com PTX. Conforme representado na figura 12, detectou-se expressão basal do B<sub>1</sub>R no tálamo e, embora não tenha sido observada diferença estatística, o tratamento com PTX aumentou os níveis do receptor nesta estrutura 14 dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico (Figura 12 b).



**Figura 12** – Níveis do B<sub>1</sub>R no tálamo de camundongos após o tratamento com paclitaxel (PTX). (a) Imagens representativas da imunomarcção para o B<sub>1</sub>R no tálamo. Aumento de 200 vezes. (b) Representação gráfica da quantificação da imunomarcção para o B<sub>1</sub>R no tálamo. Cada grupo representa a média de 3 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). Teste t de Student.

## 12 - AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA AO CORANTE AZUL DE EVANS EM ANIMAIS TRATADOS COM PACLITAXEL

Com o intuito de inferir se os antagonistas peptídicos para os receptores cininérgicos estariam atingindo estruturas centrais após administração i.p., devido à perda da integridade da BHE pelo tratamento com PTX, avaliamos a permeabilidade da medula espinal e do cérebro ao corante Azul de Evans. De acordo com os dados representados na figura 13, verificamos que a permeabilidade da BHE ao azul de Evans não foi alterada pelo tratamento com o quimioterápico. Portanto, é improvável que os antagonistas cininérgicos atinjam estruturas centrais quando administrados pela via i.p.

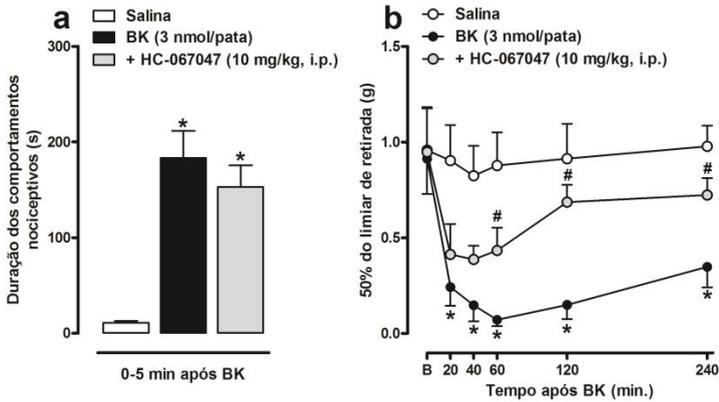


**Figura 13** – O tratamento com paclitaxel (PTX) não altera a permeabilidade da barreira hematoencefálica de camundongos. Níveis de Azul de Evans na (a) medula espinal e (b) cérebro de camundongos 7 e 14 dias após o primeiro tratamento com PTX. Cada grupo representa a média de 6 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). Teste t de Student.

## **PARTE II - INTERAÇÃO ENTRE RECEPTORES CININÉRGICOS E TRPV4: RELEVÂNCIA PARA A NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL**

### **1 - EFEITO DO TRATAMENTO O ANTAGONISTA SELETIVO PARA O CANAL TRPV4 SOBRE AS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA BRADICININA**

Na figura 14, pode-se verificar que a injeção i.pl. de BK (3 nmol/pata) causou comportamentos indicativos de nocicepção entre 0 e 5 minutos após a injeção do algógeno, bem como hiperalgisia mecânica, a qual se manifestou por pelo menos 4 horas. O tratamento com o antagonista seletivo para o canal TRPV4, HC-067047 (10 mg/Kg, i.p., 1h), não alterou a nocicepção declarada induzida pela BK (3 nmol/pata) (Figura 14 a). Contudo, este tratamento inibiu significativamente a hiperalgisia mecânica a partir de 1 h após a injeção da BK (Figura 14 b). Este resultado sugere que o canal TRPV4 medeia a hiperalgisia mecânica induzida pela BK em camundongos.



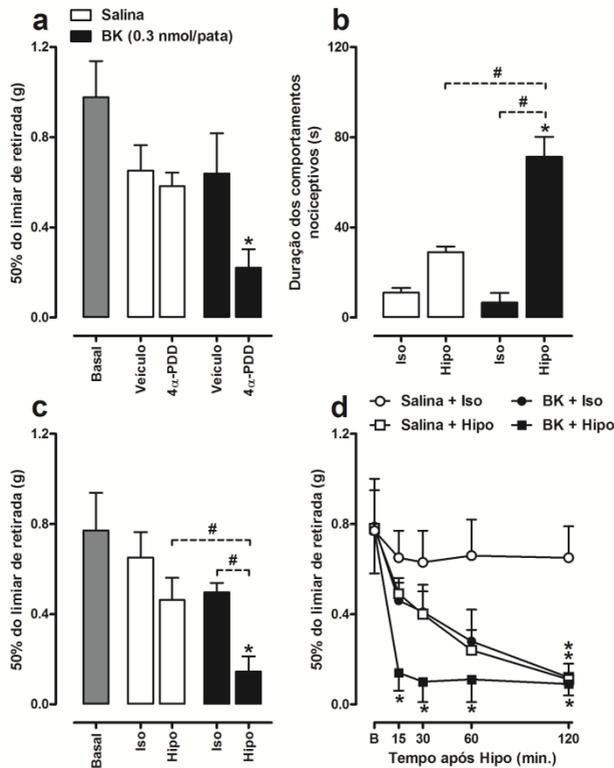
**Figura 14** – O canal TRPV4 medeia a hiperalgesia mecânica induzida pela bradicinina (BK). Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o TRPV4, HC-067047 (10 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre a nocicepção declarada (a) e hiperalgesia mecânica (b) induzidas pela BK (3 nmol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-8 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo injetado com salina. # $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo injetado com BK. (a) ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. (b) ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

## 2 - AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO SENSIBILIZADOR DA BRADICININA AO AGONISTA SELETIVO DO CANAL TRPV4

A injeção i.pl. de  $4\alpha$ -PDD (1 nmol/pata) em animais controle (pré-injetados com salina) não causou alteração significativa no limiar mecânico de camundongos, quando comparada a injeção do veículo (Figura 15 a). No entanto, em animais pré-tratados com BK (0,3 nmol/pata, 5 minutos antes) a injeção de  $4\alpha$ -PDD (1 nmol/pata) induziu hiperalgesia mecânica significativa (Figura 15 a). Animais pré-tratados com BK (0,3 nmol/pata) não apresentaram alteração do limiar mecânico após a injeção do veículo. O efeito potencializador das ações da BK sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo  $4\alpha$ -PDD se manifestou entre 15 e 30 min. A partir de 1 h não se observou diferenças entre os grupos experimentais, de modo que todos grupos apresentaram diminuição significativa do limiar mecânico em comparação aos animais controle (salina + veículo) (dados não apresentados). Curiosamente, a injeção de  $4\alpha$ -PDD (1 nmol/pata) foi ineficaz em causar nocicepção declarada em animais pré-tratados com BK (0,3 nmol/pata) (dados não demonstrados). Do mesmo modo, em experimentos pilotos, a injeção de  $4\alpha$ -PDD (1, 3 ou 10 nmol/pata) não causou comportamentos de nocicepção declarada em animais naïve, embora tenha causado diminuição do limiar mecânico nas maiores doses (dados não demonstrados).

### 3 - AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO SENSIBILIZADOR DA BRADICININA À HIPOTONICIDADE

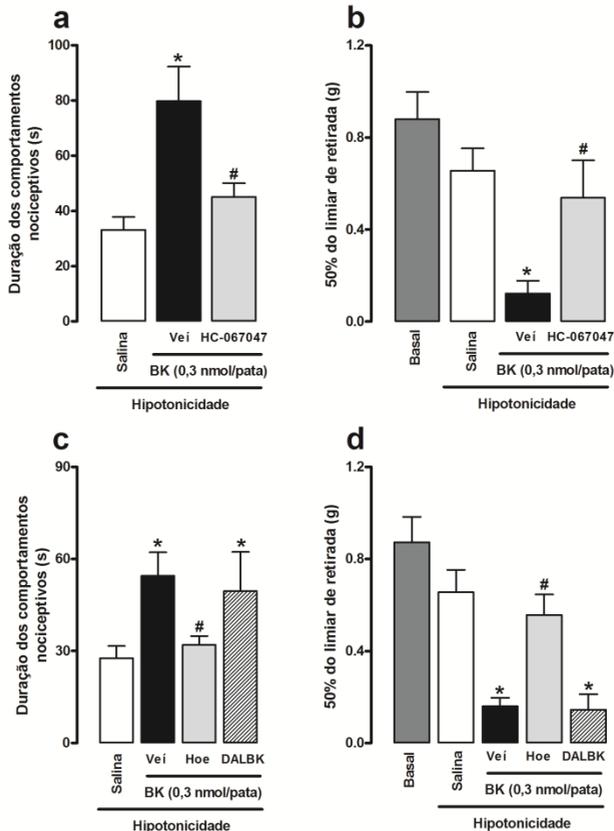
A injeção i.p.l. de solução hipotônica em animais controle (pré-injetados com salina) não causou alteração significativa nos comportamentos indicativos de nocicepção (Figura 15 b), bem como no limiar mecânico (Figura 15 c), quando comparada a injeção de solução isotônica. No entanto, em animais pré-tratados com BK (0,3 nmol/pata) a hipotonicidade induziu nocicepção declarada (Figura 15 b) e hiperalgesia mecânica (Figura 15 c) significativas. É importante mencionar que animais pré-tratados com BK (0,3 nmol/pata) não apresentaram comportamentos de nocicepção ou alteração significativa do limiar mecânico após a injeção de solução isotônica. O efeito potencializador da BK sobre as respostas nociceptivas da hipotonicidade se manifestou entre 15 minutos e 1 h após o estímulo hipotônico. A partir de 2 h não se observou diferenças entre os grupos experimentais (Figura 15 d). Assim, o tempo de 15 minutos foi escolhido para os experimentos posteriores.



**Figura 15** – A bradicinina (BK) sensibiliza os animais às respostas nociceptivas causadas pelos ativadores do TRPV4. (a) Hiperálgia mecânica induzida pela combinação entre BK (0,3 nmol/pata, 5 minutos antes) e 4 $\alpha$ -PDD (1 nmol/pata). (b) Nocicepção declarada e (c) hiperálgia mecânica causadas pela combinação de BK (0,3 nmol/pata) e hipotonicidade (Hipo; 10  $\mu$ L de água ultrapura). (d) Perfil temporal da hiperálgia mecânica induzida por BK e hipotonicidade. Cada grupo representa a média de 6-8 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo injetado com salina + veículo (a) ou salina + solução isotonicidade (Iso). <sup>#</sup> $P < 0,05$ : significativamente diferente dos grupos indicados pela linha pontilhada. (a, b e c) ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. (b) ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

#### 4 - EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA O CANAL TRPV4 E RECEPTORES CININÉRGICOS SOBRE AS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA COMBINAÇÃO DE BRADICININA E HIPOTONICIDADE

O tratamento i.pl. com HC-067047 (3 µg/pata), antagonista seletivo para o canal TRPV4, inibiu significativamente os comportamentos indicativos de nociceção (Figura 16 a) e a hiperalgesia mecânica (Figura 16 b) causados pela hipotonicidade em animais pré-injetados com BK (0,3 nmol/pata), quando comparado ao tratamento com o veículo. Do mesmo modo, o tratamento com Hoe 140 (3 nmol/pata), antagonista seletivo para o receptor B<sub>2</sub>, inibiu significativamente o efeito sensibilizador da BK sobre a nociceção declarada (Figura 16 c) e hiperalgesia mecânica (Figura 16 d) induzidas pela hipotonicidade em camundongos. Contudo, o tratamento com o antagonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub>, DALBK (3 nmol/pata), não interferiu com estas respostas (Figura 16 c, d). É importante mencionar que a injeção i.pl. de HC-067047 (3 µg/pata), Hoe 140 (3 nmol/pata) ou DALBK (3 nmol/pata) não alterou a nociceção declarada induzida pela hipotonicidade em animais controle (pré-injetados com salina), bem como não alterou o limiar mecânico destes animais (dados não demonstrados).



**Figura 16** – Os efeitos nocivos da combinação entre bradicinina (BK) e hipotonicidade dependem do canal TRPV4 e receptor B<sub>2</sub> para as cininas. Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos para (a, b) o canal TRPV4 (HC-067047; 3 µg/pata) e para (c, d) os receptores B<sub>1</sub> (DALBK; 3 nmol/pata) e B<sub>2</sub> (Hoe 140; 3 nmol/pata) das cininas, sobre a nocicepção declarada (a, c) e hiperálgia mecânica (b, d) induzidas pela combinação de BK (0,3 nmol/pata) e hipotonicidade (Hipo; 10 µL de água ultrapura). Animais controle receberam solução isotônica (Iso). Cada grupo representa a média de 6-8 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo “Salina + Hipo”. #P<0,05: significativamente diferente do grupo “BK + Hipo”. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

## 5 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE PRODUTOS DE CICLOOXIGENASES E DA LIBERAÇÃO DE CATECOLAMINAS NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA COMBINAÇÃO DE BRADICININA E HIPOTONICIDADE

As respostas nociceptivas à BK podem ser mediadas pela liberação de prostanóides e aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2007). Contudo, a sensibilização à hipotonicidade induzida pela BK parece não depender destes eventos, pois os tratamentos com indometacina (5 mg/Kg, v.o., 1 h antes) ou com guanetidina (30 mg/Kg, s.c., 1 h antes), inibidor não-seletivo das enzimas COX 1/2 e da liberação de catecolaminas, respectivamente, não interferiu com a nocicepção declarada (Tabela 2) ou com a hiperalgisia mecânica (Tabela 3) induzidas pela combinação de BK (0,3 nmol/pata) e hipotonicidade (10  $\mu$ L de água ultrapura). É importante mencionar que o tratamento com indometacina ou com guanetidina não alterou os comportamentos de nocicepção ou o limiar mecânico de camundongos controle (dados não demonstrados), e que as doses empregadas foram eficazes em experimentos controle.

## 6 - AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ENZIMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA COMBINAÇÃO DE BRADICININA E HIPOTONICIDADE

Os receptores cininérgicos podem se acoplar a proteína G $\alpha$ i e ativar a enzima PLA<sub>2</sub> (YANAGA et al., 1991 apud MIZUMURA et al., 2009). Além disso, os canais TRP, entre eles o TRPV4, podem ser modulados por produtos da ativação da enzima PLA<sub>2</sub> (para revisão ver: LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007). Assim, nos perguntamos se esta enzima estaria envolvida nos efeitos nocivos da combinação entre BK e hipotonicidade. No entanto, estas respostas parecem ser independentes da ativação da enzima PLA<sub>2</sub>, uma vez que o

tratamento com o inibidor seletivo desta enzima, PACOCF<sub>3</sub> (1 nmol/pata), não interferiu no efeito sensibilizador da BK (0,3 nmol/pata) sobre as respostas nociceptivas causadas pela hipotonicidade (10 µL de água ultrapura) (Tabelas 2 e 3). É importante mencionar que o tratamento com PACOCF<sub>3</sub> (1 nmol/pata) não alterou os comportamentos de nocicepção ou o limiar mecânico de camundongos controle (dados não demonstrados), e que as doses empregadas foram eficazes em experimentos controle.

## 7 - AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ENZIMA PROTEÍNA QUINASE A (PKA) NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA COMBINAÇÃO DE BRADICININA E HIPOTONICIDADE

A enzima PKA esta envolvida no efeito sensibilizador da BK sobre o canal TRPA1 (WANG et al., 2008). Além disso, o canal TRPV4 pode ser modulado por esta enzima (GRANT et al., 2007). Portanto, nos perguntamos se a ativação da PKA estaria envolvida na sensibilização à hipotonicidade induzida pela BK. No entanto, o tratamento com o inibidor seletivo da enzima PKA, KT-5720 (3 nmol/pata), não interferiu no efeito sensibilizador da BK (0,3 nmol/pata) sobre os efeitos nocivos induzidos pela hipotonicidade (10 µL de água ultrapura) (Tabelas 2 e 3). O tratamento com KT-5720 (3 nmol/pata) não alterou os comportamentos de nocicepção ou o limiar mecânico de camundongos controle (dados não demonstrados), e que as doses empregadas foram eficazes em experimentos controle.

**Tabela 2** – Efeito de diferentes inibidores sobre a nocicepção declarada induzida pela combinação de bradicinina (BK; 0,3 nmol/pata, 5 minutos antes) e hipotonicidade (10 µL de água ultrapura, 18 mOsm). A nocicepção declarada foi avaliada nos primeiros 5 minutos após a indução de hipotonicidade.

Tratamentos	Nocicepção declarada induzida pela hipotonicidade (s)		
	Salina + Veículo	BK + Veículo	BK + Tratamento
Indometacina (5 mg/kg, v.o.)	23 ± 5	71 ± 9*	58 ± 6*
Guanetidina (30 mg/kg, s.c.)	18 ± 3	68 ± 16*	51 ± 12
PACOFC <sub>3</sub> (1 nmol/pata)	23 ± 4	51 ± 9*	50 ± 12*
KT-5720 (3 nmol/pata)	28 ± 4	55 ± 6*	41 ± 7
U73122 (30 pmol/pata)	23 ± 4	51 ± 9*	30 ± 5 <sup>#</sup>
GF109203X (3 nmol/pata)	21 ± 4	64 ± 9*	33 ± 6 <sup>#</sup>
SB366791 (1 nmol/pata)	22 ± 5	64 ± 13*	56 ± 14*

\*P<0,05: significativamente diferente do grupo “Salina + Veículo”.

<sup>#</sup>P<0,05: significativamente diferente do grupo “BK + Veículo”.

ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. N.S.: Não significativo.

**Tabela 3** – Efeito de diferentes inibidores sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela combinação de bradicinina (BK; 0,3 nmol/pata, 5 minutos antes) e hipotonicidade (10 µL de água ultrapura, 18 mOsm). A hiperalgesia mecânica foi avaliada 15 minutos após a indução de hipotonicidade.

Tratamentos	Hiperlgesia mecânica induzida pela hipotonicidade (g)		
	Salina + Veículo	BK + Veículo	BK + Tratamento
Indometacina (5 mg/kg, v.o.)	0.62 ± 0,05	0.13 ± 0,05*	0.18 ± 0,05*
Guanetidina (30 mg/kg, s.c.)	0.76 ± 0,13	0.15 ± 0.04*	0.21 ± 0.09*
PACOCF <sub>3</sub> (1 nmol/pata)	0.75 ± 0,05	0.24 ± 0.08*	0.21 ± 0.07*
KT-5720 (3 nmol/pata)	0.76 ± 0.13	0.22 ± 0.09*	0.27 ± 0.08*
U73122 (30 pmol/pata)	0.77 ± 0.06	0.24 ± 0.08*	0.65 ± 0.12 <sup>#</sup>
GF109203X (3 nmol/pata)	0.70 ± 0.06	0.20 ± 0,05*	0.48 ± 0.10 <sup>#</sup>
SB366791 (1 nmol/pata)	0.62 ± 0.08	0.19 ± 0.10*	0.26 ± 0.11*

\*P<0,05: significativamente diferente do grupo “Salina + Veículo”.

<sup>#</sup>P<0,05: significativamente diferente do grupo “BK + Veículo”.

ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. N.S.: Não significativo.

## 8 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DAS ENZIMAS FOSFOLIPASE C (PLC) E PROTEÍNA QUINASE C (PKC) NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA COMBINAÇÃO DE BRADICININA E HIPOTONICIDADE

Os receptores cininérgicos podem ser acoplados a proteína  $G\alpha_q$  e, conseqüentemente, têm a enzima PLC como segundo mensageiro (para revisão ver: LEEB-LUNDBERG et al., 2005). No presente modelo verificamos que o efeito sensibilizador da BK (0,3 nmol/pata) sobre as respostas nociceptivas causadas pela hipotonicidade (10  $\mu$ L de água ultrapura) foi significativamente prevenido pelo co-tratamento com o inibidor de PLC, U73122 (30 pmol/pata) (Tabelas 2 e 3), indicando que a ativação desta enzima tem um papel importante sobre estes efeitos. É importante mencionar que o tratamento com U73122 (30 pmol/pata) não alterou os comportamentos de nocicepção ou o limiar mecânico de camundongos controle (dados não demonstrados).

A ativação de diferentes isoformas da enzima PKC é um dos eventos desencadeados pela ativação de PLC e conseqüente formação de diacilglicerol (DAG), a qual está envolvida na sensibilização de canais TRPV1 pela BK (CHUANG et al., 2001; FERREIRA et al., 2004). Os resultados deste bloco de experimentos sugerem que esta interação também ocorre no presente modelo, uma vez que o tratamento com GF109203X (3 nmol/pata), um inibidor não seletivo de PKCs, inibiu significativamente os efeitos nociceptivos e hiperalgésicos causados pela combinação de BK (0,3 nmol/pata) e hipotonicidade (10  $\mu$ L de água ultrapura) (Tabelas 2 e 3). O tratamento com GF109203X (3 nmol/pata) não alterou os comportamentos de nocicepção ou o limiar mecânico de camundongos controle (dados não demonstrados).

## 9 - AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO CANAL TRPV1 NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA COMBINAÇÃO DE BRADICININA E HIPOTONICIDADE

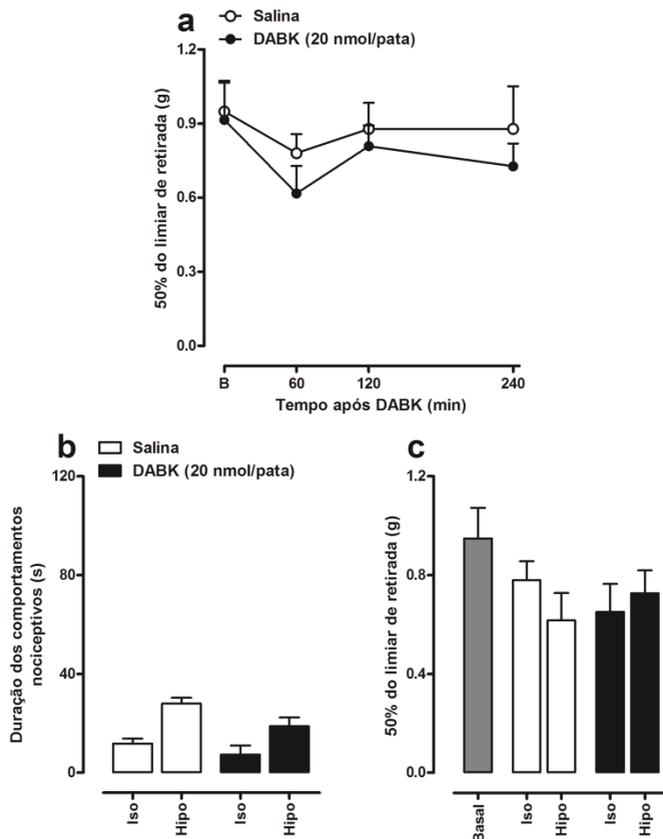
O efeito sensibilizador da BK sobre canais TRPA1 parece ser mediado, em parte, pela ativação do canal TRPV1 (BAUTISTA et al., 2006). Portanto, nos perguntamos se as respostas nociceptivas induzidas pela combinação de BK e hipotonicidade também seriam dependentes do TRPV1. Porém, a sensibilização à hipotonicidade induzida pela BK (0,3 nmol/pata) parece não ser mediada pela ativação do canal TRPV1, uma vez que o tratamento com o antagonista seletivo para este canal, SB366791 (1 nmol/pata), não alterou a nocicepção declarada (Tabela 3) ou hiperalgesia mecânica (Tabela 4) induzidas pela hipotonicidade (10  $\mu$ L de água ultrapura) em animais pré-injetados com BK. É importante mencionar que o tratamento com SB366791 (1 nmol/pata) não alterou os comportamentos de nocicepção ou o limiar mecânico de camundongos controle (dados não demonstrados), e que as doses empregadas foram eficazes em experimentos controle.

## 10 - EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DO AGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR $B_1$ SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE CAMUNDONGOS

Com o intuito de estudar a possível interação entre  $B_1R$  e o canal TRPV4, inicialmente, foi avaliado se a administração i.pl. de DABK (20 nmol/pata), agonista seletivo para o  $B_1R$ , seria capaz de induzir hiperalgesia mecânica em camundongos. Os dados representados na figura 17 (a) demonstram que o peptídeo DABK não alterou o limiar mecânico basal quando administrado na pata de camundongos. Do mesmo modo, este agonista não causou comportamentos indicativos de nocicepção (Figura 7).

## 11 - AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO SENSIBILIZADOR DO AGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR B<sub>1</sub> SOBRE AS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELO HIPOTONICIDADE

Neste experimento avaliou-se o possível efeito sensibilizador da DABK sobre as respostas nociceptivas induzidas pela hipotonicidade na pata de camundongos. Os resultados deste experimento demonstram que o pré-tratamento com DABK (20 nmol/pata) não alterou as respostas nocivas induzidas pela hipotonicidade (Figura 17 b, c). Portanto, estes resultados, somados aos resultados do experimento anterior, sugerem que a injeção periférica de DABK não é um modelo adequado para avaliar a possível interação entre receptor B<sub>1</sub> e o canal TRPV4.



**Figura 17** – A injeção periférica do agonista seletivo para o receptor  $B_1$  não altera o limiar mecânico ou os efeitos nocivos induzidos pela hipotonicidade em camundongos. (a) Efeito da injeção i.pl. do agonista seletivo para o receptor  $B_1$  DABK (20 nmol/pata) sobre o limiar mecânico de camundongos. (b) Nocicepção declarada e (c) limiar mecânico de animais injetados com DABK (20 nmol/pata, 5 minutos antes) e solução hipotônica (Hipo; 10  $\mu$ L de água ultrapura, 18 mOsm). Animais controle receberam solução isotônica (Iso; salina, 300 mOsm). Cada grupo representa a média de 6-8 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). (a) ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. (b, c) ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. B: limiar basal.

## 12 - EFEITO DO TRATAMENTO COM O ANTAGONISTA SELETIVO PARA O TRPV4 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE DABK

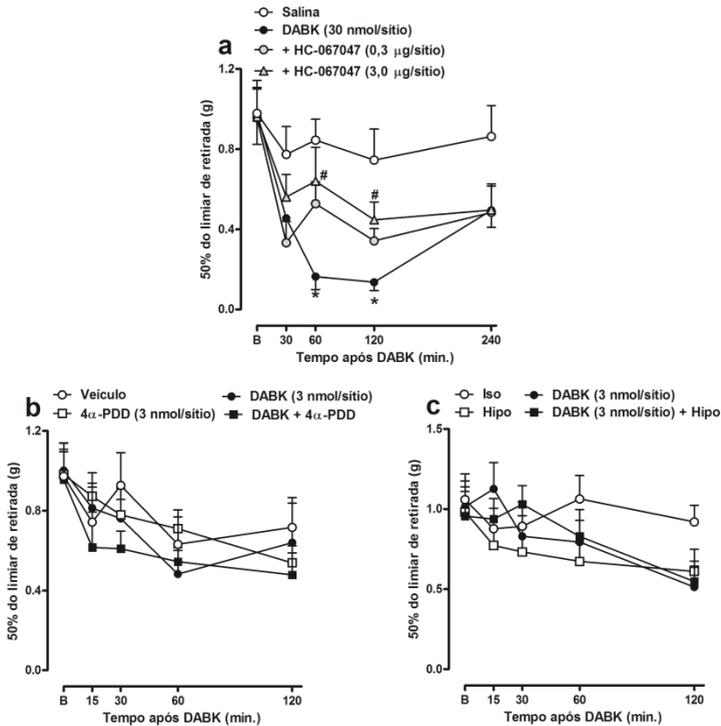
Levando-se em conta os resultados obtidos nos dois experimentos anteriores e sabendo-se que a injeção i.t. de DABK causa hiperalgesia térmica e mecânica em camundongos (FERREIRA et al., 2002a; FOX et al., 2003), o possível envolvimento do canal TRPV4 no efeito nocivo induzido pela ativação do B<sub>1</sub>R foi avaliado no modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.t. do peptídeo DABK. A figura 18 (a) ilustra o efeito inibitório do co-tratamento com HC-067047 (0,3 ou 3 µg/sítio, i.t.) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo peptídeo DABK (30 nmol/sítio, i.t.), indicando que a hiperalgesia causada pela ativação do B<sub>1</sub>R na medula espinhal é dependente da ativação deste canal.

## 13 - AVALIAÇÃO DA CO-INJEÇÃO INTRATECAL DO PEPTÍDEO DABK E AGONISTA SELETIVO DO CANAL TRPV4 SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE CAMUNDONGOS

A injeção i.t. de 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/sítio) ou DABK (3 nmol/sítio) não causou alteração significativa do limiar mecânico de camundongos, quando comparada a injeção dos veículos (Figura 18 b). Do mesmo modo, a co-injeção de 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/sítio) e DABK (3 nmol/sítio) não foi capaz de produzir hiperalgesia mecânica nos animais (Figura 18b). É importante mencionar que a injeção de uma maior dose de 4 $\alpha$ -PDD (10 nmol/sítio, i.t.) diminui significativamente o limiar mecânico de camundongos a partir de 2 h de sua administração, mantendo-se por até 4 h (dados não demonstrados), demonstrando a funcionalidade do canal TRPV4 na medula espinhal.

#### 14 - AVALIAÇÃO DA CO-INJEÇÃO INTRATECAL DO PEPTÍDEO DABK E SOLUÇÃO HIPOTÔNICA SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE CAMUNDONGOS

A injeção i.t. de solução hipotônica (5  $\mu$ L de água ultrapura/sítio) ou DABK (3 nmol/sítio) não causou alteração significativa no limiar mecânico de camundongos, quando comparada a injeção de salina (Figura 17 c). Resultados semelhantes foram observados para a co-injeção de solução hipotônica e DABK (Figura 18 c). Portanto, o resultado deste experimento, somado ao resultado do experimento anterior, sugere que não há somação ou sinergismo entre os ativadores do TRPV4 e o agonista do B<sub>1</sub>R em causar hiperalgesia mecânica quando injetados na medula espinhal.



**Figura 18** – O canal TRPV4 medeia a hiperálgia mecânica induzida pelo agonista seletivo do receptor  $B_1$ . (a) Efeito do co-tratamento com o antagonista seletivo para o canal TRPV4, HC-067047 (0,3 e 3  $\mu\text{g}/\text{sítio}$ , i.t.), sobre a hiperálgia mecânica induzida pelo agonista seletivo do receptor  $B_1$  DABK (30 nmol/sítio, i.t.) em camundongos. (b, c) Efeito da co-injeção entre DABK (3 nmol/site, i.t.) e (b) 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/sítio, i.t.) ou (c) solução hipotônica (5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura/sítio, i.t.). Cada grupo representa a média de 6-8 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo injetado com salina. # $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo injetado com DABK. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal.

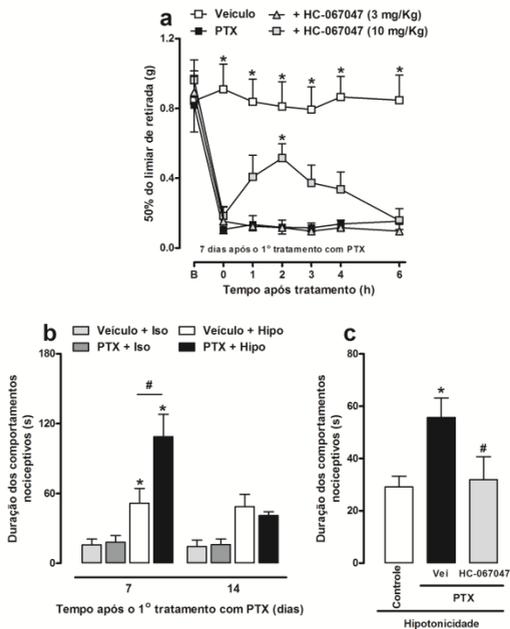
## 15 - EFEITO DO TRATAMENTO COM O ANTAGONISTA SELETIVO PARA O CANAL TRPV4 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

Previamente foi demonstrado que a deleção ou diminuição da expressão do canal TRPV4 inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX em roedores (ALESSANDRI-HABER et al., 2004). Com o intuito de confirmar o envolvimento do TRPV4 no modelo de neuropatia induzida pelo PTX, avaliamos o efeito do HC-067047 (3 ou 10 mg/Kg, i.p.) sobre a hiperalgesia mecânica 7 dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico. O tratamento com HC-067047 foi eficaz em inibir a hiperalgesia mecânica quando administrado na dose 10 mg/Kg (Figura 19 a). O efeito máximo para o antagonista foi observado após 2 h do tratamento. Este resultado sustenta a ideia da importância do TRPV4 para o presente modelo.

## 16 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE SOLUÇÃO HIPOTÔNICA EM ANIMAIS TRATADOS COM PACLITAXEL

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com PTX aumenta a sensibilidade de roedores à hipotonicidade, a qual causa comportamentos indicativos de nocicepção, mediados pela ativação do canal TRPV4 (ALESSANDRI-HABER et al., 2004). Os resultados deste estudo confirmam estes dados, uma vez que a injeção de solução hipotônica (10  $\mu$ L de água ultrapura/pata) em animais tratados com PTX causou nocicepção declarada, a qual foi significativamente maior que aquela observada em animais controle (Figura 19 b). A resposta aumenta à hipotonicidade se manifestou apenas no 7º dia após o primeiro tratamento com PTX, retornando a valores semelhantes aos controles no 14º dia (Figura 19 b). A resposta aumenta à hipotonicidade em animais neuropáticos parece ser dependente da ativação do canal TRPV4, uma vez que o pré-tratamento com HC-067047 (3  $\mu$ g/pata),

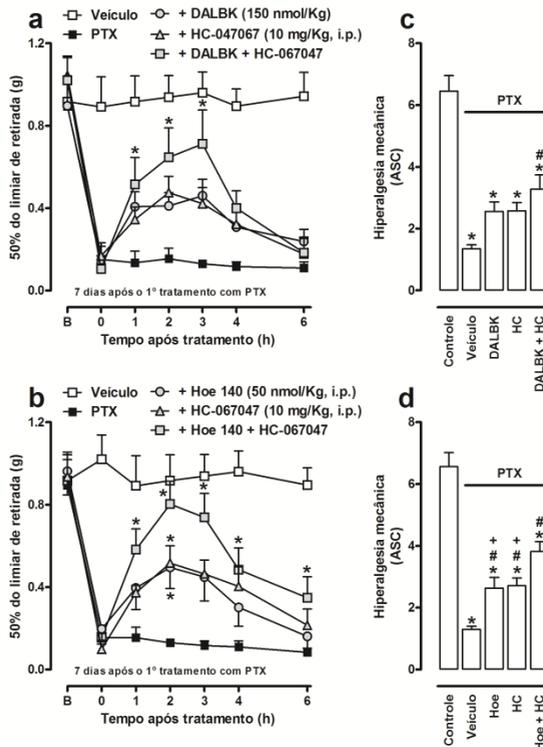
administrado 5 minutos antes da solução hipotônica, reduziu os comportamentos indicativos de nocicepção em animais tratados com PTX (Figura 19 c).



**Figura 19** – Envolvimento do canal TRPV4 na neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel (PTX). (a) Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o TRPV4, HC-067047 (3 ou 10 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre a hiperálgia mecânica induzida pelo PTX em camundongos. (b) Efeito da injeção i.pl. de solução hipotônica (10  $\mu$ L de água ultrapura, 18 mOsm) sobre a nocicepção declarada em animais tratados com PTX. (c) Efeito do tratamento com HC-067047 (3  $\mu$ g/pata, 30 minutos antes) sobre a nocicepção declarada induzida pela hipotonicidade (10  $\mu$ L de água ultrapura/pata, 300 mOsm) em animais neuropáticos. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). (a) \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo tratado com PTX. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal. (b) \* $P < 0,05$ : significativamente diferente dos grupos injetados com solução isotônica (Iso, 10  $\mu$ L de salina/pata). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls. (c) \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo controle. # $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo tratado com PTX ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

## 17 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ANTAGONISTAS CININÉRGICOS E DO CANAL TRPV4 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

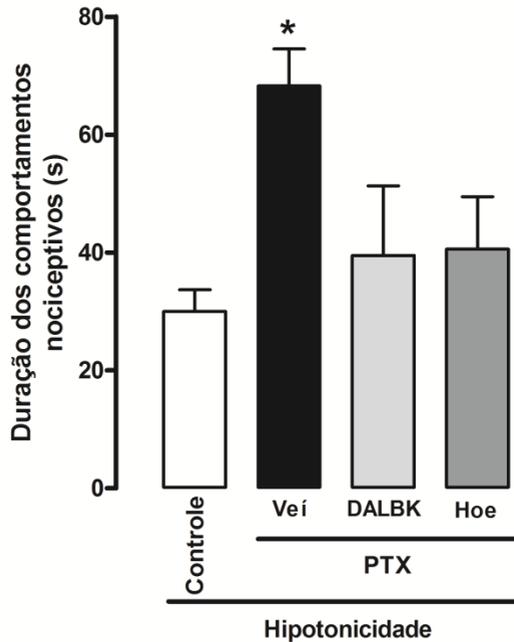
A fim de avaliar uma possível interação entre os receptores cininérgicos e canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX, avaliamos o efeito das combinações entre DALBK (150 nmol/Kg, i.p.) ou Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.) com o HC-067047 (10 mg/Kg, i.p.). Os tratamentos individuais com os antagonistas cininérgicos apresentaram eficácia e perfil de respostas semelhantes ao tratamento com o HC-067047 (Figura 20 a, b). Entretanto, o tratamento combinado entre os antagonistas cininérgicos e o HC-067047, foi mais eficaz em inibir a hiperalgesia mecânica do que o tratamento individual com cada droga (Figura 19 a-d). Este efeito foi mais pronunciado para a combinação entre Hoe 140 e HC-067047 (Figura 20 c, d). Estes resultados sugerem que o envolvimento das cininas na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX não depende apenas da ativação do canal TRPV4.



**Figura 20** – Combinação entre antagonistas cinérgicos e antagonista do TRPV4 sobre a hiperalgesia induzida pelo PTX. (a) Efeito do tratamento combinado entre o antagonista seletivo para o  $B_1R$  DALBK (150 nmol/Kg, i.p., 1 h antes) e o antagonista seletivo para o TRPV4 (10 mg/Kg, i.p., 1 h antes). (b) Efeito do tratamento combinado entre o antagonista seletivo para o  $B_2R$  Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p., 1 h antes) e o antagonista seletivo para o TRPV4 (10 mg/Kg, i.p., 1 h antes). (c) Área sob a curva (ASC) do gráfico “a”. (d) ASC do gráfico “b”. Cada grupo representa a média de 6-8 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). (a, b) \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo tratado com PTX. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal. (c, d) \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo controle. # $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo veículo. † $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo Hoe + HC. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

## 18 - EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS CININÉRGICOS SOBRE A NOCICEPÇÃO DECLARADA INDUZIDA POR HIPOTONICIDADE EM ANIMAIS TRATADOS COM PACLITAXEL

A fim de avaliar se os receptores cininérgicos contribuem para a sensibilidade aumentada à hipotonicidade em animais tratados com PTX, avaliamos o efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre esta resposta. Para tal, utilizamos os tratamentos com DALBK (150 nmol/Kg, i.p.) ou com Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.), os quais foram administrados 2 vezes ao dia durante a fase de indução da neuropatia e por até 2 h antes dos experimentos. Na figura 21 pode-se observar que os tratamentos com DALBK ou Hoe 140, foram eficazes em reduzir a sensibilidade à hipotonicidade, com inibição de  $75 \pm 30\%$  e  $72 \pm 23\%$ , respectivamente. Estes resultados sugerem que a liberação de cininas durante a fase de indução da neuropatia é importante para a sensibilização à hipotonicidade pelo PTX.

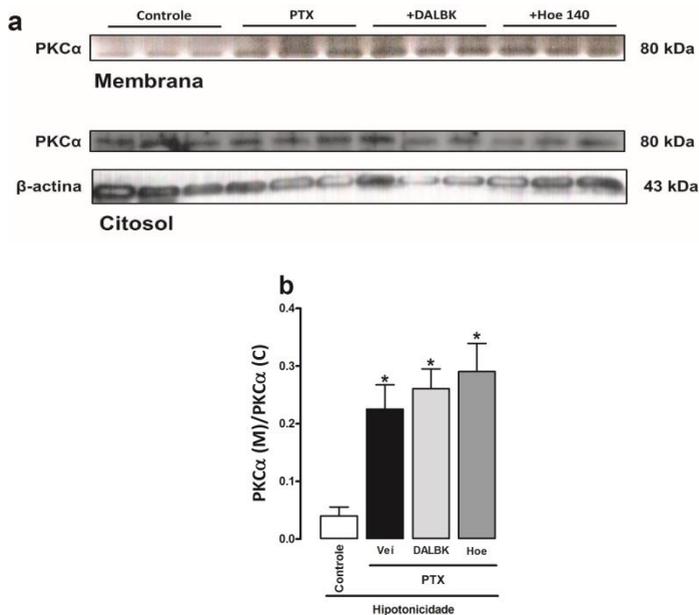


**Figura 21** – Os receptores cininérgicos contribuem para a sensibilização à hipotonicidade induzida pelo PTX. Efeito do pré-tratamento com DALBK (150 nmol/Kg, i.p.) ou Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.). Os animais foram tratados diariamente, 2 vezes por dia, até 2 h antes da injeção de hipotonicidade. Os experimentos foram realizados 7 dias após o primeiro tratamento com PTX. Cada grupo representa a média de 8-10 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \* $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

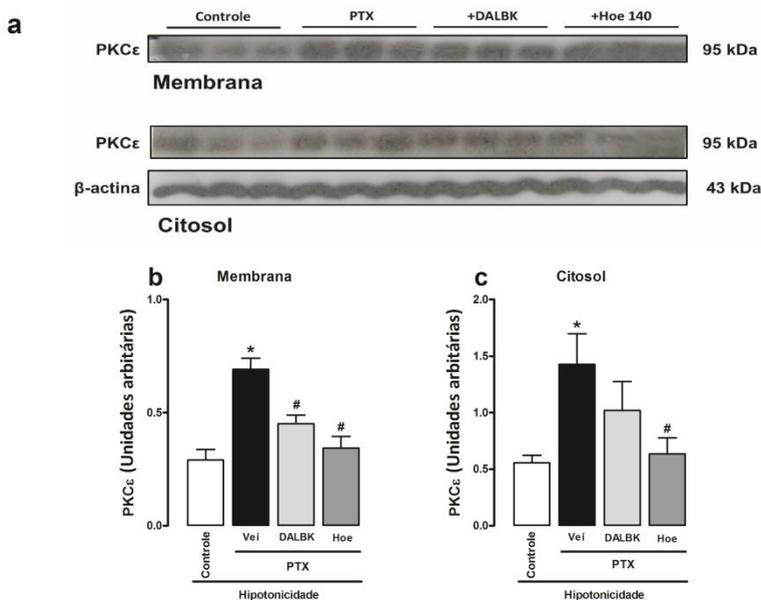
## 19 - EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS CININÉRGICOS SOBRE OS NÍVEIS DAS ENZIMAS PKC $\alpha$ E PKC $\epsilon$ APÓS O TRATAMENTO COM PACLITAXEL

A translocação de PKCs para a membrana plasmática é um evento desencadeado pela ativação de receptores cininérgicos, o qual parece contribuir para a sensibilização do canal TRPV4 pela BK (Tabelas 2 e 3). Ainda, estudos prévios demonstraram o envolvimento da PKC $\epsilon$  na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX em ratos (DINA et al., 2001). Portanto, nos perguntamos se os receptores cininérgicos modulariam a expressão e/ou ativação de PKCs no presente modelo. Como indicado na figura 22, o tratamento com PTX resultou no aumento da detecção da proteína PKC $\alpha$  em extratos de membrana de amostras obtidas da pele da pata de camundongos, indicando a ativação desta enzima. Contudo, o tratamento dos animais com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> das cininas, respectivamente, DALBK e Hoe 140, não foi eficaz sobre este evento (Figura 22 a, b).

Do mesmo modo, foi verificado aumento dos níveis de PKC $\epsilon$  em extratos de membrana da pele da pata. Ainda, foram detectados níveis citosólicos aumentados de PKC $\epsilon$ , sugerindo também aumento de sua expressão (Figura 23 a, b). O tratamento dos animais com ambos os antagonistas cininérgicos, inibiu significativamente o aumento nos níveis de membrana de PKC $\epsilon$  (Figura 23 a, b). Além disso, o tratamento com Hoe 140 inibiu também os níveis citosólicos da enzima (Figura 23 a, b). Assim, pode-se propor que a modulação da atividade e/ou expressão da enzima PKC $\epsilon$  é um dos mecanismos envolvidos no efeito pró-nociceptivo das cininas, atuando através dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, no modelo de neuropatia induzida pelo PTX, e que este mecanismo poderia ser responsável pela sensibilização do canal TRPV4 e, conseqüentemente, pela responsividade aumentada à hipotonicidade, neste modelo. Portanto, nas próximas sessões deste trabalho serão apresentados resultados de experimentos realizados para dar maior base a esta hipótese.



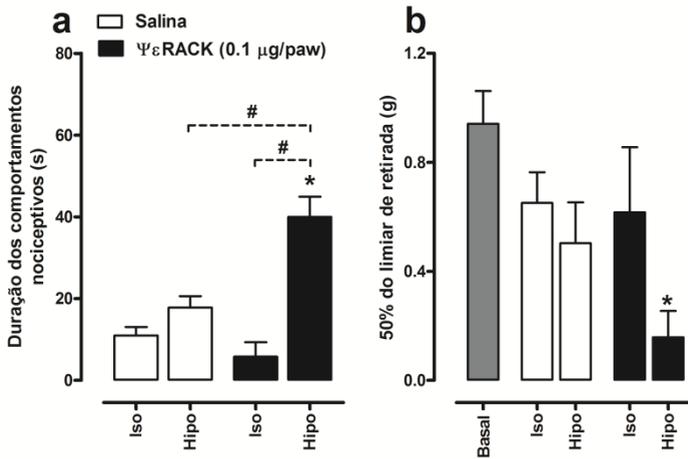
**Figura 22** – O pré-tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores cinérgicos não alterou a translocação de PKC $\alpha$  do citosol para a membrana em amostras da pele da pata de camundongos. Os animais foram tratados com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub>, respectivamente, DALBK (100 nmol/Kg, i.p.) e Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.), durante 6 dias (2 vezes por dia) e por até 2 h antes da coleta dos tecidos. Os tecidos foram coletados 7 dias após o 1º tratamento com PTX. (a) Imagens ilustrativas das bandas obtidas por *western blot* para a proteína PKC $\alpha$  (80 kDa) em extratos de membrana (painel superior) e citosol (painel inferior), e para o controle interno  $\beta$ -actina (43kDa) no citosol (painel inferior). (b) Medida da densidade óptica da imunoreatividade para PKC $\alpha$ . O gráfico representa a razão entre valores de PKC $\alpha$  nos extratos de membrana e citosol. Cada grupo representa a média de 5-6 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.



**Figura 23** – O pré-tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores cininérgicos inibe a ativação e expressão de PKC $\epsilon$  na pele da pata de camundongos tratados com PTX. Os animais foram tratados com os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub>, respectivamente, DALBK (100 nmol/Kg, i.p.) e Hoe 140 (50 nmol/Kg, i.p.), durante 6 dias (2 vezes por dia) e por até 2 h antes da coleta dos tecidos. Os tecidos foram coletados 7 dias após o 1<sup>o</sup> tratamento com PTX. (a) Imagens ilustrativas das bandas obtidas por *western blot* para a proteína PKC $\epsilon$  (95 kDa) em extratos de membrana (painel superior) e citosol (painel inferior), e para o controle interno  $\beta$ -actina (43kDa) no citosol (painel inferior). (b) Medida da densidade óptica da imunoreatividade para PKC $\epsilon$ . O gráfico representa a razão entre valores de PKC $\epsilon$  nos extratos de membrana e citosol. Cada grupo representa a média de 8-10 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo controle. #P<0,05: significativamente diferente do grupo PTX + veículo. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

## 20 - AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO SENSIBILIZADOR DO PEPTÍDEO $\psi\epsilon$ RACK SOBRE AS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA HIPOTONICIDADE

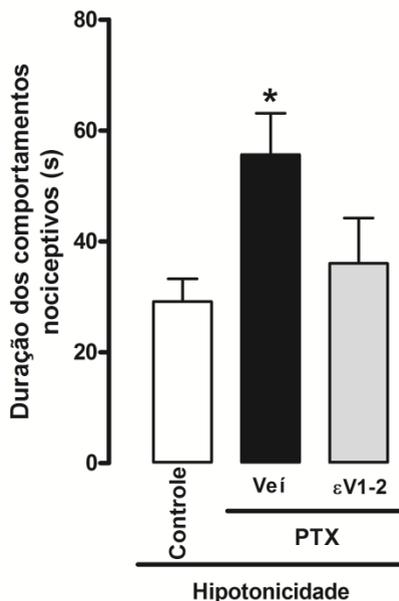
Com o intuito de comprovar a hipótese do envolvimento da enzima PKC $\epsilon$  na sensibilização do canal TRPV4 pela BK, avaliou-se inicialmente o possível efeito sensibilizador do peptídeo  $\psi\epsilon$ RACK sobre as respostas nociceptivas induzidas pela hipotonicidade em animais naïve. Corroborando os dados obtidos com a BK, a injeção prévia do peptídeo  $\psi\epsilon$ RACK (0,1  $\mu$ g/pata) potencializou os comportamentos de nocicepção declarada causados pela hipotonicidade em camundongos (Figura 24 a). Além disso, a combinação destes dois estímulos foi capaz de induzir hiperalgisia mecânica (Figura 24 b). Animais pré-tratados com  $\psi\epsilon$ RACK (0,1  $\mu$ g/pata) não apresentaram comportamentos de nocicepção ou alteração do limiar mecânico após a injeção de solução isotônica.



**Figura 24** – O ativador seletivo da PKC $\epsilon$  sensibiliza camundongos à hipotonicidade. (a) Nociceção declarada e (b) hiperalgesia mecânica causadas pela combinação do peptídeo  $\psi\epsilon$ RACK, ativador seletivo da PKC $\epsilon$ , e hipotonicidade (Hipo; 10  $\mu$ L de água ultrapura/pata). Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM). \*P<0,05: significativamente diferente do grupo injetado com salina + isotonicidade (Iso). #P<0,05: significativamente diferente dos grupos indicados pela linha pontilhada. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

## 21 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ENZIMA PKC $\epsilon$ NA NOCICEPÇÃO DECLARADA INDUZIDA POR HIPOTONICIDADE EM ANIMAIS TRATADOS COM PACLITAXEL

A ativação dos receptores para as cininas parece mediar a sensibilidade aumentada à hipotonicidade em animais tratados com PTX (Figura 21), bem como o aumento da atividade e da expressão (B<sub>2</sub>R) da enzima PKC $\epsilon$ . Portanto, com o objetivo de avaliar se a ativação da PKC $\epsilon$  contribui de fato para a sensibilidade aumentada à hipotonicidade, avaliou-se o efeito do tratamento com um inibidor seletivo para esta enzima sobre esta resposta. Para isto, foi utilizado o tratamento com o peptídeo  $\epsilon$ V1-2 (9  $\mu$ g/pata), o qual foi administrado 1 vez ao dia durante a fase de indução da neuropatia e por até 2 h antes dos experimentos. Como representado na figura 25, o tratamento repetido com o peptídeo  $\epsilon$ V1-2 reduziu a sensibilidade à hipotonicidade em animais neuropáticos, com inibição de  $74 \pm 31$  %. Estes resultados reforçam as evidências anteriores sobre a participação da enzima PKC $\epsilon$  na sensibilização à hipotonicidade em animais neuropáticos, de modo semelhante ao envolvimento dos receptores cininérgicos.



**Figura 25** - A ativação da enzima PKC $\epsilon$  sensibiliza camundongos aos efeitos nocivos da hipotonicidade no modelo de neuropatia induzida pelo paclitaxel (PTX). Efeito do pré-tratamento com o inibidor seletivo de PKC $\epsilon$ , peptídeo  $\epsilon$ V1-2 (IPKC $\epsilon$ ; 9  $\mu$ g/pata) sobre a nocicepção declarada induzida por solução hipotônica (20  $\mu$ l de água ultrapura/pata). Os animais foram tratados durante 6 dias ( 2 vezes ao dia) até 2 h antes da injeção de hipotonicidade. Os experimentos foram realizados 7 dias após o primeiro tratamento com PTX. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e a barra de erro indica o erro padrão da média (EPM).  $P < 0,05$ : significativamente diferente do grupo tratado com PTX. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls.

## 5 – DISCUSSÃO

A neurotoxicidade periférica induzida pela quimioterapia é uma das principais causas de dor neuropática em humanos (WOLF et al., 2008). Apesar dos esforços nas últimas décadas, atualmente não há terapia eficaz para pacientes com dor persistente (BURGESS; WILLIAMS, 2010; WOOLF, 2010). Portanto, o entendimento dos mecanismos envolvidos nestas síndromes é crítico para permitir a descoberta de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de analgésicos mais eficazes clinicamente. Neste contexto, é importante mencionar que o papel das cininas nas respostas nociceptivas em animais é bem estabelecido, e a eficácia de antagonistas cininérgicos em modelos experimentais de dor neuropática, causados por lesão ou diabetes, sugere o potencial uso destas moléculas no tratamento da dor crônica em humanos (PETERSEN et al., 1998; LEVY; ZOCHODNE, 2000; GABRA; SIROIS, 2002; 2003; RASHID et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; LAI et al., 2006; PETCU et al., 2008; QUINTÃO et al., 2008). Os dados do presente trabalho estendem os dados da literatura, apontando o potencial uso de antagonistas cininérgicos no tratamento sintomático da dor crônica induzida pela quimioterapia com PTX. Tal hipótese se baseia nos seguintes achados: i) a deleção gênica dos receptores cininérgicos inibiu a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pelo PTX; ii) o tratamento com antagonistas cininérgicos, embora não tenha prevenido o desenvolvimento da neuropatia induzida pelo PTX, foi eficaz em inibir a hiperalgesia instalada quando administrado sistemicamente ou centralmente; iii) o tratamento com PTX aumentou significativamente os níveis do B<sub>1</sub>R no tálamo de camundongos; e vi) o mecanismo periférico pelo qual os antagonistas cininérgicos atuam no presente modelo parece envolver a modulação da atividade do canal TRPV4 através da inibição da ativação da enzima PKC $\epsilon$ .

O uso de animais nocautes para os receptores cininérgicos tem propiciado um melhor entendimento do papel desempenhado pelas cininas na dor neuropática e inflamatória, suportando a noção de que os receptores cininérgicos poderiam ser novos alvos moleculares para o desenvolvimento de analgésicos (FERREIRA

et al., 2002; 2005; LAI et al., 2006; QUINTÃO et al., 2008). Corroborando estes dados, no presente estudo verificou-se que a deleção gênica dos receptores  $B_1$  ou  $B_2$ , ou a deleção dupla de ambos os receptores (animais duplo-nocautes), inibiu a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pelo tratamento com o quimioterápico PTX, sugerindo o envolvimento destes receptores no presente modelo. Portanto, a neuropatia periférica induzida pelo PTX em camundongos parece ser um modelo útil para avaliar a eficácia antinociceptiva e/ou antihiperalgésica de antagonistas cininérgicos. Outra observação feita a partir dos experimentos com animais nocautes é que parece haver uma contribuição equivalente de ambos os receptores cininérgicos  $B_1$  e  $B_2$  durante todo o período de avaliação da hiperalgesia induzida pelo PTX, de modo que a deleção de ambos os receptores foi mais eficaz do que a deleção simples do  $B_1R$  ou  $B_2R$  (especialmente na hiperalgesia térmica). Entretanto, tem sido proposto que a ativação do  $B_2R$  é normalmente responsável por mediar os efeitos das cininas nas fases agudas da inflamação e dor, enquanto que o  $B_1R$  medeia normalmente suas ações em estágios mais tardios. Esta proposição é sustentada pelo fato de que o  $B_2R$ , ao contrário do  $B_1R$ , é passível de sofrer taquifilaxia (MARCEAU; REGOLI, 2004). Porém, os resultados apresentados no presente estudo estão de acordo com alguns trabalhos recentes demonstrando igual contribuição de ambos os receptores para as respostas hipernociceptivas associadas a modelos de dor neuropática em roedores (LAI et al., 2006; WERNER et al., 2007; PETCU et al., 2008).

Após a caracterização a respeito da importância dos receptores cininérgicos para hiperalgesia induzida pelo PTX, o próximo passo deste estudo foi avaliar a eficácia de antagonistas seletivos sobre o desenvolvimento e a manutenção das respostas hiperalgésicas. Estes experimentos demonstraram que os receptores cininérgicos parecem não estar implicados no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica ou térmica, uma vez que animais tratados preventivamente com DALBK ou Hoe 140 tiveram suas respostas hiperalgésicas reestabelecidas após apenas 2 dias do último tratamento com estes antagonistas. Apesar da

sua ineficácia sobre a gênese das respostas hiperalgésicas, ambos os antagonistas cininérgicos apresentaram efeito anti-nociceptivo sobre a hiperalgisia instalada, quando administrados como tratamento único ou repetido (2 vezes ao dia, por 2 dias). Estes dados conflitam com alguns resultados prévios, obtidos no modelo de avulsão do plexo braquial, demonstrando que o B<sub>1</sub>R é importante para a indução da hiperalgisia mecânica (QUINTÃO et al., 2008). De fato, Quintão e colaboradores (2008) haviam demonstrado que um único tratamento local com R-515 (antagonista do B<sub>1</sub>R), realizado imediatamente após a lesão, foi eficaz em prevenir a hiperalgisia mecânica induzida pela avulsão do plexo braquial. Esta discrepância entre os resultados pode refletir possíveis diferenças nos mecanismos patofisiológicos envolvidos nos modelos de neuropatia induzidos por lesão ou por quimioterapia. Porém, é importante ressaltar que os resultados apresentados aqui estão de acordo com diferentes estudos demonstrando a eficácia de antagonistas cininérgicos sobre a manutenção da hiperalgisia crônica (FERREIRA et al., 2002; 2005; WERNER et al., 2007; PETCU et al., 2008).

No presente estudo foi demonstrado ainda que os tratamentos sistêmicos com gabapentina ou com morfina foram mais eficazes sobre a hiperalgisia mecânica e térmica, respectivamente, do que o tratamento sistêmico com os antagonistas cininérgicos. Estes fármacos são altamente eficazes contra a dor crônica de diferentes origens, e são empregados clinicamente para o alívio da NPIQ (KELEY; DE-ANGELIS, 2009). No entanto, é prematuro especular que antagonistas cininérgicos seriam menos eficazes clinicamente em comparação a estes fármacos. Deve-se considerar a natureza peptídica dos antagonistas cininérgicos empregados aqui, a qual favorece sua degradação rápida e, conseqüentemente, redução das respectivas eficácias antihiperalgésicas. É possível sugerir que doses maiores dos antagonistas do B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R pudessem alcançar eficácia semelhante à gabapentina ou morfina, ou, ainda, que antagonistas não-peptídicos poderiam ser mais eficazes no presente modelo.

Após a constatação acerca da eficácia do tratamento sistêmico com os antagonistas cininérgicos sobre a manutenção

das respostas hiperalgésicas, avaliou-se, a seguir, o efeito periférico ou central (medula espinhal e cérebro) do tratamento com estas drogas sobre a hiperalgesia mecânica. A sensibilidade ao estímulo térmico não foi avaliada, uma vez que o desenvolvimento da hiperalgesia térmica não foi reproduzido em todos os experimentos conduzidos em camundongos da linhagem CD1, apesar da boa reprodutibilidade da hiperalgesia mecânica (indução em ~90% dos animais). De fato, o desenvolvimento da hiperalgesia térmica pelo tratamento com PTX é um achado variável entre os estudos, de modo que tem sido reportado hiperalgesia térmica, hipotalgesia térmica ou ausência de alteração do limiar térmico (CAVALETTI et al., 1995; CAMPANA et al., 1998; CLIFFER et al., 1998). Portanto, para evitar o uso desnecessário de animais, em virtude da repetição de experimentos, decidiu-se não avaliar a sensibilidade ao estímulo térmico na continuidade deste estudo.

Com o intuito de verificar a possível participação dos receptores cininérgicos expressos periféricamente na manutenção da hiperalgesia induzida pelo PTX, os antagonistas para estes receptores foram administrados pela via i.pl. Entretanto, o tratamento i.pl. com DALBK ou Hoe 140 não foi eficaz em reverter a hiperalgesia mecânica, sugerindo assim que os receptores expressos no tecido plantar parecem não ser importantes para a manutenção desta resposta. Corroborando estes resultados, verificou-se também que o tratamento com o quimioterápico não foi capaz de alterar os comportamentos de nocicepção declarada induzidos pelos agonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> (DABK e BK, respectivamente), sugerindo que parece não ocorrer aumento da funcionalidade dos receptores cininérgicos periféricos neste modelo. De fato, os dados obtidos com os experimentos de PCR demonstraram não haver alteração significativa da expressão de ambos os receptores cininérgicos no tecido plantar, apesar do B<sub>1</sub>R ser normalmente induzido em condições patológicas (CALIXTO et al., 2004). Estes achados contrastam com resultados prévios que demonstraram aumento da funcionalidade e da expressão do B<sub>1</sub>R (RNAm e proteína) em tecidos periféricos após a lesão de nervos (PETERSEN et al.,

1998; RASHID et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; WERNER et al., 2007). Portanto, pode-se propor que diferenças nos mecanismos patofisiológicos envolvidos nos modelos de neuropatia induzidos por lesão ou por quimioterapia expliquem a divergência entre os resultados.

Após verificar que os receptores cininérgicos periféricos parecem não contribuir para a neuropatia induzida pelo PTX, avaliou-se o efeito do tratamento i.t. ou i.c.v. com antagonistas seletivos para estes receptores sobre a hiperalgesia mecânica, a fim de avaliar o possível envolvimento de vias centrais nas ações das cininas no presente modelo. De modo relevante, o tratamento i.t. com os antagonistas cininérgicos reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica, sugerindo que os receptores cininérgicos expressos na medula espinhal medeiam esta resposta. De fato, estudos prévios reportaram a funcionalidade de ambos os receptores  $B_1$  e  $B_2$  na medula espinhal (CHAPMAN; DICKENSON, 1992; CORRÊA; CALIXTO, 1993; PESQUERO et al., 2000; FERREIRA et al., 2002; FOX et al., 2003). É importante destacar que a injeção i.t. dos agonistas seletivos para o  $B_1R$  ou  $B_2R$  (DABK e Tyr8-BK, respectivamente) causou hiperalgesia mecânica e térmica em camundongos (FERREIRA et al., 2002a; FOX et al., 2003). Além disso, o tratamento i.t. com antagonistas cininérgicos foi eficaz contra a nocicepção declarada induzida pela formalina e comportamento de coçar causado por agonistas do receptor PAR-2 (CORRÊA; CALIXTO, 1993; COSTA et al., 2010). Ademais, estudos recentes demonstraram que o tratamento i.t. com antagonistas para o  $B_1R$  (R-7157 ou SSR240612) inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos, bem como a hiperalgesia térmica causada pela estreptozotocina em ratos (QUINTÃO et al., 2008; TALBOT et al., 2010).

Coletivamente, estes resultados sugerem a importância dos receptores cininérgicos expressos na medula espinhal para a manutenção da hiperalgesia crônica. No entanto, os mecanismos pelos quais os receptores  $B_1$  e  $B_2$  medeiam estas respostas não são ainda bem conhecidos. Foi previamente sugerida a expressão de ambos os receptores na terminação central do aferente

primário na medula espinhal (COUTURE et al., 2001). Portanto, a ativação dos receptores cininérgicos localizados nesta estrutura poderia modular a atividade do aferente primário e contribuir para a hiperalgesia mecânica. Além disso, um estudo conduzido no modelo de ligação do nervo espinhal sugeriu que a liberação de dinorfina A na medula espinhal parece contribuir para a dor crônica através de sua ação direta sobre receptores cininérgicos espinhais (LAI et al., 2006). Estes autores também verificaram aumento da expressão do RNAm para a pró-dinorfina na medula espinhal (LAI et al., 2006). Ainda, é importante destacar que animais nocautes para o B<sub>1</sub>R apresentaram hipoalgesia em modelos de nocicepção química, a qual foi provavelmente relacionada a uma redução na facilitação dependente de atividade dos reflexos espinhais (fenômeno “*Wind up*”) (PESQUERO et al., 2000). De acordo com estes dados da literatura, pode-se propor que no presente modelo o tratamento com PTX aumentaria a produção de cininas ou dinorfina A na medula espinhal, as quais sensibilizariam o aferente primário por atuarem em receptores cininérgicos expressos na terminação central. Além disso, o antagonismo do receptor B<sub>1</sub>R poderia controlar o fenômeno de sensibilização central comumente associado à dor crônica. No entanto, estas hipóteses devem ser aventadas com cautela, uma vez que foi previamente sugerido que drogas injetadas pela via i.t. podem atingir o GRD (GENDRON et al., 2006) e, portanto, a possível participação de receptores cininérgicos expressos no corpo celular dos aferentes primários deve ser levada em consideração.

Uma série de estudos experimentais tem sugerido que a ativação de células gliais na medula espinhal facilita a transmissão do estímulo doloroso e contribuindo para a indução e a manutenção da dor crônica (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Neste contexto é importante mencionar que tem sido reportada a expressão de ambos os receptores cininérgicos em células microgliais e astrócitos de roedores (HOSLI et al., 1992; GIMPL et al., 1992; NODA et al., 2003). Além disso, a ativação destes receptores nas células gliais tem sido associada com aumento na concentração de cálcio intracelular, migração microglial, aumento

da expressão de enzimas pró-inflamatórias (COX-2, óxido nítrico sintase induzida, metaloproteinase-9 e PLA<sub>2</sub>) e liberação de mediadores pró-inflamatórios (PGE<sub>2</sub>, interleucina-6 e óxido nítrico) (GIMPL et al., 1992; HOSLI et al., 1992; SCHWANINGER et al., 1999; NODA et al., 2003; 2004; 2007a; 2007b; HSIEH et al., 2004; 2006; 2007; COLASANTI et al., 2005; IFUKU et al., 2007). Inicialmente, poderia ser proposto que os receptores cininérgicos modulam a atividade e/ou migração de células gliais na medula espinhal e, conseqüentemente, contribuem para a manutenção da hiperalgisia induzida pelo PTX. Esta hipótese constituiu a base inicial para o projeto desta tese e foi avaliada experimentalmente neste estudo. Porém, o presente modelo parece não depender da ativação de células gliais, uma vez que não se observou imunoreatividade aumentada para GFAP ou Iba-1 (marcadores de ativação/migração de astrócitos e microglias, respectivamente) na medula espinhal de animais tratados com PTX (dados não demonstrados). Além disso, o inibidor da ativação de microglias, minociclina (30 mg/Kg, i.p., administrado durante a fase de indução da neuropatia), não foi eficaz sobre a hiperalgisia mecânica (dados não demonstrados). De fato, a participação de células gliais em modelos de neuropatia induzida pelo PTX é controversa (ZHENG et al., 2011; ZHANG et al., 2012), e carece de estudos aprofundados.

Apesar das evidências acerca da importância de ambos os receptores cininérgicos espinhais para a hiperalgisia instalada, o papel do B<sub>1</sub>R neste quadro parece envolver não somente a medula espinhal, mas também, sítios supraespinhais. No presente estudo, o tratamento i.c.v. com o peptídeo DALBK (antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R) foi eficaz em inibir a hiperalgisia mecânica quando administrado em estágios tardios da neuropatia, ou seja, 14 dias após o primeiro tratamento com PTX. O papel do B<sub>1</sub>R expresso em estruturas supraespinhais na modulação da dor não é conhecido, e tem sido pouco abordado experimentalmente (NODA et al., 2011). No entanto, sabe-se que ambos os receptores cininérgicos são expressos em diferentes estruturas cerebrais, algumas das quais envolvidas na transmissão

nociceptiva. A expressão do B<sub>1</sub>R foi reportada em neurônios do tálamo e hipotálamo (RAIDOO; BHOOLA, 1997 apud NODA et al., 2011, p. 87), e o transcrito para esta proteína foi encontrado em regiões corticais (temporal, parietal e pré-frontal), hipocampo e tálamo (CAMPOS et al., 2005; QUINTÃO et al., 2008). Alguns estudos têm sugerido o envolvimento do B<sub>1</sub>R expresso no cérebro em modelos experimentais da doença de Alzheimer, epilepsia, diabetes e esclerose múltipla (ARGANARAZ et al., 2004; CAMPOS et al., 2005; PREDIGER et al., 2008; DUTRA et al., 2011). Ainda, Quintão e colaboradores (2008) abordaram o possível envolvimento do B<sub>1</sub>R cerebral na manutenção da hiperalgesia induzida pela avulsão do plexo braquial através do tratamento i.c.v. com antagonistas seletivos para este receptor (R-715 ou SSR240612). Estes autores verificaram que o tratamento i.c.v. com estas drogas foi eficaz contra a hiperalgesia mecânica instalada, quando aplicado em estágios tardios da neuropatia, e que tal efeito pareceu estar relacionado com o aumento de expressão do B<sub>1</sub>R em diferentes áreas cerebrais (QUINTÃO et al., 2008).

Tem sido descrita a presença constitutiva do B<sub>1</sub>R no sistema sensorial de roedores e macacos (LEVY; ZOCHODNE, 2000; MA; HEAVENS, 2000; WOTHERSPONN; WINTER, 2000; YAMAGUCHI-SASE et al., 2003). Adicionalmente, após a lesão de nervos (pela ligação parcial do nervo ciático ou pela avulsão do plexo braquial) foi observado aumento da expressão do B<sub>1</sub>R e de seu RNAm no tecido plantar (pele), GRD, medula espinhal, hipotálamo, hipocampo, tálamo e córtex de camundongos, em diferentes períodos de tempo após a lesão (RASHID et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; QUINTÃO et al., 2008). No presente trabalho, não foi observada alteração significativa no padrão de expressão do RNAm para o B<sub>1</sub>R no tecido plantar, GRD, medula espinhal e córtex parietal de camundongos tratados com PTX. Portanto, estes resultados sugerem que o efeito do tratamento i.t. com o peptídeo DALBK provavelmente foi mediado por receptores B<sub>1</sub> constitutivos na medula espinhal. Por outro lado, verificou-se aumento do RNAm para o B<sub>1</sub>R no córtex pré-frontal, embora não tenha sido

observada diferença estatística, bem como aumento significativo deste transcrito no tálamo de camundongos a partir de 7 dias após o primeiro tratamento com PTX. O pico de expressão do RNAm do B<sub>1</sub>R em 7 dias provavelmente precede o pico da expressão proteica, o que explicaria o efeito do tratamento i.c.v. com o peptídeo DALBK ser observado somente no 14º dia após o primeiro tratamento com PTX. Corroborando esta hipótese, observou-se aumento da imunomarcagem para o B<sub>1</sub>R no tálamo de camundongos tratados com PTX 14 dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico. O tálamo é uma estrutura importante, responsável pela distribuição da informação nociceptiva, oriunda das vias ascendentes, para diferentes áreas do córtex cerebral, onde a dor é processada e interpretada (GRAIG; DOSTROVSKY, 1999). Curiosamente, também foi observado diminuição da expressão do RNAm para o B<sub>1</sub>R no hipotálamo a partir de 7 dias após o primeiro tratamento com PTX. No entanto, não é clara a importância deste evento para o efeito pró-nociceptivo da ativação do B<sub>1</sub>R no presente modelo. Sabe-se que, além de controlar processos metabólicos e atividades autônomas, o hipotálamo é uma estrutura que apresenta núcleos envolvidos com o controle descendente da dor (FIELDS; BASBAUM, 1999). Portanto, estudos adicionais são necessários para investigar se a queda de expressão do RNAm para o B<sub>1</sub>R nesta estrutura apresenta ou não relevância para a neuropatia crônica.

O B<sub>2</sub>R é normalmente constitutivo em muitos tecidos, incluindo estruturas envolvidas na transmissão da dor (nociceptores, GRD, medula espinhal, tálamo, córtex cerebral e hipotálamo), e sua participação em alguns modelos de dor crônica tem sido associada com alterações em seu padrão de expressão (LEVY; ZOCHODNE, 2000; RASHID et al., 2004; LAI et al., 2006; WERNER et al., 2007; PECTU et al., 2008). No presente estudo não foi observado alterações significativas na expressão do RNAm para o B<sub>2</sub>R no tecido plantar, medula espinhal, hipotálamo, tálamo e córtex pré-frontal de animais tratados com PTX. No entanto, animais tratados com o quimioterápico apresentaram aumento significativo de expressão do transcrito

para o B<sub>2</sub>R no GRD quando avaliado 14 dias após o primeiro tratamento com PTX. Porém, é provável que este aumento na expressão do RNAm não refletiu em aumento na funcionalidade do B<sub>2</sub>R, uma vez que os tratamentos i.pl. ou i.t. com Hoe 140 no 14º dia não apresentaram diferença de eficácia em comparação aos tratamentos em 7 dias. Portanto, pode-se sugerir que a neuropatia induzida pelo PTX seja mediada por receptores B<sub>2</sub> constitutivos, presentes em diferentes estruturas periféricas e centrais.

Coletivamente, os resultados apresentados até aqui sugerem o envolvimento central dos receptores cininérgicos na neuropatia induzida pelo PTX (tanto em nível espinal quanto supra-espinal). Porém, é sabido que a barreira hematoencefálica (BHE) é permeável somente a pequenos peptídeos (BEGLEY; BRIGHTMAN, 2003). Portanto, uma questão intrigante que pode ser levantada neste estudo é: como o tratamento sistêmico com os antagonistas peptídicos para os receptores cininérgicos inibem as respostas hiperalgésicas induzidas pelo PTX? Inicialmente, pode-se inferir que o tratamento com PTX altera a integridade da BHE, permitindo a passagem dos antagonistas para estruturas centrais. Corroborando esta ideia, foi previamente reportado que em modelos de dor neuropática ocorrem alterações na permeabilidade da BHE espinal e cerebral (GORDH et al., 2006; BEGGS et al., 2010). No entanto, os experimentos para avaliar a permeabilidade ao corante azul de Evans na medula espinal e no cérebro sugeriram que a integridade da BHE estava preservada em animais tratados com PTX. Outra explicação plausível para o efeito sistêmico (mas não i.pl.) dos antagonistas cininérgicos é que estas drogas poderiam agir periféricamente, mas não nos nociceptores plantares e sim em outros sítios, tal como o GRD. De fato, interações entre neurônios e mediadores derivados de células satélites e/ou leucócitos no GRD podem contribuir para a dor neuropática em roedores (HU; MCLACHLAN, 2002; CAPUANO et al., 2009).

A principal novidade da primeira etapa deste estudo foram os achados de que as cininas, agindo sobre os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, desempenham papel importante na manutenção da hiperalgésia

induzida pelo tratamento com o PTX em camundongos. Os efeitos nociceptivos das cininas parecem depender da ativação de receptores expressos na medula espinhal ( $B_1R$  e  $B_2R$ ), cérebro ( $B_1R$ , provavelmente o super-expresso no tálamo) e, possivelmente, receptores expressos no GRD ( $B_1R$  e  $B_2R$ ). Estes resultados suportam a noção de que estes receptores podem se tornar alvos para o desenvolvimento de novos analgésicos mais eficazes clinicamente. Visando fornecer maior base a esta hipótese, na segunda etapa deste trabalho procurou-se elucidar o possível mecanismo responsável pelo efeito anti-nociceptivo dos antagonistas cininérgicos. Portanto, a possível interação entre receptores cininérgicos e o canal TRPV4 foi avaliada.

A BK é um potente algógeno endógeno que atua diretamente sobre nociceptores, promovendo tanto sua excitação quanto sua sensibilização. Estudos conduzidos no final na década de 90 demonstraram a expressão do RNAm para o  $B_2R$  no GRD de roedores, bem como a presença de sítios de ligação para a BK em cultura de neurônios desta estrutura (SEABROOK et al., 1997; SEGOND VON BANCHET et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a BK causa despolarização de neurônios provenientes do GRD, via ativação do  $B_2R$  (KASAI et al., 1998), bem como sensibilização ao calor e à estímulo mecânico *in vitro* (KUMAZAWA et al., 1991; CESARE; MCNAUGHTON; 1996; KODA; MIZUMURA, 2002). Corroborando estes dados, a aplicação i.pl. de BK em roedores causou comportamentos indicativos de nocicepção e hiperalgesia térmica e mecânica, os quais foram bloqueados pelo antagonismo do  $B_2R$  (MENDES et al., 1998; CHUANG et al., 2001; FERREIRA et al., 2004). A ação da BK sobre o limiar térmico parece depender da sensibilização do canal TRPV1 por mecanismos que envolvem a ativação da enzima PKC $\epsilon$ , a desinibição do canal pela quebra do PIP $_2$ , e a síntese de produtos da 12-lipoxigenase (KUMAZAWA et al., 1991; CESARE et al., 1999; CHUANG et al., 2001; SHIN et al., 2002). Ainda, a hiperalgesia térmica induzida pela BK parece depender também do canal TRPA1 (BAUTISTA et al., 2006). De fato, a BK pode sensibilizar o canal TRPA1 através do aumento na concentração de Ca $^{++}$  intracelular, seja pela

mobilização de estoques intracelulares ou pela abertura do canal TRPV1, ou via ativação da enzima PKA (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; WANG et al., 2008)

Apesar dos avanços ocorridos no entendimento dos mecanismos envolvidos na sensibilização ao calor, a sensibilização à estímulo mecânico pela BK ainda não é bem compreendida (MIZUMURA et al., 2009). Tem sido sugerido que o canal TRPV4, o qual pode ser ativado por turgescência celular induzida por hipotonicidade (LIEDTKE et al., 2000), entre outros ativadores, seja um dos transdutores de estímulos mecânicos no tecido cutâneo (TSUNOZAKI; BAUTISTA, 2009). Portanto, a ativação desta proteína poderia estar envolvida na sensibilização aos estímulos mecânicos induzida pela BK. De fato, um estudo recente sugeriu que BK sensibiliza o canal TRPV4 em células HEK293 transfectadas com o gene para este canal (FAN et al., 2009). No presente estudo, foi demonstrado que o canal TRPV4 parece mediar a hiperalgesia mecânica induzida pela BK, uma vez que o tratamento com o antagonista seletivo para este canal (HC-067047) preveniu esta resposta. No entanto, a excitação do aferente primário pela BK parece não ser dependente da ativação do TRPV4, tendo em vista que o tratamento com o HC-067047 não foi eficaz em inibir a nocicepção declarada induzida pelo algógeno. Outro achado importante do presente estudo, o qual reforça a ideia da interação entre o B<sub>2</sub>R e TRPV4, é o fato da BK causar sensibilização aos ativadores deste canal, uma vez que a injeção i.pl. de BK, seguida pelo agonista 4 $\alpha$ -PDD ou pela hipotonicidade, causou hiperalgesia mecânica em camundongos. Demonstramos também que a pré-injeção i.pl. de BK potencializou a nocicepção declarada induzida pela hipotonicidade. É importante mencionar que estes efeitos foram inibidos pelo tratamento com antagonistas seletivos para o B<sub>2</sub>R ou para o canal TRPV4, fornecendo, portanto, evidências adicionais sobre o envolvimento destes receptores nestas respostas.

Um estudo interessante conduzido por Cunha e colaboradores (2007) sugeriu que a BK induz hiperalgesia mecânica através da liberação de prostanóides e aminas

simpatomiméticas. Além disso, os receptores cininérgicos podem se acoplar à proteína  $G\alpha_i$  e ativar a enzima  $PLA_2$ , resultando na produção de prostanóides (YANAGA et al., 1991 apud MIZUMURA et al., 2009). Porém, nossos resultados sugerem que estes mediadores não estejam envolvidos na sensibilização do TRPV4 pela BK, uma vez que os tratamentos com indometacina (inibidor não seletivo das enzimas COX 1 e 2) ou com guanetidina (inibidor da liberação de catecolaminas) não foram eficazes sobre a nocicepção declarada ou a hiperalgesia mecânica induzidas pela combinação de BK e hipotonicidade. Do mesmo modo, o tratamento com o inibidor seletivo da  $PLA_2$  (PACOCF<sub>3</sub>) não foi eficaz sobre estas respostas. Portanto, pode-se sugerir que o efeito sensibilizador da BK no presente modelo seja mediado diretamente por este alógeno, e não dependa da liberação de prostanóides ou aminas simpatomiméticas.

Embora os receptores cininérgicos possam, por vezes, interagir com as proteínas  $G\alpha_i$  e  $G\alpha_s$ , eles são geralmente acoplados à proteína  $G\alpha_q$ , que promove ativação da enzima  $PLC\beta$  e, conseqüentemente, à produção de inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  induz a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático e o DAG estimula diferentes isoformas de PKC ( $\alpha$ ,  $\epsilon$  ou  $\zeta$ ), as quais fosforilam proteínas importantes para as funções celulares, incluindo o efeito nociceptivo. Por exemplo, a ativação da enzima PKC  $\epsilon$  esta envolvida na sensibilização de nociceptores ao calor pela BK, modulando a atividade do canal TRPV1 (CESARE et al., 1999; CHUANG et al., 2001; MIZUMURA et al., 2009). Além disso, conforme já mencionado a BK pode sensibilizar o canal TRPA1 através da ativação da enzima PKA (WANG et al., 2008), e este fenômeno pode ter implicações na sensibilização a estímulos térmicos ou mecânico (MIZUMURA et al., 2009). No presente estudo, verificou-se que a sensibilização à hipotonicidade induzida pela BK parece envolver a ativação das enzimas PLC e PKC, mas não a enzima PKA, uma vez que os inibidores seletivos para PLC (U73122) e PKC (GF109203X), mas não para PKA (KT-5720), foram eficazes sobre as respostas nociceptivas induzidas pela combinação de BK e hipotonicidade. Este mecanismo é

semelhante ao mecanismo envolvido na sensibilização do TRPV1 pela BK. No entanto, é importante mencionar que estas respostas não são dependentes da ativação do canal TRPV1, já que o tratamento com SB366791 (antagonista seletivo para o TRPV1) não foi eficaz em inibir a nocicepção declarada ou a hiperalgisia mecânica induzidas pela combinação de BK e hipotonicidade. Este último resultado também exclui a possibilidade de que o aumento na concentração de cálcio intracelular, pela abertura do TRPV1, possa interferir na ativação do TRPV4 pela BK, assim como já demonstrado para a BK com o TRPA1 (WANG et al., 2008).

Na etapa seguinte deste trabalho procurou-se avaliar a possível interação entre o B<sub>1</sub>R e o canal TRPV4 na indução de hiperalgisia mecânica. Com essa finalidade, utilizou-se o modelo de hiperalgisia mecânica induzida pela injeção i.t. do peptídeo DABK, agonista seletivo do B<sub>1</sub>R, uma vez que sua injeção periférica não alterou o limiar mecânico ou os efeitos nocivos induzidos pela hipotonicidade em camundongos. De fato, estudos prévios sugerem que este receptor não é funcional periféricamente na ausência de estímulos prévios (TONUSSI; FERREIRA. 1997; CAMPOS et al., 1998; FERNANDES et al., 2003; FERREIRA et al., 2008). No entanto, a injeção i.t. de DABK foi eficaz em causar hiperalgisia mecânica e térmica em animais naïve, indicando a funcionalidade deste receptor na medula espinhal (FERREIRA et al., 2002a; FOX et al., 2003). Os resultados do presente estudo demonstraram que a hiperalgisia mecânica induzida pelo peptídeo DABK depende da ativação do canal TRPV4, como indicado pelo efeito inibitório do co-tratamento i.t. com DABK e HC-067047. No entanto, a co-injeção de DABK (dose sub-efetiva) e ativadores do TRPV4 não foi eficaz em causar hiperalgisia mecânica em camundongos, ao contrário do que foi observado para a combinação entre BK e ativadores do TRPV4. Embora não se tenham resultados suficientes para explicar tal disparidade, pode-se propor que o TRPV4 seja modulado por altas doses de DABK (a partir de 30 nmol/sítio), enquanto que doses mais baixas (como 3 nmol/sítio) não interferem com a ativação deste canal.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os efeitos nocivos de agonistas cininérgicos em animais são dependentes, pelo menos em parte, da ativação do canal TRPV4. Assim sendo, procurou-se investigar o possível efeito modulador exercido pelas cininas sobre a atividade do canal TRPV4 no modelo de neuropatia induzida pelo PTX. Estudos prévios demonstraram que o aumento da atividade do canal TRPV4, evidenciado pela responsividade aumentada à hipotonicidade, contribui para a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida pelo tratamento com PTX em roedores (ALESSANDRI-HABER et al., 2004; 2008). Os resultados apresentados no presente estudo confirmam e estendem estes dados da literatura, pois demonstram a eficácia do antagonista seletivo para o TRPV4 (HC-067047) em inibir a hiperalgesia mecânica induzida pelo quimioterápico, bem como a resposta nociceptiva aumentada de animais tratados com PTX frente à injeção i.pl. de solução hipotônica.

Em seguida, com o objetivo de avaliar uma possível interação entre receptores cininérgicos e o canal TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX, avaliou-se o efeito das combinações entre DALBK ou Hoe 140 com o HC-067047 neste modelo. Os tratamentos individuais com os antagonistas cininérgicos apresentaram eficácia e perfil de respostas semelhantes ao tratamento com HC-067047 em inibir a hiperalgesia mecânica, sugerindo que estes compostos exerçam seus efeitos através de mecanismos semelhantes neste modelo. Assim, seria esperado que a combinação entre estas drogas apresentasse eficácia semelhante aos tratamentos isolados. Entretanto, os tratamentos combinados com os antagonistas cininérgicos e HC-067047 foram mais eficazes em inibir a hiperalgesia mecânica do que o tratamento individual com cada droga. Portanto, embora estes resultados não excluam a possível interação entre os receptores cininérgicos e TRPV4 para mediar a hiperalgesia mecânica, eles sugerem que este canal não seja modulado somente pela ativação de receptores cininérgicos no presente modelo. De fato, outros estímulos pró-inflamatórios, como PGE<sub>2</sub> e agonistas do PAR-2, também foram capazes de

modular a atividade deste canal (ALESSANDRI-HABER et al., 2003; GRANT et al., 2007).

Ainda com o intuito de se avaliar o possível efeito modulador das cininas sobre o canal TRPV4, testou-se o efeito do tratamento com DALBK ou Hoe 140 sobre a responsividade à hipotonicidade em animais tratados com PTX. Os resultados destes experimentos reforçam a noção de que as cininas exerçam de fato um papel importante no aumento de atividade do canal TRPV4 no modelo de neuropatia induzida pelo PTX, uma vez que o tratamento com os antagonistas cininérgicos foi eficaz em prevenir este fenômeno. No entanto, para dar maior base a esta hipótese, seria importante confirmar estes resultados através do uso de agonistas seletivos para este canal, como por exemplo, o GSK 1016790A, já que o éster de forbol  $4\alpha$ -PDD não causou nocicepção declarada em camundongos controle ou tratados com PTX, mesmo quando injetado em doses altas (10 nmol/pata) (dados não demonstrados).

Na última década, uma série de trabalhos demonstrou a importância da enzima PKC $\epsilon$  para diferentes modelos de dor crônica, incluindo as neuropatias induzidas por ingestão crônica de álcool, pela estreptozotocina (neuropatia diabética), e pelo tratamento com vincristina ou paclitaxel (DINA et al., 2000; 2001; JOSEPH et al., 2003a; 2003b). Dina e colaboradores (2000) demonstraram ainda que a ingestão crônica de álcool resulta em aumento da expressão da enzima PKC $\epsilon$  no GRD de ratos, e que o tratamento i.pl. com um inibidor seletivo desta enzima reverteu a hiperalgesia mecânica associada ao modelo (DINA et al., 2000). Estes mesmos autores demonstraram também a eficácia de um inibidor seletivo da PKC $\epsilon$  em inibir a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX em ratos (DINA et al., 2001). Levando-se em consideração que a translocação das enzimas PKC para a membrana plasmática (ativação) é um evento que ocorre pela ativação de receptores cininérgicos, o qual parece contribuir para a sensibilização do canal TRPV4 pela BK (Tabelas 2 e 3), avaliou-se também no presente trabalho o efeito do tratamento com antagonistas cininérgicos sobre a translocação das enzimas PKC $\alpha$  e PKC $\epsilon$  para a membrana, em extratos de pele

da pata obtidos de animais neuropáticos. Os resultados destes experimentos demonstraram que o tratamento com PTX aumentou significativamente os níveis de membrana de ambas as isoformas estudadas, bem como os níveis citosólicos da isoforma  $\epsilon$ . De forma importante, verificou-se que o tratamento com os antagonistas para as cininas inibiu significativamente o aumento da translocação da PKC $\epsilon$  (mas não PKC $\alpha$ ) para a membrana, indicando que os receptores cininérgicos parecem regular a atividade desta enzima neste modelo. Corroborando estes dados, recentemente foi demonstrado que a enzima PKC $\epsilon$  medeia o efeito pró-nociceptivo das cininas no modelo de dor muscular induzido pela formalina em camundongos (MEOTTI et al., 2012). É importante mencionar ainda que o tratamento com o antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R inibiu o aumento citosólico de PKC $\epsilon$ , sugerindo que este receptor module, além da ativação, a expressão da enzima neste modelo.

A importância da enzima PKC $\epsilon$  para a sensibilização de aferentes primários por diferentes estímulos tem sido reportada por vários autores (KHASAR et al., 1999; CESARE et al., 1999; ALEY et al., 2000; ZHANG et al., 2007; SRINIVASAN et al., 2008; SACHS et al., 2009). Este evento tem sido descrito como um importante mecanismo da sensibilização do TRPV1 por diferentes mediadores para causar hiperalgesia térmica (CESARE et al., 1999; CHUANG et al., 2001; BHAVE et al., 2003; NUMAZAKI et al., 2002). Recentemente, a ativação da PKC $\epsilon$  foi implicada na sensibilização do canal TRPV4 por uma sopa de agentes pró-inflamatórios (ALESSANDRI –HABER et al., 2006). Ainda, em um estudo recente, Chen e colaboradores (2011) sugeriram que a ativação da PKC $\epsilon$  modula a atividade do canal TRPV4 no modelo de neuropatia induzida pelo PTX, baseados na eficácia semelhante entre um antagonista do TRPV4 e um inibidor seletivo da PKC $\epsilon$  sobre este modelo. Os resultados do presente trabalho estendem estes dados, pois demonstraram que o ativador seletivo da PKC $\epsilon$  (peptídeo  $\psi\epsilon$ RACK) sensibiliza os camundongos às respostas nocivas induzidas pela hipotonicidade. Além disso, o tratamento com o inibidor seletivo desta enzima (peptídeo  $\epsilon$ V1-2) previne o desenvolvimento de

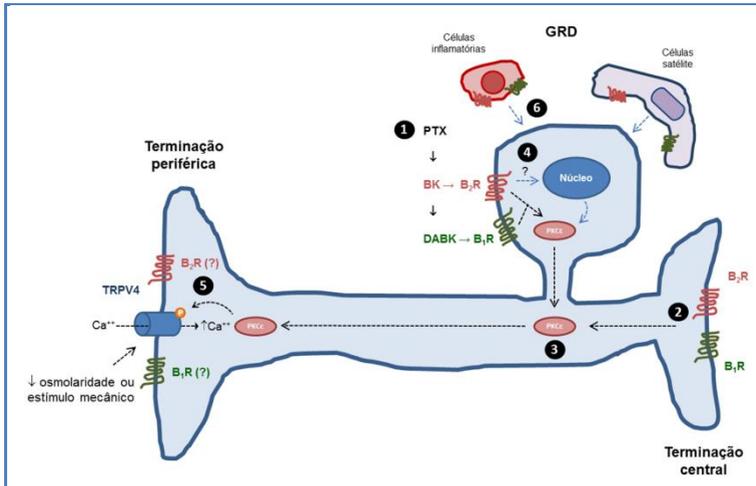
hiperalgesia à hipotonicidade em animais tratados com PTX. Em conjunto, estes resultados sugerem que os receptores cininérgicos modulam a atividade do canal TRPV4 no modelo de neuropatia induzida pelo PTX através da ativação (e/ou regulação da expressão) da enzima PKC $\epsilon$ .

Coletivamente, os experimentos comportamentais e moleculares apresentados neste estudo, indicam que a ativação dos receptores cininérgicos contribui para as respostas hiperalgésicas (aos estímulos térmico, mecânico, e hipotônico) associadas ao modelo de neuropatia periférica induzida pelo PTX em camundongos. Este modelo parece ser mediado por receptores cininérgicos expressos em estruturas centrais (espinhais e supraespinhais) e/ou periféricas (que não o nociceptor plantar). Os presentes resultados sugerem também um possível mecanismo periférico para os efeitos pró-nociceptivos das cininas no presente modelo (ver esquema da Figura 26), onde a ativação do canal TRPV4 via modulação da enzima PKC $\epsilon$ , parece ser um evento secundário à ativação dos receptores cininérgicos. Portanto, além dos receptores para as cininas, o canal TRPV4 poderia ser um alvo molecular com potencial para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes no tratamento da NPIQ.

Considerando que a terapia atual necessita de drogas mais efetivas e seguras para o tratamento da dor neuropática, os alvos investigados neste estudo podem representar valiosas estratégias farmacológicas para o tratamento sintomático da NPIQ. Recentemente, estudos clínicos demonstraram a segurança e a eficácia do antagonista seletivo do B<sub>2</sub>R icatibant (Hoe 140; Firazyr<sup>®</sup>) no tratamento agudo do angioedema hereditário (BORK et al., 2008; CICARDI et al., 2010), e este antagonista foi registrado em muitos países para esta finalidade (EMEA, 2011; FDA, 2011). No entanto, o emprego de antagonistas seletivos do B<sub>2</sub>R no tratamento da dor crônica pode ser limitado em virtude de possíveis efeitos adversos associados ao sistema cardiovascular. De fato, o tratamento crônico com Hoe 140 causou hipertensão em ratos (MADEDDU, et al., 1993; 1994); este efeito está relacionado à propriedade vasodilatadora da BK, a qual foi observada também em humanos (COCKCROFT et al., 1994).

Assim sendo, pode-se sugerir que antagonistas seletivos para o B<sub>1</sub>R seriam melhores opções para o controle da dor crônica, uma vez que este receptor é pouco expresso fisiologicamente e seu antagonismo estaria sujeito a menores efeitos adversos, quando comparado ao antagonismo do B<sub>2</sub>R. Na última década, foram desenvolvidos uma série de antagonistas não-peptídicos para o B<sub>1</sub>R, os quais apresentaram biodisponibilidade por via oral e poderiam se tornar opções para o tratamento de diferentes patologias, em especial a dor crônica (HUANG; PLAYER, 2010). Em conjunto, estas evidências motivaram as indústrias farmacêuticas a estudar o efeito do antagonista seletivo e não-peptídico para o B<sub>1</sub>R, MK-0686, contra a dor crônica em humanos. No entanto, apesar da eficácia em estudos pré-clínicos, o MK-0686 não foi eficaz em estudos controlados contra a dor causada pela osteoartrite, dor pós-operatória ou neuralgia pós-herpética (CLINICAL TRIALS, 2012).

Os dados do presente estudo estendem substancialmente a ideia de que antagonistas cininérgicos, especialmente para o B<sub>1</sub>R, possam ser utilizados para o tratamento da dor crônica em humanos. Além disso, estes resultados apontam o potencial uso destas drogas para o tratamento sintomático da NPIQ. Estes dados também sugerem que a terapia combinada entre os antagonistas para os receptores cininérgicos e do canal TRPV4 poderia ser uma alternativa mais eficaz para controlar estas condições. Portanto, estudos clínicos controlados são necessários para investigar a eficácia destes compostos sobre a dor causada pela quimioterapia e dar base aos resultados experimentais descritos no presente estudo.



**Figura 26** – Representação dos possíveis mecanismos envolvidos no papel dos receptores cininérgicos na neuropatia induzida pelo paclitaxel (PTX) em camundongos. (1) O tratamento com PTX promove a liberação de cininas (BK e DABK), as quais atuam sobre seus receptores (B<sub>2</sub>R e B<sub>2</sub>R, respectivamente) no gânglio da raiz dorsal e/ou (2) na terminação central do aferente primário. (3) Os receptores cininérgicos ativados promovem a ativação da enzima PKCε. (4) O B<sub>2</sub>R parece promover também o aumento de expressão da enzima. (5) Uma vez ativa, a PKCε promove fosforilação do canal TRPV4 na terminação periférica do aferente primário, tornando-o mais sensível a alterações na osmolaridade tecidual e aos estímulos mecânicos e, conseqüentemente, influenciando na manutenção da dor (nociceção para animais) e/ou hiperalgesia mecânica. (6) A contribuição de receptores cininérgicos expressos em outras células também deve ser considerada, como células inflamatórias (que migram para o GRD) ou células satélite. Embora a ativação periférica dos receptores cininérgicos não esteja envolvida na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX, estes receptores poderiam estar envolvidos na hiperalgesia à hipotonicidade.

## 6 – SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- Camundongos com deleção do gene para o B<sub>1</sub>R ou B<sub>2</sub>R das cininas, bem como animais com deleção de ambos os receptores, apresentaram redução das respostas hiperalgésicas induzidas pelo tratamento com PTX, sendo que a deleção de ambos os receptores foi mais eficaz do que a deleção individual dos mesmos. Estes resultados confirmam a hipótese da importância dos receptores cininérgicos no presente modelo;

- O tratamento com os antagonistas cininérgicos não foi eficaz sobre a gênese da neuropatia periférica induzida pelo PTX, embora estes antagonistas tenham apresentado eficácia em inibir as respostas hiperalgésicas instaladas. Portanto, os receptores cininérgicos parecem estar envolvidos somente na fase de manutenção da neuropatia periférica induzida pelo PTX;

- A administração de PTX não alterou a nocicepção declarada induzida pelos agonistas dos receptores cininérgicos, e o tratamento i.pl. com os antagonistas destes receptores não foi eficaz sobre a manutenção da hiperalgesia mecânica, sugerindo que receptores expressos no tecido plantar não estão envolvidos nesta resposta;

- O tratamento i.t. com os antagonistas cininérgicos inibiu a hiperalgesia mecânica instalada em ambos os períodos de tempo avaliados, indicando o envolvimento de receptores espinhais na neuropatia induzida pelo PTX. Ainda, o tratamento i.c.v. com o antagonista do B<sub>1</sub>R inibiu a resposta hiperalgésica somente quando administrado no 14º dia, sugerindo a importância deste receptor expresso no cérebro em fases tardias do modelo;

- O tratamento prolongado com PTX induziu aumento significativo da expressão do RNAm e da proteína para o B<sub>1</sub>R no tálamo de camundongos, respectivamente, 7 e 14 dias após o primeiro tratamento com o quimioterápico. Este efeito pode estar relacionando com a eficácia do antagonista para este receptor,

administrado por via i.c.v., em prevenir a hiperalgesia mecânica somente quando injetado no 14º dia;

- A permeabilidade da BHE da medula espinhal ou cérebro parece não ser alterada pelo tratamento com PTX. Portanto, é provável que os antagonistas cininérgicos administrados pela via i.p. estejam atuando periféricamente, em sítios que não o tecido plantar;

- O canal TRPV4 parece mediar a hiperalgesia mecânica induzida pelos agonistas cininérgicos e, ainda, a bradicinina sensibilizou os camundongos aos efeitos nocivos induzidos pelos ativadores do canal TRPV4. Contudo, não foi observado efeito potencializador sobre a indução de hiperalgesia mecânica para a co-injeção i.t. do agonista do B<sub>1</sub>R e ativadores do canal TRPV4;

- O mecanismo envolvido na sensibilização à hipotonicidade induzida pela BK parece depender da ativação das enzimas PLC e PKC, mas não da liberação de catecolaminas e prostaglandinas, da ativação das enzimas PLA<sub>2</sub> e PKA ou da sensibilização/ativação do canal TRPV1;

- A combinação entre os antagonistas seletivos para ambos os receptores das cininas e o antagonista do canal TRPV4 foi mais eficaz em inibir a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX do que o tratamento isolado com cada uma das drogas, sugerindo que o efeito anti-nociceptivo dos antagonistas cininérgicos sobre esta resposta envolva outros mecanismos além da possível inibição do canal TRPV4;

- A indução da hiperalgesia à hipotonicidade pelo PTX foi prevenida pelo tratamento com antagonistas de ambos os receptores cininérgicos, sugerindo que as cininas modulam a atividade do canal TRPV4 durante a fase de indução da neuropatia;

- A ativação dos receptores  $B_1$  e  $B_2$  para as cininas parece modular a atividade do canal TRPV4 no modelo de neuropatia induzida pelo PTX através da translocação e/ou aumento da expressão da enzima PKC $\epsilon$ ;
- Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo sustentam a ideia de que antagonistas cininérgicos possam ser utilizados para o tratamento da dor crônica em humanos, e estende esta hipótese ao tratamento sintomático da neuropatia periférica induzida pelo PTX. Portanto, estudos clínicos controlados são necessários para investigar a eficácia destes compostos sobre esta condição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSANDRI-HABER N., DINA O.A., JOSEPH E.K., REICHLING D.B., LEVINE J.D. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and Src tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. **J. Neurosci.** 28: 1046-57, 2008.
- ALESSANDRI-HABER N., DINA O.A., YEH J.J., PARADA C.A., REICHLING D.B., LEVINE J.D. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. **J. Neurosci.** 24: 4444-52, 2004.
- ALESSANDRI-HABER N., YEH J.J., BOYD A.E., PARADA C.A., CHEN X., REICHLING D.B., LEVINE J.D. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. **Neuron.** 39: 497-511, 2003.
- ALEY K.O., MESSING R.O., MOCHLY-ROSEN D., LEVINE J.D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **J. Neurosci.** 20: 4680-5, 2000.
- ALHENC-GELAS F., GIROLAMI J.P. Molecular and genetic aspects of the kallikrein-kinin system. In: BADER M. (Ed.). **Kinins.** Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2011. 369 p.
- ANDRADE EL, LUIZ AP, FERREIRA J, CALIXTO JB. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience.** 152: 511-20, 2008.
- ARGAÑARAZ GA, SILVA JA JR, PEROSA SR, PESSOA LG, CARVALHO FF, BASCANDS JL, BADER M, DA SILVA TRINDADE E, AMADO D, CAVALHEIRO EA, PESQUERO JB, DA GRAÇA NAFFAH-MAZZACORATTI M. The synthesis and distribution of the kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. **Brain Res.** 1006: 114-25, 2004.
- ARGYRIOU A.A., BRUNA J., MARMIROLI P., CAVALETTI G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 82:51-77, 2012.
- BADER M. Kinins: History and outlook. In: BADER M. (Ed.). **Kinins.** Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2011. 369 p.
- BANDELL M., STORY G.M., HWANG S.W., VISWANATH V., EID S.R., PETRUS M.J., EARLEY T.J., PATAPOUTIAN A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron.** 41: 849-57, 2004.
- BASBAUM A.I., BAUTISTA D.M., SCHERRER G., JULIUS D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** 139: 267-84, 2009.

- BAUTISTA D.M., JORDT S.E., NIKAI T., TSURUDA P.R., READ A.J., POBLETE J., YAMOAH E.N., BASBAUM A.I., JULIUS D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**. 124: 1269-82, 2006.
- BAUTISTA D.M., MOVAHED P., HINMAN A., AXELSSON H.E., STERNER O., HÖGESTÄTT E.D., JULIUS D., JORDT S.E., ZYGMUNT P.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 102: 12248-52, 2005.
- BEGGS S., LIU X.J., KWAN C., SALTER M.W. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. **Mol. Pain**. 6: 74, 2010.
- BEGLEY D.J., BRIGHTMAN M.W. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. **Prog. Drug Res**. 61:39-78, 2003.
- BHAVE G., HU H.J., GLAUNER K.S., ZHU W., WANG H., BRASIER D.J., OXFORD G.S., GEREAU R.W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**. 100: 12480-5, 2003.
- BORK K., YASOTHAN U., KIRKPATRICK P. Icatibant. **Nat. Rev. Drug Discov**. 7: 801-3, 2008.
- BORKOWSKI J.A., RANSOM R.W., SEABROOK G.R., TRUMBAUER M., CHEN H., HILL R.G., STRADER C.D., HESS J.F. Targeted disruption of a B<sub>2</sub> bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. **J. Biol. Chem**. 270: 13706-10, 1995.
- BOYCE S., RUPNIAK N.M., CARLSON E.J., WEBB J., BORKOWSKI J.A., HESS J.F., STRADER C.D., HILL R.G. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B<sub>2</sub> bradykinin receptor knockout mice. **Immunopharmacology**. 33: 333-5, 1996.
- BURGESS G., WILLIAMS D. The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. **J. Clin. Invest**. 120: 3753-9, 2010.
- CALIXTO J.B., CABRINI D.A., FERREIRA J., CAMPOS M.M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr. Opin. Anaesthesiol**. 87: 1-5, 2001.
- CALIXTO J.B., CABRINI D.A., FERREIRA J., CAMPOS M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. 87: 1-5, 2000.
- CALIXTO J.B., DUTRA R.C., BENTO A.F., MARCON R., CAMPOS M.M. Kallikrein-kinin system in pain. In: BADER M. (Ed.). **Kinins**. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2011. 369 p.

- CALIXTO J.B., MEDEIROS R., FERNANDES E.S., FERREIRA J., CABRINI D.A., CAMPOS M.M. Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br. J. Pharmacol.** 143: 803-18, 2004.
- CAMPANA W.M., ESKELAND N., CALCUTT N.A., MISASI R., MYERS R.R., O'BRIEN JS. Prosaptide prevents paclitaxel neurotoxicity. **Neurotoxicology.** 19: 237-44, 1998.
- CAMPOS M.M., LEAL P.C., YUNES R.A., CALIXTO J.B. Non-peptide antagonists for kinin B<sub>1</sub> receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. **Trends Pharmacol. Sci.** 27: 646-51, 2006.
- CAMPOS MM, ONGALI B, DE SOUZA BUCK H, SCHANSTRA JP, GIROLAMI JP, CHABOT JG, COUTURE R. Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. **Synapse.** 57: 29-37, 2005.
- CAMPOS MM, SOUZA GE, CALIXTO JB. Modulation of kinin B1 but not B2 receptors-mediated rat pawedema by IL-1beta and TNFalpha. **Peptides.** 19: 1269-76, 1998.
- CAPUANO A., DE CORATO A., LISI L., TRINGALI G., NAVARRA P., DELLO RUSSO C. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology. *Mol Pain* 5: 43, 2009.
- CARLSON K., OCEAN A.J. Peripheral neuropathy with microtubule-targeting agents: occurrence and management approach. **Clin.Breast.Cancer.** 11: 73-81, 2011.
- CATERINA M.J., SCHUMACHER M.A., TOMINAGA M., ROSEN T.A., LEVINE J.D., JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.** 389: 816-24, 1997.
- CAVALETTI G., TREDICI G., BRAGA M., TAZZARI S. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol. **Exp. Neurol.** 133: 64-72, 1995.
- CAYLA C., LABUZ D., MACHELSKA H., BADER M., SCHÄFER M., STEIN C. Impaired nociception and peripheral opioid antinociception in mice lacking both kinin B1 and B2 receptors. **Anesthesiology.** 116: 448-57, 2012.
- CAYLA C., TODIRAS M., ILIESCU R., SAUL V.V., GROSS V., PILZ B., CHAI G., MERINO V.F., PESQUERO J.B., BALTATU O.C., BADER M. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive

- and protected from endotoxin-induced hypotension. **FASEB J.** 21: 1689-98, 2007.
- CESARE P., DEKKER L.V., SARDINI A., PARKER P.J., MCNAUGHTON P.A. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron.** 23: 617-24, 1999.
- CESARE P., DEKKER L.V., SARDINI A., TOMINAGA M., ROSEN T.A., LEVINE J.D., JULIUS D. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron.** 23: 617-24, 1999.
- CESARE P., MCNAUGHTON P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 93: 15435-9, 1996.
- CESARE P., MCNAUGHTON P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 93: 15435-9, 1996.
- CHAPLAN S.R., BACH F.W., POGREL J.W., CHUNG J.M., YAKSH T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Methods.** 53: 55-63, 1994.
- CHAPMAN V., DICKENSON A.H. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 219: 427-33, 1992.
- CHEN C., YANG C., WANG J. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. **Neuroscience.** 193:440-51, 2011.
- CHUANG H.H., PRESCOTT E.D., KONG H., SHIELDS S., JORDT S.E. BASBAUM A.L., CHAO M.V., JULIUS D. Bradykinin and nerve grow factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. **Nature.** 411: 957-62, 2001.
- CICARDI M., BANERJI A., BRACHO F., MALBRÁN A., ROSENKRANZ B., RIEDL M., BORK K., LUMRY W., ABERER W., BIER H., BAS M., GREVE J., HOFFMANN T.K., FARKAS H., RESHEF A., RITCHIE B., YANG W., GRABBE J., KIVITY S., KREUZ W., LEVY R.J., LUGER T., OBTULOWICZ K., SCHMID-GRENDELMEIER P., BULL C., SITKAUSKIENE B., SMITH W.B., TOUBI E., WERNER S., ANNÉ S., BJÖRKANDER J., BOUILLET L., CILLARI E., HUREWITZ D., JACOBSON K.W., KATELARIS C.H., MAURER M., MERK H., BERNSTEIN J.A., FEIGHERY C., FLOCCARD B., GLEICH G., HÉBERT J.,

- KAATZ M., KEITH P., KIRKPATRICK C.H., LANGTON D., MARTIN L., PICHLER C., RESNICK D., WOMBOLT D., FERNÁNDEZ ROMERO D.S., ZANICHELLI A., ARCOLEO F., KNOLLE J., KRAVEC I., DONG L., ZIMMERMANN J., ROSEN K., FAN W.T. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. **N. Engl. J. Med.** 363: 532-41, 2010.
- CLIFFER K.D., SIUCIAK J.A., CARSON S.R., RADLEY H.E., PARK J.S., LEWIS D.R., ZLOTCHENKO E., et al. Physiological characterization of Taxol-induced large-fiber sensory neuropathy in the rat. **Ann. Neurol.** 43: 46-55, 1998.
- CLINICAL TRIALS, 2012. Disponível em:  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=icatibant>. Acesso em: 27 julho 2012.
- COCKCROFT JR, CHOWIENCZYK PJ, BRETT SE, BENDER N, RITTER JM. Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. **Br J Clin Pharmacol.** 38: 317-21, 1994.
- CORRÊA C.R., CALIXTO J.B. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.** 110: 193-8, 1993.
- COUTURE R., HARRISSON M., VIANNA R.M., CLOUTIER F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.** 429: 161-76, 2001.
- CRAIG A.D, DOSTROVSKY J.O. Medulla to thalamus. In: WALL P.D., MEIZACK R. (Ed). **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. 1588 p.
- CUNHA T.M., VERRI W.A. JR, FUKADA S.Y., GUERRERO A.T., SANTODOMINGO-GARZÓN T., POOLE S., PARADA C.A., FERREIRA S.H., CUNHA F.Q. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B<sub>1</sub> but not B<sub>2</sub> kinin receptor. **Eur. J. Pharmacol.** 573: 221-9, 2007.
- DAVIS C.L., NAEEM S., PHAGOO S.B., CAMPBELL E.A., URBAN L., BURGESS G.M. B<sub>1</sub> bradykinin receptors and sensory neurones. **Br. J. Pharmacol.** 118: 1469-1476, 1996.
- DINA O.A., BARLETTA J., CHEN X., MUTERO A., MARTIN A., MESSING R.O., LEVINE J.D. Key role for the epsilon isoform of protein kinase C in painful alcoholic neuropathy in the rat. **J. Neurosci.** 20: 8614-9, 2000.
- DINA O.A., CHEN X., REICHLING D., LEVINE J.D. Role of protein kinase Cε and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced

- painful peripheral neuropathy in the rat. **Neuroscience**. 108: 507-15, 2001.
- DIXON WJ. Efficient analysis of experimental observations. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 20: 441-62, 1980.
- DUTRA R.C., LEITE D.F., BENTO A.F., MANJAVACHI M.N., PATRÍCIO E.S., FIGUEIREDO C.P., PESQUERO J.B., CALIXTO J.B. The role of kinin receptors in preventing neuroinflammation and its clinical severity during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **PLoS One**. 6:e27875, 2011.
- ECKERT A., SEGOND VON BANCHET G., SOPPER S., PETERSEN M. Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation. **Pain**. 83: 487-97, 1999.
- EMA - EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Science medicines health. **Firazyr**. 2011. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000899/human\\_med\\_000793.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000899/human_med_000793.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)>. Acesso em 17 junho 2012.
- EVERAERTS W., NILIUS B., OWSIANIK G. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. **Prog. Biophys. Mol. Biol.** 103: 2-17, 2010.
- FAN H.C., ZHANG X., MCNAUGHTON P.A. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. **J. Biol. Chem.** 284: 27884-91, 2009.
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Development & Approval Process (Drugs). **New molecular entity approvals for 2011**. 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm285554.htm>> Acesso em 23 julho 2012.
- FERNANDES E.S., PASSOS G.F., CAMPOS M.M., ARAÚJO J.G., PESQUERO J.L., AVELLAR M.C., TEIXEIRA M.M., CALIXTO J.B. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.** 139: 973-81, 2003.
- FERREIRA J. CAMPOS M.M., PESQUERO J.B., ARAÚJO R., BADER M., CALIXTO J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. **Neuropharmacology**. 41: 1006-1012, 2001.
- FERREIRA J., BEIRITH A., MORI M.A.S., ARAÚJO R., BADER M., PESQUERO J.B., CALIXTO J.B. Reduced nerve injury-induced

- neuropathic pain in kinin B<sub>1</sub> receptor knock-out mice. **J. Neurosci.** 25: 2405-12, 2005.
- FERREIRA J., CAMPOS M.M., ARAÚJO R., BADER M., PESQUERO J.B., CALIXTO J.B. The use of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology.** 43: 1188-97, 2002.
- FERREIRA J., SILVA G.L., CALIXTO J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B<sub>2</sub> kinin receptor activation in mice. **Br. J. Pharmacol.** 141: 787-94, 2004.
- FERREIRA J., TRICHÊS K.M., MEDEIROS R., CABRINI D.A., MORI M.A., PESQUERO J.B., BADER M., CALIXTO J.B. The role of kinin B<sub>1</sub> receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Neuropharmacology.** 54:597-604, 2008.
- FIDANBOYLU M., GRIFFITHS L.A., FLATTERS S.J. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. **PLoS One.** 6: e25212, 2011.
- FIELDS H.L.; BASBAUM A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: WALL P.D., MEIZACK R. (Ed). **Textbook of pain.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. 1588 p.
- FLATTERS S.J., BENNETT G.J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain.** 122: 245-57, 2006.
- FOX A, WOTHERSPOON G, MCNAIR K, HUDSON L, PATEL S, GENTRY C, WINTER J. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B<sub>1</sub> bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. **Pain.** 104: 683-91, 2003.
- FUJITA M., ANDOH T., OHASHI K., AKIRA A., SAIKI I., KURAIISHI Y. Roles of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. **Eur. J. Pain.** 14: 588-94, 2010.
- GABRA B.H, SIROIS P. Kinin B<sub>1</sub> receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. **Neuropeptides.** 37: 36-44, 2003.
- GABRA B.H., MERINO V.F., BADER M., PESQUERO J.B. SIROIS P. Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B<sub>1</sub> receptor-knockout mice. **Regul. Pept.** 127: 245-8, 2005.
- GABRA B.H., SIROIS P. Role of bradykinin B (1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocina-treated mice. **Eur. J. Pharmacol.** 457, 115-124, 2002.

- GIMPL G., WALZ W., OHLEMEYER C., KETTENMANN H.  
Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses. **Neurosci. Lett.** 144: 139-42, 1992.
- GENDRON L, LUCIDO A.L., MENNICKEN F., O'DONNELL D., VINCENT, J.P., STROH T., BEAUDET A. Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic  $\delta$ -opioid receptors in rat dorsal root ganglia. **J. Neurosci.** 26: 953-62, 2006.
- GORDH T, CHU H, SHARMA HS. Spinal nerve lesion alters blood-spinal cord barrier function and activates astrocytes in the rat. **Pain.** 124: 211-21, 2006.
- GRANT A.D., COTTRELL G.S., AMADESI S., TREVISANI M., NICOLETTI P., MATERAZZI S., ALTIER C., CENAC N., ZAMPONI G.W., BAUTISTA-CRUZ F., LOPEZ C.B., JOSEPH E.K., LEVINE J.D., LIEDTKE W., VANNER S., VERGNOLLE N., GEPPETTI P., BUNNETT N.W. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. **J. Physiol.** 578: 715-33, 2007.
- HAMMACK JE, MICHALAK JC, LOPRINZI CL, SLOAN JA, NOVOTNY PJ, SOORI GS, TIRONA MT, ROWLAND KM JR, STELLA PJ, JOHNSON JA. Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cis-platinum-induced peripheral neuropathy. **Pain.** 98: 195-203, 2002.
- HÖSLI L., HÖSLI E., KAESER H., LEFKOVITS M. Colocalization of receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinal cord and brain stem: electrophysiological effects of atrial and brain natriuretic peptide, neuropeptide Y and bradykinin. **Neurosci. Lett.** 148: 114-6, 1992.
- HSIEH H.L., WANG H.H., WU C.Y., JOU M.J., YEN M.H., PARKER P., YANG C.M. BK-induced COX-2 expression via PKC-delta-dependent activation of p42/p44 MAPK and NF-kappaB in astrocytes. **Cell Signal.** 19: 330-40, 2007.
- HSIEH H.L., WU C.Y., HWANG T.L., YEN M.H., PARKER P., YANG C.M. BK-induced cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> expression via sequential PKC-delta, p42/p44 MAPK, and NF-kappaB activation in rat brain astrocytes. **J. Cell. Physiol.** 206: 246-54, 2006.
- HSIEH H.L., YEN M.H., JOU M.J., YANG C.M. Intracellular signalings underlying bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocyte-1. **Cell Signal.** 16: 1163-76, 2004.

- HU P., MCLACHLAN E.M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience**. 112: 23–38, 2002.
- HUANG H., PLAYER M.R. Bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonists as potential therapeutic agents for pain. **J. Med. Chem.** 53: 5383-99, 2010.
- HYLDEN J.L., WILCOX G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.** 67:313–6, 1980.
- IASP–Associação Internacional para o Estudo da Dor. IASP taxonomy. **Pain terms**. 2012. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions>>. Acesso em 27dezembro 2012.
- IFUKU M., FÄRBER K., OKUNO Y., YAMAKAWA Y., MIYAMOTO T., NOLTE C., MERRINO V.F., KITA S., IWAMOTO T., KOMURO I., WANG B., CHEUNG G., ISHIKAWA E., OOBOSHI H., BADER M., WADA K., KETTENMANN H., NODA M. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca<sup>2+</sup>-influx via reverse-mode activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. **J. Neurosci.** 27: 13065-73, 2007.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.
- JAGGI A.S., SINGH N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**. 291: 1-9, 2012.
- JAGGI A.S., SINGH N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**. 291: 1-9.
- JENSEN TS, BARON R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in Neuropathic pain. **Pain**. 102: 1-8, 2003.
- JORDT S.E., BAUTISTA D.M., CHUANG H.H., MCKEMY D.D., ZYGMUNT P.M., HÖGESTÄTT E.D., MENG I.D., JULIUS D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**. 427: 260-5, 2004.
- JOSEPH E.K., LEVINE J.D. Sexual dimorphism for protein kinase c epsilon signaling in a rat model of vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Neuroscience**. 2003; 119(3):831-8.
- JULIUS D., BASBAUM A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413: 203-10, 2001.
- KALEY TJ, DEANGELIS LM. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Br. J. Haematol.** 145: 3-14, 2009.

- KASAI M, KUMAZAWA T, MIZUMURA K. Nerve growth factor increases sensitivity to bradykinin, mediated through B<sub>2</sub> receptors, in capsaicin-sensitive small neurons cultured from rat dorsal root ganglia. **Neurosci. Res.** 32: 231-9, 1998.
- KAUTIO AL, HAANPÄÄ M, SAARTO T, KALSO E. Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. **J. Pain Symptom Manage.** 35:31-9, 2008.
- KHASAR SG, LIN YH, MARTIN A, DADGAR J, MCMAHON T, WANG D, HUNDLE B, ALEY KO, ISENBERG W, MCCARTER G, GREEN PG, HODGE CW, LEVINE JD, MESSING RO. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron.** 24: 253-60, 1999.
- KODA H, MIZUMURA K. Sensitization to mechanical stimulation by inflammatory mediators and by mild burn in canine visceral nociceptors in vitro. **J. Neurophysiol.** 87: 2043-51, 2002.
- KUMAZAWA T., MIZUMURA K., MINAGAWA M., TSUJII Y. Sensitizing effects of bradykinin on the heat responses of the visceral nociceptor. **J. Neurophysiol.** 66: 1819-24, 1991.
- KUNER R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat. Med.** 16: 1258-66, 2010.
- LAI J., LUO M.C., CHEN Q., MA S., GARDELL L.R., OSSIPOV M.H., PORRECA F. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. **Nat. Neurosci.** 9: 1534-40, 2006.
- LAURSEN S.E., BELKNAP J.K. Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. **J. Pharmacol. Methods.** 16:355-7, 1986.
- LEDEBOER A., JEKICH B.M., SLOANE E.M., MAHONEY J.H., LANGER S.J., MILLIGAN E.D., MARTIN D., MAIER S.F., JOHNSON K.W., LEINWAND L.A., CHAVEZ R.A., WATKINS L.R. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. **Brain Behav. Immun.** 21: 686-98, 2007.
- LEEB-LUNDBERG L.M., MARCEAU F., MÜLLER-ESTERL W., PETTIBONE D.J., ZURAW B.L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol. Rev.** 57: 27-77, 2005.
- LEVINE J.D., ALESSANDRI-HABER N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim. Biophys. Acta.** 1772: 989-1003, 2007.

- LEVY D., ZOCHODNE D.W. Increased mRNA expression of the B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. **Pain**. 86: 265-71, 2000.
- LIEDTKE W., CHOE Y., MARTI-RENOM M.A., BELL A.M., DENIS C.S., SALI A., HUDSPETH A.J., FRIEDMAN J.M., HELLER S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**. 103: 525-35, 2000.
- LOESER J.D., MELZACK R. Pain: an overview. **Lancet**. 353: 1607-9, 1999.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-75, 1951.
- LUO M.C., CHEN Q., OSSIPOV M.H., RANKIN D.R., PORRECA F., LAI J. Spinal dynorphin and bradykinin receptors maintain inflammatory hyperalgesia. **J. Pain**. 9: 1096-105, 2008.
- MA Q.P., HEAVENS R. Basal expression of bradykinin B<sub>1</sub> receptor in the spinal cord in humans and rats. **Neuroreport**. 12: 2311-14, 2001.
- MA Q.P., HILL R., SIRINATHSINGHI D. Basal expression of bradykinin B<sub>1</sub> receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. **Neuroreport**. 11: 4003-5, 2000.
- MA Q.P. The expression of bradykinin B<sub>1</sub> receptors on primary sensory neurons that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. **Neuroscience**. 107: 665-73, 2001.
- MACFARLANE B.V., WRIGHT A., O'CALLAGHAN J., BENSON H.A. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.** 75: 1-19, 1997.
- MADEDDU P, ANANIA V, PARGAGLIA PP, DEMONTIS MP, VARONI MV, FATTACCIO MC, GLORIOSO N. Chronic kinin receptor blockade induces hypertension in deoxycorticosterone-treated rats. **Br. J. Pharmacol.** 108: 651-7, 1993.
- MADEDDU P, PARGAGLIA PP, DEMONTIS MP, VARONI MV, FATTACCIO MC, GLORIOSO N. Chronic inhibition of bradykinin B<sub>2</sub>-receptors enhances the slow vasopressor response to angiotensin II. **Hypertension**. 23: 646-52, 1994.
- MANJAVACHI M.N., MOTTA E.M., MAROTTA D.M., LEITE D.F., CALIXTO J.B. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**. 151: 345-55, 2010.
- MARCEAU F. Drugs in the kallikrein-kinin system. In: BADER M. (Ed.). **Kinins**. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2011. 369 p.

- MARCEAU F., REGOLI D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat. Rev. Drug. Discov.** 3: 845-52, 2004.
- MATERAZZI S., FUSI C., BENEMEI S., PEDRETTI P., PATACCHINI R., NILIUS B., PRENEN J., CREMINON C., GEPPETTI P., NASSINI R. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **Pflugers Arch.** 463: 561-9. 2012.
- MENDES G.L., SANTOS A.R., CAMPOS M.M., TRATSK K.S., YUNES R.A., CECHINEL FILHO V., CALIXTO J.B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). **Life Sci.** 63: 369-81, 1998.
- MENÉNDEZ L., LASTRA A., HIDALGO A., BAAMONDE A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. **J. Neurosci. Methods.** 113: 91-7, 2002.
- MEOTTI FC, CAMPOS R, DA SILVA K, PASZCZUK AF, COSTA R, CALIXTO JB. Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors and intracellular kinase pathways. **Br. J. Pharmacol.** 166: 1127-39, 2012.
- MILLAN M.J. The induction of pain: An integrative review. **Prog. Neurobiol.** 57: 1-164, 1999.
- MILLIGAN E.D., WATKINS L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat. Ver. Neurosci.** 10: 23-36, 2009.
- MILLIGAN E.D., WATKINS LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.** 10: 23-36, 2009.
- MIZUMURA K., SUGIURA T., KATANOSAKA K., BANIK R.K., KOZAKI Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? **Exp. Brain Res.** 196: 53-65, 2009.
- MIZUMURA K., SUGIURA T., KATANOSAKA K., BANIK R.K., KOZAKI Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? **Exp. Brain Res.** 196: 53-65, 2009.
- MOREAU M.E., GARBACKI N., MOLINARO G., BROWN N.J., MARCEAU F., ADAM A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J. Pharmacol. Sci.** 99: 6-38, 2005.
- NODA M. Kallikrein-kinin system in the brain. In: BADER M. (Ed.). **Kinins.** Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2011. 369 p.
- NODA M., KARIURA Y., AMANO T., MANAGO Y., NISHIKAWA K., AOKI S., WADA K. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. **Life Sci.** 72: 1573-81, 2003.

- NODA M., KARIURA Y., AMANO T., MANAGO Y., NISHIKAWA K., AOKI S., WADA K. Kinin receptors in cultured rat microglia. **Neurochem. Int.** 45: 437-42, 2004.
- NODA M., KARIURA Y., PANNASCH U., NISHIKAWA K., WANG L., SEIKE T., IFUKU M., KOSAI Y., WANG B., NOLTE C., AOKI S., KETTENMANN H., WADA K. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. **J. Neurochem.** 101: 397-410, 2007.
- NODA M., SASAKI K., IFUKU M., WADA K. Multifunctional effects of bradykinin on glial cells in relation to potential anti-inflammatory effects. **Neurochem. Int.** 51: 185-91, 2007.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Agência Internacional para o Estudo do Câncer. **Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008.** 2012b. <<http://globocan.iarc.fr/>> Acesso em 13 abril 2012.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Media Centre. **Cancer.** 2012a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 13 abril 2012.
- PASSOS G.F., FERNANDES E.S., CAMPOS M.M., ARAÚJO J.G., PESQUERO J.L., SOUZA G.E., AVELLAR M.C., TEIXEIRA M.M., CALIXTO J.B. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. **J. Immunol.** 172:1839-47, 2004.
- PESQUERO J.B., ARAUJO R.C., HEPPENSTALL P.A., STUCKY C.L., SILVA J.A. JR, WALTHER T., OLIVEIRA S.M., PESQUERO J.L., PAIVA A.C., CALIXTO J.B., LEWIN G.R., BADER M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 97: 8140-5, 2000.
- PETCU M., DIAS J.P., ONGALI B., THIBAUT G., NEUGEBAUER W., COUTURE R. Role of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in a rat model of neuropathic pain. **Int. Immunopharmacol.** 8: 188-96, 2008.
- PETERSEN M., ECKERT A.S., SEGOND VON BANCHET G., HEPELMANN B., KLUSCH A., KNIFFKI K.D. Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. **Neuroscience.** 83: 949-59, 1998.
- PLANT T.D., STROTMANN R. TRPV4. **Handb. Exp. Pharmacol.** 179: 189-205, 2007.

- POLOMANO R.C., MANNES A.J., CLARK U.S., BENNETT G.J. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. **Pain** 94: 293-30, 2001.
- PREDIGER RD, MEDEIROS R, PANDOLFO P, DUARTE FS, PASSOS GF, PESQUERO JB, CAMPOS MM, CALIXTO JB, TAKAHASHI RN. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**. 151: 631-43, 2008.
- QUINTÃO N.L., PASSOS G.F., MEDEIROS R., PASZCUK A.F., MOTTA F.L., PESQUERO J.B., CAMPOS M.M., CALIXTO J.B. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. **J. Neurosci**. 28: 2856-63, 2008.
- RAJA S.N., MEYER R.A., RINGKAMP M., CAMPBELL J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL P.D., MEIZACK R. (Ed). **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. 1588 p.
- RAO RD, FLYNN PJ, SLOAN JA, WONG GY, NOVOTNY P, JOHNSON DB, GROSS HM, RENNO SI, NASHAWATY M, LOPRINZI CL. Efficacy of lamotrigine in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial, N01C3. **Cancer**. 112: 2802-8, 2008.
- RAO RD, MICHALAK JC, SLOAN JA, LOPRINZI CL, SOORI GS, NIKCEVICH DA, WARNER DO, NOVOTNY P, KUTTEH LA, WONG GY. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial (N00C3). **Cancer**. 110:2110-8.
- RASHID M.H., INOUE M., MATSUMOTO M., UEDA H. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. 308: 1158-64, 2004.
- REN K., DUBNER R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat. Med**. 16: 1267-76, 2010.
- RIEDEL W., NEECK G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Z. Reumatol**. 60: 404 – 15, 2001.
- ROCHA-E-SILVA M., BERALDO W.T., ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol**. 156: 261-73, 1949.

- SACHS D., VILLARREAL C., CUNHA F., PARADA C., FERREIRA S.H. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **Br. J. Pharmacol.** 156: 826-34, 2009.
- SCHOLZ J., WOOLF C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat. Neurosci.** 10: 1361-8, 2007.
- SCHWANINGER M., SALLMANN S., PETERSEN N., SCHNEIDER A., PRINZ S., LIBERMANN T.A., SPRANGER M. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. **J. Neurochem.** 73: 1461-6, 1999.
- SEABROOK G.R., BOWERY B.J., HEAVENS R., BROWN N., FORD H., SIRINATHSINGHI D.J., BORKOWSKI J.A., HESS J.F., STRADER C.D., HILL R.G. Expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bradykinin receptor mRNA and their function roles in sympathetic ganglia and sensory root ganglia neurons from wild-type and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. **Neuropharmacology.** 36: 1009-1017, 1997.
- SEGOND VON BANCHET G., PETERSEN M., HEPPELMANN B. Bradykinin receptors in cultured rat dorsal root ganglion cells: influence of length of time in culture. **Neuroscience.** 75: 1211-8, 1996.
- SEVCIK M.A., GHILARDI J.R., HALVORSON, K.G., LINDSAY T.H., KUBOTA K., MANTYH P.W. Analgesic efficacy of bradykinin B<sub>1</sub> antagonists in a murine bone cancer pain model. **J. Pain.** 6: 771-5, 2005.
- SHIN J., CHO H., HWANG S.W., JUNG J., SHIN C.Y., LEE S.Y., KIM S.H., LEE M.G., CHOI Y.H., KIM J., HABER N.A., REICHLING D.B., KHASAR S., LEVINE J.D., OH U. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 99: 10150-5, 2002.
- SIAU C., XIAO W., BENNETT G.J. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. **Exp. Neurol.** 201: 507-14, 2006.
- SMITH R.E., BROWN A.M., MAMOUNAS E.P., ANDERSON S.J., LEMBERSKY B.C., ATKINS J.H., SHIBATA H.R., BAEZ L., DEFUSCO P.A., DAVILA E., TIPPING S.J., BEARDEN J.D., THIRLWELL M.P. Randomized trial of 3-hour versus 24-hour infusion of high-dose paclitaxel in patients with metastatic or locally advanced breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-26. **J. Clin. Oncol.** 17: 3403-11, 1999.

- SMITH S.B., CRAGER S.E., MOGIL J.S. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains. **Life Sci.** 74: 2593-604, 2004.
- STORY G.M., PEIER A.M., REEVE A.J., EID S.R., MOSBACHER J., HRICIK T.R., EARLEY T.J., HERGARDEN A.C., ANDERSSON D.A., HWANG S.W., MCINTYRE P., JEGLA T., BEVAN S., PATAPOUTIAN A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell.** 112: 819-29, 2003.
- STUCKY C.L., GOLD M.S., ZHANG X. Mechanisms of pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 98: 11845-6, 2001.
- TALBOT S., CHAHMI E., DIAS J.P., COUTURE R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. **J. Neuroinflammation.** 7: 36, 2010.
- THURSTON D.E. **Chemistry and pharmacology of anticancer drugs.** Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. 290 p.
- TODD A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nat. Rev. Neurosci.** 11: 823-36, 2010.
- TONUSSI CR, FERREIRA SH. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur. J. Pharmacol.** 326:61-5, 1997.
- TRACEY D.J., WALKER J.S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm. Res.** 44: 407-11, 1995.
- TSUNOZAKI M., BAUTISTA D.M. Mammalian somatosensory mechanotransduction. **Curr. Opin. Neurobiol.** 19: 362-9, 2009.
- VINCENT F., DUNCTON M.A. TRPV4 agonists and antagonists. **Curr. Top. Med. Chem.** 11: 2216-26, 2011.
- WANG S., DAI Y., FUKUOKA T., YAMANAKA H., KOBAYASHI K., OBATA K., CUI X., TOMINAGA M., NOGUCHI K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain.** 131: 1241-51, 2008.
- WANG S., DAI Y., FUKUOKA T., YAMANAKA H., KOBAYASHI K., OBATA K., CUI X., TOMINAGA M., NOGUCHI K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain.** 131(Pt 5): 1241-51, 2008.
- WERNER M.F., KASSUYA C.A., FERREIRA J., ZAMPRONIO A.R., CALIXTO J.B., RAE G.A. Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception

- induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**. 53: 48-57, 2007.
- WOLF S., BARTON D., KOTTSCHADE L., GROTHEY A., LOPRINZI C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. **Eur. J. Cancer**. 44:1507-15, 2008.
- WOOLF C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. 152(3 Suppl): S2-15, 2011.
- WOOLF C.J. Overcoming obstacles to developing new analgesics. **Nat. Med.** 16: 1241-7, 2010.
- WOOLF C.J., MA Q. Nociceptors: Noxious stimulus detectors. **Neuron**. 55: 353-64, 2007.
- WOOLF C.J., MANNION R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**. 353: 1959-65, 1999.
- WOOLF C.J., SALTER M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**. 288: 1765-69, 2000.
- WOTHERSPOON G., WINTER J. Bradykinin B<sub>1</sub> receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. **Neurosci.Lett**. 294: 175-8, 2000.
- YAMAGUCHI-SASE S., HAYASHI I., OKAMOTO H., NARA Y., MATSUZAKI S., HOKA S., MAJIMA M. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. **Inflamm. Res**. 52: 164-9, 2003.
- ZHANG H., CANG C.L., KAWASAKI Y., LIANG L.L., ZHANG Y.Q., JI R.R., ZHAO Z.Q. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. **J. Neurosci**. 27: 12067-77, 2007.
- ZHANG H., YOON S.Y., ZHANG H., DOUGHERTY P.M. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of Paclitaxel-induced painful neuropathy. **J. Pain**. 13: 293-303, 2012.
- ZHANG H., YOON S.Y., ZHANG H., DOUGHERTY P.M. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of Paclitaxel-induced painful neuropathy. **J. Pain**. 13: 293-303, 2012.
- ZHANG M., MAO Y., RAMIREZ S.H., TUMA R.F., CHABRASHVILI T. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood-brain barrier permeability via oxidative stress. **Neuroscience**. 171: 852-8, 2010.

- ZHANG Y., WANG Y.H., GE H.Y., ARENDT-NIELSEN L., WANG R., YUE S.W. A transient receptor potential vanilloid 4 contributes to mechanical allodynia following chronic compression of dorsal root ganglion in rats. **Neurosci. Lett.** 432: 222-7, 2008.
- ZHENG F.Y., XIAO W.H., BENNETT G.J. The response of spinal microglia to chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies is distinct from that evoked by traumatic nerve injuries. **Neuroscience.** 176:447-54, 2011.
- ZHENG F.Y., XIAO W.H., BENNETT G.J. The response of spinal microglia to chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies is distinct from that evoked by traumatic nerve injuries. **Neuroscience.** 176: 447-54, 2011.