

Marcella de Amorim Ferreira

**PARTICIPAÇÃO DO Ca_v2.3 ESPINHAL NA HIPERALGESIA
SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do grau de mestre em
farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira.

Coorientadora: Dra. Debora Denardin
Lückmeyer

Florianópolis
2018

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

Ferreira, Marcella de Amorim

Participação do CaV2.3 espinhal na hiperalgesia secundária induzida por capsaicina em camundongos / Marcella de Amorim Ferreira ; orientador, Juliano Ferreira, coorientadora, Débora Denardin Lückemeyer, 2018.

86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. CaV2.3. 3. Sensibilização Central. 4. Dor Neuropática. 5. Oligonucleotídeo Antissenso. I. Ferreira, Juliano. II. Lückemeyer, Débora Denardin. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

"Participação do Ca_v2.3 espinhal na hiperalgesia secundária induzida por capsaicina em camundongos"

Por

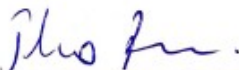
Marcella de Amorim Ferreira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (016/2018/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.




Prof.(a) Dr.(a) Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr.(a) Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Prof. Dr. Rui Daniel Prediger
coordenador do PPG Farmacologia
CCB/UFSC

Dr.(a) Célio José de Castro Júnior - participação por videoconferência
(Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte)



Dr.(a) Alfeu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 08 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Juliano Ferreira pela orientação ao longo dos anos de iniciação científica e de mestrado. Muito obrigada por compartilhar comigo sua paixão pela ciência, seu conhecimento, seus ensinamentos, pelo incentivo e por me proporcionar uma boa formação científica. Agradeço pela paciência e por ter aceitado entrar nessa jornada científica junto comigo.

A minha coorientadora Dra. Débora Denardin Lückemeyer, a quem carinhosamente chamamos de Débs, por ter me abraçado e me auxiliado na realização deste projeto. Obrigada por me guiar nos métodos de biologia molecular, por cegar meus experimentos e por toda a paciência. Você é uma das responsáveis por me proporcionar um amadurecimento profissional e um crescimento pessoal. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos científicos, sua paixão pelo laboratório, sua organização, sua eficiência e acima de tudo sua amizade. Agradeço pelos momentos de desabafo, pelo apoio, pelos puxões de orelha, pelas idas as aulas de inglês, pelo burrito nosso de cada semana, pelos passeios com a Mafalda, pelas risadas, pelos choros. Só tenho a lhe agradecer por tornar essa jornada mais leve e prazerosa.

A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Farmacologia Experimental e contribuíram para minha formação científica de alguma forma.

Ao Dr. Arthur Prudente, mas conhecido como Bauru, por todo suporte no início da iniciação científica, por estar sempre disposto a ajudar, pelo auxílio científico, pela paciência, pelos momentos de descontração e por ser essa enciclopédia ambulante que consegue conversar sobre qualquer assunto em qualquer momento e que nos proporciona sempre grandes momentos de aprendizado.

Ao Dr. Sérgio José Macedo Júnior, Ginho, Guiguís, Fio, obrigada por estar sempre disponível, por proporcionar discussões científicas coerentes, oportunas e sempre me esclarecer dúvidas com uma clareza e paciência honráveis. Além disso, muito obrigada pela amizade, pelas discussões não científicas, pelas idas ao bar, pelas danças, pelas piadas, por ser essa calma em meio a tempestade. Saiba que sua dedicação e humildade são fontes de inspiração.

A todos os colegas e amigos de departamento, o qual sempre proporcionaram ótimos momentos de aprendizado e de descontração, desde o auxílio para realização de experimentos até as idas ao Container nosso de toda quinta, muitíssimo obrigada por tornarem esse caminho mais prazeroso.

Em especial muito obrigada aos amigos Lucas Mascarin e Daniel Patrício pelo auxílio na utilização dos equipamentos do Laboratório de Imunologia.

Aos meus amigos por tornarem esse desafio mais leve. Destaco aqui minha colega de apartamento Bruna Letícia da Silva, muito obrigada amiga por me acompanhar em todas as etapas, em todos os momentos, por me entender, acreditar em mim, por me dar suporte, por sempre me animar e estar presente sempre, incondicionalmente, esta conquista também é sua.

Ao meu namorado, Felipe Eduardo da Silva, muito obrigada por tudo. Por me aturar nestes últimos meses, por me acalmar, por acreditar e confiar em mim. Muito obrigada por ser essa calma em meio ao meu estresse, por fazer com que eu queira sempre melhorar, me animar e nunca duvidar que eu conseguiria.

Por fim, a minha família, minha mãe Ivone Cruz de Amorim Ferreira e a minha irmã Camilla de Amorim Ferreira, muito obrigada pelo apoio incondicional que vocês me proporcionam, por acreditarem sempre em mim, me incentivarem a nunca desistir e a buscar sempre o melhor. Obrigada por nunca duvidarem de mim, até quando eu mesma duvidei, por acreditar e por sonhar comigo, essa conquista é para vocês.

Ao professor Dr. Célio de Castro Júnior e ao professor Dr. Alfeu Zanotto Filho por aceitarem o convite para compor a banca de avaliação desta dissertação, a qual as contribuições feitas certamente serão valiosas para o aprimoramento do trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela acolhida e ao CNPq pelo suporte financeiro.

“A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”
(Carlos Drumond de Andrade)

RESUMO

A dor neuropática é de difícil tratamento, sendo caracterizada por aumento na responsividade dos neurônios nociceptivos na medula espinhal (sensibilização central). Apesar de ser expresso em neurônios nociceptivos, o papel do Cav2.3 (a subunidade formadora de corrente tipo R de canais de cálcio dependente de voltagem-CCDV) na sensibilização central é pouco compreendido. Assim, o objetivo do presente estudo foi de verificar se o bloqueio ou se a redução de expressão espinhal do Cav2.3 reverte a hiperalgesia secundária induzida por capsaicina em camundongos, em um modelo de sensibilização central preditivo para fármacos eficazes no tratamento da dor neuropática. A injeção intradérmica de capsaicina em camundongos causou nocicepção espontânea nos primeiros cinco minutos e hiperalgesia secundária (avaliada por filamentos de von Frey) de meia até cinco horas após a injeção, de maneira semelhante em machos e fêmeas. O pós-tratamento, mas não o pré-tratamento intratecal com o bloqueador do Cav2.3 SNX-482 reduziu parcialmente e brevemente a hiperalgesia secundária induzida pela capsaicina, em uma dose (300 pmol/sítio) que não causou efeitos adversos. Por outro lado, o pré ou o pós-tratamento intratecal com ω -conotoxina MVIIA (um bloqueador de Cav2.2 usado como controle positivo) reduziu amplamente e longamente a hiperalgesia secundária induzida pela capsaicina, entretanto somente em dose (30 pmol/sítio) que também foi capaz desencadear o surgimento de efeitos adversos. Finalmente, a redução da expressão do Cav2.3 no gânglio da raiz dorsal e medula espinhal causada pelo pré-tratamento intratecal com um oligonucleotídeo antissenso contra o Cav2.3 (2,5 nmol/sítio, de 12/12 horas, por 3 dias), foi capaz de prevenir, de maneira robusta e duradoura, a hiperalgesia secundária induzida pela capsaicina, sem causar efeitos adversos. Assim, nossos resultados demonstram que o Cav2.3 participa do processo de sensibilização central, indicando ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos mais seguros e eficazes no tratamento da dor neuropática.

Palavras chave: canal de cálcio tipo R, dor neuropática, sensibilização central, oligonucleotídeo antissenso.

ABSTRACT

Neuropathic pain has a difficult treatment, characterized by increased sensitivity of nociceptive neurons in the spinal cord (central sensitization). Despite being expressed in nociceptive neurons, the role of Cav2.3 (the subunit former of the chain type R of voltage gated calcium channel) in central sensitization is poorly understood. Thus, the purpose of the present study was to verify whether the blockade or the knockdown of spinal Cav_v2.3 expression reverses capsaicin-induced secondary hyperalgesia in mice, a central sensitization model predictive for effective drugs in the treatment of neuropathic pain. Capsaicin intradermal injection in mice caused spontaneous nociception in the first five minutes and secondary hyperalgesia (evaluated by von Frey filaments) from one to five hours post-injection, and similarly in males and females. Post treatment but not intrathecal pretreatment with the Cav_v2.3 SNX-482 blocker partially and briefly reduced capsaicin-induced secondary hyperalgesia at a dose (300 pmol/site) that did not cause adverse effects. On the other hand, intrathecal pretreatment or post treatment with ω -conotoxin MVIIA (a Cav_v2.2 blocker used as a positive control) severely and for a longlasting time reduced the capsaicin-induced secondary hyperalgesia, however only at a dose (30 pmol/site) that caused adverse effects. Finally, the reduction of Cav_v2.3 expression in the dorsal root ganglion and spinal cord caused by intrathecal pretreatment with an antisense oligonucleotide against Cav_v2.3 (2.5 nmol/site, 12/12 hours for 3 days) was able to prevent, in a robust and longlasting way, the secondary hyperalgesia induced by capsaicin, without causing adverse effects. Thus, our results demonstrate that Cav_v2.3 is involved in the central sensitization process, indicating that it is a potential target for the development of newer, safer and more effective drugs for the treatment of neuropathic pain.

Key words: calcium channel R type, neuropathic pain, central sensitization, oligonucleotide antisense.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais vias e mecanismos envolvidos na modulação da dor.....	26
Figura 2 - Representação da formação dos CCDV.	28
Figura 3 - Classificações dos CCDV.....	29
Figura 4 - Avaliação da hiperalgesia secundária nas áreas adjacentes à injeção.	44
Figura 5 - Caracterização do modelo de hiperalgesia secundária induzida por capsaicina em camundongos machos e fêmeas.	50
Figura 6 - Efeito antinociceptivo da administração intratecal do SNX-482 no modelo de hiperalgesia secundária.	54
Figura 7 - Efeito por sexo, do pós-tratamento com bloqueadores de CCVD tipo R e N na nocicepção induzida pela capsaicin.	56
Figura 8 - Efeito do pré-tratamento com bloqueadores de CCVD tipo N e R na nocicepção induzida pela capsaicina.....	58
Figura 9 - Efeito do tratamento com ASO contra o CCVD tipo R....	60
Figura 10 - Expressão do CaV2.3 após tratamento com ASO.	61
Figura 11 - Avaliação do tratamento com ASO contra o CCVD tipo R no modelo de hiperalgesia secundária.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Recomendações para o tratamento de dores neuropáticas atualmente disponíveis.	23
Tabela 2 - Sequência de senso utilizados para os experimentos com o Cav2.3.	41
Tabela 3 - Efeitos adversos em camundongos fêmeas tratados com ω -conotoxina MVIIA.	51
Tabela 4 - Efeitos adversos em machos e fêmeas tratados com SNX-482.	52
Tabela 5 - Efeitos adversos em fêmeas tratados com ASO contra CCVD tipo R.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A5 e A7 - Núcleos do tronco cerebral
AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
Am - Amígdala
ANOVA – Análise de variância (do inglês, *Analyses of variance*)
ARRIVE – Pesquisa Animal e Relato de Experimentos in vivo (do inglês, *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*)
ASOs – Oligonucleotídeos antissenso (do inglês, *Antisense oligonucleotide*)
B – Basal
Cav – Canal ativado por voltagem
CC - Córtex cerebral
CCDV – Canais de cálcio dependentes de voltagem
CEUA – Comitê de ética no uso de animais
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Cq – Ciclo de quantificação
CSDV – Canais de sódio dependentes de voltagem
FDA – Administração de Drogas e Alimentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)
GRD – Gânglio da raiz dorsal
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)
HPRT – Hipoxantina guanina fosforibosil transferase (do inglês, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)
HVA – Ativado por alta voltagem (do inglês, *High voltage-activated*)
i. pl. – intraplantar
i. t. – intratecal
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*)
LAFEX – Laboratório de Farmacologia Experimental
LC - Locus coeruleus.
LIDI – Laboratório de Imunologia
LVA – Ativado por baixa voltagem (do inglês, *Low voltage-activated*)
MM – sequência incompatível (do inglês, mismatch)
NeuPSIG – (do inglês, *Neuropathic Pain SIG*)
NK1 – Receptor de neurocinina 1 (do inglês, *Neurokinin 1*)
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAG - Substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *Periaqueductal gray*)
Pb – Núcleo parabraquial

PBS – Salina tamponada com fosfato (do inglês, *Phosphate-buffered saline*)

qPCR – Reação em Cadeia Polimerase quantitativa em tempo real (do inglês, *Polymerase Chain Reaction Real Time*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic acid*)

RNAm – RNA mensageiro

SNC – Sistema Nervoso Central

Tal - Tálamo

TRPV1 – Receptor de potencial transitório vanilóide 1 (do inglês, *Transient receptor potential vanilloid 1*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. HIPÓTESE.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1.OBJETIVO GERAL	37
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1.ANIMAIS.....	39
4.2. FÁRMACOS E REAGENTES	40
4.3. MODELO DE HIPERLAGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA	41
4.4.AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	42
4.4.1.AVALIAÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS SENSORIAIS E MOTORES.....	42
4.4.2.AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO ESPONTÂNEA.....	42
4.4.3.AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE TÉRMICA AO CALOR PELO TESTE DE HARGREAVES.....	43
4.4.4.AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA PELO TESTE DE VON FREY	43
4.5.REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR).....	44
4.5.1.EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	44
4.5.2.REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR).....	45
4.5.3.REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR).....	45
4.5.4.ANÁLISE DOS RESULTADOS	46
4.6.VERIFICAÇÃO CICLO ESTRAL	47
4.7.DESTINO DOS ANIMAIS	47
4.8.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5.RESULTADOS.....	49
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA	49
5.2. AVALIAÇÕES DE TOXICIDADE	50
5.3. EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO TIPO R E N NA HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA	53
5.4. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO TIPO R E N NA HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA	56

5.5. EFEITO DO TRATAMENTO COM OLIGONUCLEOTÍDEO ANTISSENSENO CONTRA CANAIS DE CÁLCIO TIPO R NA HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA	59
6.DISSCUSSÃO	63
7.CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

A Associação Internacional para Estudos da Dor (do inglês *International Association for Study of Pain* - IASP) define dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial; ou descrita em termos de tal dano” (IASP, 1994). Em relação à sua causa, a IASP classifica a dor em nociceptiva (que ocorre com um sistema nervoso somatossensorial funcionando normalmente e que possui caráter fisiológico), inflamatória (relacionada ao dano tecidual), dor nociplástica (que surge da nocicepção alterada sem haver evidência de dano tecidual e doença ou lesão do sistema somatossensorial) e dor neuropática. A dor neuropática é definida pela IASP como dor originada de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial (LOESER; TREEDE, 2008).

Quando comparados a pacientes com dores não-neuropáticas, a dor neuropática é considerada mais grave e é relacionada a pior qualidade de vida dos pacientes. Um estudo no Reino Unido demonstrou que cerca de 17% dos pacientes com dores neuropáticas relataram escores de qualidade de vida relacionados à saúde equivalentes a “pior que a morte”. Além disso, frequentemente a dor é tratada de maneira inadequada, levando a graves consequências fisiológicas, psicológicas, econômicas e sociais para os pacientes, suas famílias e para a sociedade de um modo geral (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN, 2015).

A dor neuropática é considerada complexa devido as suas características variáveis de causas, localização e cronicidade que acabam alterando a qualidade de vida dos pacientes que convivem com essa doença. É uma consequência grave e complexa de dano nervoso acompanhada de alterações no sistema nervoso periférico e central (SNC). Os pacientes que sofrem desta condição ficam incapacitados e convivem com dores moderadas a severas durante anos (ECCLESTON; HEARN; WILLIAMS, 2015).

A dor neuropática possui etiologia diversa, podendo ser causada por lesão nervosa relacionada a trauma ou tumor, por distúrbios metabólicos como a diabetes, por infecções como pelo vírus HIV (do inglês Human Immunodeficiency Virus) ou herpes vírus, por fármacos como alguns antirretrovirais e quimioterápicos, entre outras causas imunes, vasculares ou genéticas (ATTAL; BOUHASSIRA; BARON, 2018).

Apesar dos dados sobre dores neuropáticas serem escassos devido à dificuldade de diagnosticar essa patologia, alguns estudos populacionais

que utilizaram métodos validados descobriram que 7 a 8% dos adultos que convivem com dores crônicas possuem características correspondentes a dores neuropáticas. No Reino Unido, 26% das pessoas com diabetes apresentaram dor neuropática periférica. Dos 33 milhões de pessoas infectadas pelo HIV cerca de 35% têm dor neuropática, que não responde bem aos tratamentos. Aproximadamente 20% das pessoas com câncer têm dor neuropática relacionada ao câncer. Estudos nos Estados Unidos e na Holanda descobriram que 2,6% e 10%, respectivamente, desenvolverão neuralgia pós-herpética crônica (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN, 2015). Além disso, já foi constatado que a prevalência de dores neuropáticas é maior no sexo feminino e aumenta de acordo com a idade (ATTAL; BOUHASSIRA; BARON, 2018).

As dores neuropáticas são condições heterogêneas, possuem um impacto negativo na saúde física e mental do indivíduo, afetando a qualidade de vida dos pacientes que convivem com esta desordem (ELMOFTY; ANITESCU; BUVANENDRAN, 2013). Estes pacientes apresentam a dor como um sintoma predominante que está combinada a outras alterações sensoriais, podendo ser estas positivas (hipersensibilidade) ou negativas (hiposensibilidade). Alguns sintomas relatados são: sensações de formigamento, queimação, choque e agulhadas, além de alterações de sensibilidade mecânica e térmica (BARON; BINDER; WASNER, 2010). A hipersensibilidade mecânica pode estar presente na forma de alodínia (sensibilidade a um estímulo previamente inócuo) ou hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo nocivo) (LOESER; TREEDE, 2008). Já a sensibilidade térmica ao calor e ao frio pode apresentar-se como hiperalgesia ou hipoalgesia. A presença e ausência destes sintomas varia de acordo com os pacientes e com o tipo de neuropatia que os acomete (MAIER *et al.*, 2010). Estas alterações podem ocorrer no local da lesão, adjacentes ou combinadas nas áreas de deficiência sensorial e indicam fortemente o diagnóstico de dor neuropática (CRUCCU *et al.*, 2010).

Diferente do que ocorre com as dores de caráter inflamatório, pacientes com dores neuropáticas dificilmente respondem a terapia farmacológica dos degraus de escala analgésica indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento da dor. O sucesso da terapia depende de um trabalho multiprofissional envolvendo medidas preventivas, não farmacológicas e farmacológicas clássicas de variadas opções intervencionistas, como a estimulação da medula espinhal, infusão de medicamentos por via intratecal, infusões

intravenosas e bloqueio de nervos (ELMOFTY; ANITESCU; BUVANENDRAN, 2013).

Os pacientes com dores neuropáticas não respondem a analgésicos clássicos como os AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) e respondem pouco a opioides. Uma revisão sistemática com meta-análise financiada pelo capítulo de dor neuropática (NeuPSIG) da IASP demonstrou que existem três linhas de tratamento para dores neuropáticas (Tabela 1). Como primeira linha de tratamento para dores neuropáticas são fortemente recomendados antidepressivos tricíclicos, inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina, além de gabapentinóides. Como segunda linha temos recomendações para utilização de tramadol, adesivos de lidocaína e adesivos de capsaicina. Por fim, como terceira linha no tratamento de dores neuropáticas podem ser utilizados opióides fortes, como morfina e oxicodona, além da utilização da toxina botulínica (FINNERUP *et al.*, 2016).

Tabela 1- Recomendações para o tratamento de dores neuropáticas atualmente disponíveis.

CLASSIFICAÇÃO	FÁRMACO
PRIMEIRA LINHA	Gabapentinóides (gabapentina e pregabalina) Inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (duloxetina e venlafaxina) Antidepressivos tricíclicos
SEGUNDA LINHA	Adesivo de capsaicina 8% Adesivo de lidocaína Tramadol
TERCEIRA LINHA	Toxina botulínica Opióides fortes
INCONCLUSIVOS	Creme de capsaicina Carbamazepina Clonidina tópica Lamotrigina Antagonista NMDA Topiramato

Fonte: Adaptado de (FINNERUP, 2016).

Os tratamentos atualmente disponíveis proporcionam apenas alívio parcial da dor nos pacientes com neuropatia, além disso essas terapias desencadeiam alguns efeitos adversos que limitam seu uso. A utilização de fármacos indicados como primeira linha para o tratamento para dores neuropáticas pode desencadear alguns efeitos adversos como sedação, tontura, hipotensão, ganho de peso, desequilíbrio, retenção urinária, constipação, entre outros. Os adesivos utilizados como segunda linha no tratamento podem gerar irritação na pele e vermelhidão (JONES; LAWSON; BACKONJA, 2016).

Alguns dos fármacos de segunda e terceira linha previstos para o tratamento de dores neuropáticas possuem ação principalmente em mecanismos periféricos. Fármacos como a lidocaína, agem pelo bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem (CSDV) atuando nas descargas neuronais ectópicas, diminuindo a transmissão periférica dos estímulos nociceptivos (ELMOFTY; ANITESCU; BUVANENDRAN, 2013). A utilização de adesivos com altas concentrações de capsaicina gera uma desfuncionalização do receptor de potencial transitório tipo vanilóide 1 (TRPV1), bloqueando assim a transdução periférica. A toxina botulínica age diminuindo a sensibilização periférica (COLLOCA *et al.*, 2017). Já os opioides fracos ou fortes podem gerar uma inibição pré e pós-sináptica na medula espinhal, além de atuar em vias supra espinhais (GILRON; JENSEN; DICKENSON, 2013).

Os fármacos previstos como primeira linha para o tratamento de dores neuropáticas, por sua vez, possui mecanismos relacionados ao controle espinhal da transmissão dos estímulos nocivos. Os antidepressivos, tanto tricíclicos quanto os inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina, agem ativando a via descendente inibitória relacionada à dor (BARON; BINDER; WASNER, 2010). A gabapentina e a pregabalina, ligam-se a subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), que estão altamente expressos em condições de dor neuropáticas, bloqueando a entrada de cálcio e impedindo a liberação de neurotransmissores excitatórios, gerando uma diminuição na sensibilização central (COLLOCA *et al.*, 2017).

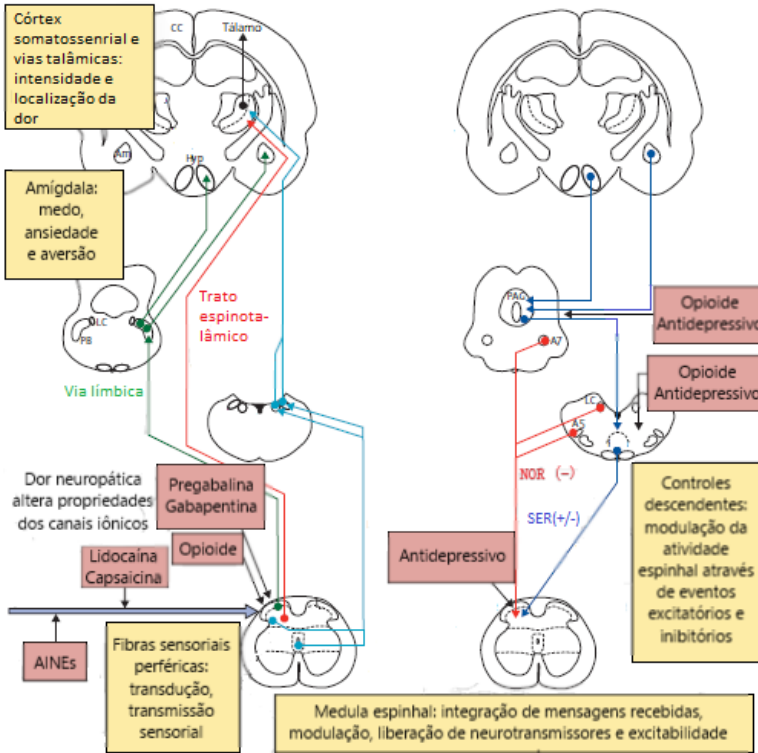
A sensibilização é um fenômeno onde ocorre uma relação desproporcional entre o estímulo provocado e a percepção a dor, ou seja, redução do limiar de dor. Esta sensibilização pode ocorrer a nível periférico ou central (LATREMOLIERE; WOOLF, 2010). A sensibilização periférica ocorre no local da lesão tecidual, causada pela alteração nos limiares dos nociceptores periféricos (ELMOFTY; ANITESCU; BUVANENDRAN, 2013). Já a sensibilização central é uma

característica marcante encontrada nos pacientes com dores neuropáticas e é uma forma de neuroplasticidade que causa responsividade aumentada dos neurônios nociceptivos no SNC, especialmente da medula espinhal, a estimulação aferente normal ou sublimiar (LOESER; TREEDE, 2008). Há a facilitação da passagem dos estímulos nociceptivos para o SNC, onde ocorre a estimulação excessiva das fibras C e A δ , causando plasticidade nos neurônios espinhais e supra espinhais. Em consequência disto, a transmissão dos estímulos mecânicos pelas fibras A β , passam a ser interpretados como dolorosos. Assim como na sensibilização periférica, ocorre a redução no limiar de dor e o aumento da resposta frente a estímulos considerados nocivos, além disso, há o aumento da resposta dolorosa desencadeada por um estímulo na área de tecido normal, fora da área lesionada (alodínia) (WOOLF, 2012; VAN DEN BROEKE *et al.*, 2015).

As disfunções no SNC causadas pela sensibilização central incluem alterações no processamento sensorial, perda no controle dos mecanismos antinociceptivos descendentes, aumento da atividade facilitatória nas vias nociceptivas e aumento da atividade neuronal durante estímulos dolorosos (NIJS *et al.*, 2015). Com isso, fármacos que envolvem o controle do mecanismo de sensibilização central mostram ser altamente promissores para o tratamento de dores neuropáticas. A figura 1 demonstra os mecanismos de ação das terapias disponíveis para o tratamento de dores neuropáticas além de seus locais de ação.

Figura 1 - Principais vias e mecanismos envolvidos na modulação da dor.

Vias ascendentes à esquerda, vias descendentes à direita. Estruturas e suas funções resumidos nas caixas amarelas e os agentes farmacológicos que modulam a dor são mostrados em seus locais de ação nas caixas vermelhas. Am = amígdala. A5 e A7 = núcleos do tronco cerebral contendo neurônios noradrenérgicos. CC = córtex cerebral. Hyp = hipotálamo. LC = locus coeruleus. NOR = Noradrenalina. PAG = substância cinzenta periaquedutal. Pb = núcleo parabraquial. SER = Serotonina.



Fonte: Adaptado de GILRON, 2013.

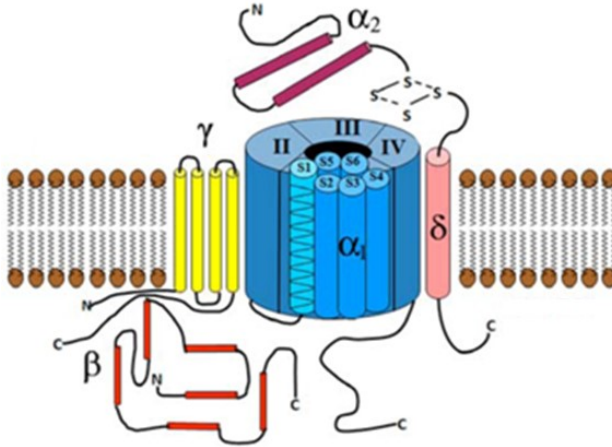
A partir destas alterações e da plasticidade neuronal, os neurônios sensoriais lesionados e os não danificados exibem mudanças em sua transcrição, alterando suas propriedades de membrana, crescimento e transmissão. Essas alterações são maiores do que as que ocorrem em na sensibilização periférica e envolvem a expressão alterada de canais iônicos, receptores e transmissores (LATREMOLIERE; WOOLF, 2010). Esse aumento da intensidade de dor e na sensibilização central são

causados pela redução neuronal dos limiares e pela expansão do campo receptivo, levando a um disparo contínuo (GILRON; JENSEN; DICKENSON, 2013).

O possível efeito analgésico de algumas toxinas extraídas de venenos de animais peçonhentos vem sendo amplamente estudado devido ao mecanismo de bloqueio de canais iônicos dependentes de voltagem envolvidos na nocicepção. Contudo, essas toxinas podem gerar efeitos adversos indesejáveis como alterações motoras, além de serem de difícil administração, necessitando assim de estudos mais precisos (HAMAD *et al.*, 2018).

Células excitáveis, como neurônios e células musculares, contêm canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) que são necessários para mediar funções de liberação de transmissores, secreção de hormônios, contração, transcrição gênica, entre outras funções (TERASHIMA *et al.*, 2013). Os CCDV podem ser formados por até cinco subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ e γ . As subunidades $\alpha 2$, β , δ e γ são acessórias e possuem funções regulatórias, como o controle do nível de expressão dos CCVD. Geralmente a subunidade $\alpha 2$ forma um complexo regulatório com a subunidade δ , formando a subunidade regulatória $\alpha 2\delta$ (ZAMPONI *et al.*, 2015). A subunidade $\alpha 1$ é a formadora de poro, que determina as propriedades biofísicas e farmacológicas do canal. Possui duas porções citoplasmáticas, uma N e outra C-terminal, além de quatro domínios (I-IV), cada um deles com seis segmentos transmembrana (S1-S6), (CATTERALL, 2011). Acredita-se que os primeiros quatro segmentos de cada domínio (S1-S4) são responsáveis pela detecção de voltagem e alterações no potencial de membrana que são importantes para a atividade do canal. Os dois segmentos restantes (S5-S6) compõem o revestimento interno dos poros (NEUMAIER *et al.*, 2015). A figura 2 representa a formação dos CCDV.

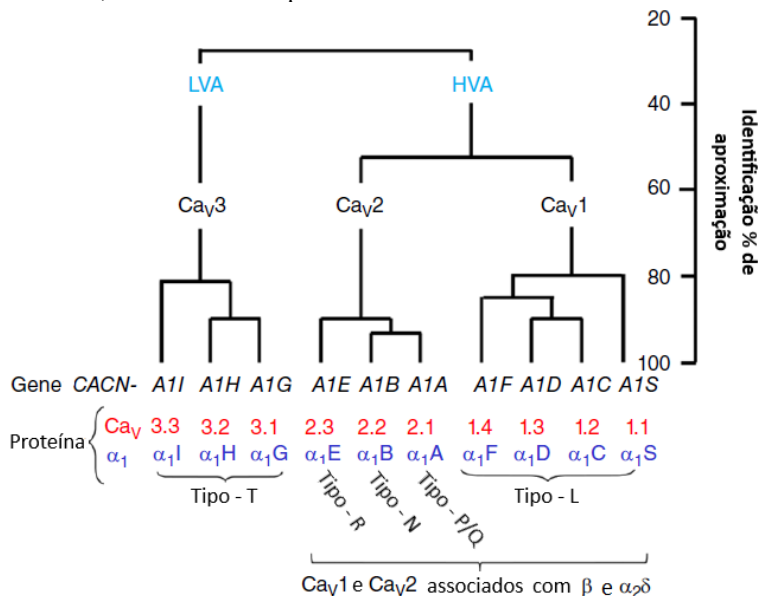
Figura 2 - Representação da formação dos CCDV.



Fonte: GURKOFF, *et al.*, 2013.

Foram identificadas 10 diferentes subunidades $\alpha 1$ que foram nomeadas e classificadas de acordo com sua homologia em $Ca_v1.1-1.4$, $Ca_v2.1-2.3$ e $Ca_v3.1-3.3$ (Figura 2). Os CCDV possuem diferentes características de acordo com a proteína $\alpha 1$ presente, o gene codificante, suas propriedades de ativação e sua localização. Em uma classificação mais ampla os CCDV são classificados de acordo com sua voltagem de ativação em ativados por baixa voltagem (LVA, do inglês low voltage-activated) e ativados por alta voltagem (HVA, do inglês high voltage-activated). Estes canais ativados por baixa e alta voltagem podem ser subdivididos em categorias de acordo com as suas propriedades biofísicas e farmacológicas. Os canais ativados por baixa voltagem são chamados de tipo T, por serem ativados por voltagem do tipo transitória e correspondem a família $Ca_v3.1$ a 3.3 . Os canais ativados por alta voltagem são divididos e compreendem aos Ca_v das famílias um e dois. A família Ca_v1 compreendem os canais tipo L que são ativadas por correntes de longa duração ($Ca_v1.1$ a 1.4). A família de Ca_v2 são divididas em P/Q os quais foram isolados primeiramente em células Purkinge ($Ca_v2.1$), N por serem principalmente neuronais ($Ca_v2.2$) e R que são ativados por uma corrente do tipo residual ($Ca_v2.3$) (DOLPHIN, 2016; NEUMAIER *et al.*, 2015; ZAMPONI *et al.*, 2015).

Figura 3 - Ilustração das classificações dos CCDV: subunidades α_1 , genes codificantes, nomenclatura da proteína e divisão em HVA e LVA.



Fonte: Adaptado de DOLPHIN, 2016.

Os CCDV estão distribuídos de maneira diferente por todo o organismo. Os canais da família Ca_v1 se distribuem-se majoritariamente no músculo esquelético, cardíaco e liso, os Ca_v3 são em sua maioria encontrados no coração e tálamo. Enquanto a família de Ca_v2 são encontrados principalmente em tecidos neuronais como nos terminais pré-sinápticos, onde podem participar da liberação de neurotransmissores e auxiliar na modulação da via nociceptiva, além de estarem envolvidos na neuroplasticidade neuronal (ZAMPONI *et al.*, 2015). Devido à localização, a família de CCDV Ca_v2 mostra ser mais relevante para estudos relacionados a dor.

A família Ca_v2 são ativados por despolarização e são altamente expressos em tecidos neuronais como no corno dorsal da medula e no gânglio da raiz dorsal (GRD) indicando papel na regulação e transmissão nociceptiva (MURAKAMI *et al.*, 2001). O envolvimento desta família de canais nas vias nociceptivas vem sendo evidenciado por estudos que utilizam toxinas peptidérgicas bloqueadoras destes canais. A ziconotida (Prialt®) é um fármaco composto pela versão sintética da ω -conotoxina MVIIA extraída do veneno do caracol marinho *Conus magus* (OLIVERA

et al., 1985). O bloqueio do Cav2.2 pela administração intratecal de ziconotida em humanos mostrou eficácia no tratamento de dores neuropáticas. No entanto, a administração de ziconotida é capaz de causar efeitos adversos motores e sensoriais, que limitam seu uso clínico. Em modelos animais, estudos demonstraram a presença de disfunções motoras, como surgimento de tremores e serpentear de cauda (MALMBERG; YAKSH, 1994). Em humanos há a presença de vertigens, confusão mental, alucinações, alterações de humor, náuseas e vômitos devido a sua ação no SNC (WALLACE *et al.*, 2008). Por ser uma toxina peptídica, a ziconotida precisa ser administrada por via intratecal, em regime de infusão, de maneira lenta e contínua (SKOV *et al.*, 2007). Foi o primeiro bloqueador de CCVD aprovado para uso clínico no tratamento de dores neuropáticas. No entanto, a dificuldade de administração e os efeitos adversos decorrentes do seu uso são limitações a serem consideradas na utilização da ziconotida.

Além da subunidade $\alpha 1$ formadora do poro, os canais da família Cav2 são compostos pelas subunidades regulatórias $\alpha 2\delta$. Estas subunidades são os principais alvos para a ação dos fármacos gabapentinóides, como a gabapentina e prebagalina. Essas subunidades regulatórias estão altamente expressas em pacientes com dores neuropáticas (COLLOCA *et al.*, 2017). Primeiramente estes fármacos foram desenvolvidos para o tratamento da epilepsia como análogos do GABA, depois foi descoberto que eles não atuam pela via gabaérgica e sim pelo bloqueio das subunidades $\alpha 2\delta$ dos CCDV, diminuindo a amplitude das correntes de cálcio (DOLPHIN, 2016). Estes fármacos são aprovados para o uso no tratamento de várias neuropatias, principalmente dores neuropáticas periféricas (DICKENSON; BEE; SUZUKI, 2005). A utilização destes fármacos também causa aparecimento de efeitos adversos relacionados ao SNC como tontura, perda do sentido de coordenação, confusão mental e efeitos sistêmicos como ganho de peso e edema, causando desconforto e diminuindo a adesão medicamentosa dos pacientes (JONES; LAWSON; BACKONJA, 2016). Assim, apesar de ser um alvo importante para o tratamento da dor neuropática, novos fármacos analgésicos mais seguros que produzam antagonismo de CCDV são necessários.

O canal Cav2.3 é expresso no sistema nervoso periférico e central. Dentro do SNC, os Cav2.3 estão envolvidos na plasticidade pré e pós-sináptica e na liberação de neurotransmissores (WORMUTH *et al.*, 2016). Sabe-se que a fosforilação do Cav2.3 é necessária para a função deste canal (NEUMAIER *et al.*, 2018). Os canais Cav2.3 foram descritos em diferentes neurônios, incluindo corpos celulares e terminais de neurônios

sensoriais primários e espinhais (FANG *et al.*, 2007; 2010). São encontrados também em estruturas supra espinhais como na substância cinzenta periaquedutal (PAG), tálamo e hipotálamo. Apesar das evidências indicando a participação destes canais em vias nociceptivas, a literatura que relaciona Cav_v2.3 com os processos dolorosos ainda é muito escassa.

Toxinas extraídas dos venenos de aranhas, cobras e caracóis marinhos vêm sendo amplamente estudadas como possíveis bloqueadores dos CCVD. Como bloqueador farmacológico da corrente do tipo R foi descrito o SNX-482. Este peptídeo formado por 41 aminoácidos é extraído do veneno da tarântula africana *Hysterocrates gigas* (NEWCOMB *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* demonstram que o SNX-482 é altamente seletivo para o canal Cav_v2.3, no entanto, em diferentes concentrações pode sofrer alterações na sua seletividade e bloquear outros canais, assim como ocorre com bloqueadores dos outros CCVD que também possuem sua seletividade alterada de acordo com a variação da sua concentração (NEWCOMB *et al.*, 1998). Além disso, o SNX-482 não é capaz de bloquear todas as correntes do tipo R, restando algumas correntes remanescentes, alguns autores classificam estas correntes em sensíveis e não sensíveis ao SNX-482 (NEWCOMB *et al.*, 2000). Alguns metais, como níquel, zinco e cobre, também são capazes de bloquear o Cav_v2.3, no entanto, fazem isso de uma maneira não seletiva (SCHNEIDER; DIBUÉ; HESCHELER, 2013).

Dois estudos demonstraram que a administração intratecal do SNX-482 reduziu o comportamento nociceptivo na segunda fase do teste da formalina em roedores, um modelo de dor inflamatória onde ocorre sensibilização central (MURAKAMI *et al.*, 2004; TERASHIMA, 2013). Salienta-se ainda que além de reduzir a nocicepção, o SNX-482 atenuou fortemente a internalização do receptor para substância P (NK1) causado pela formalina, sugerindo um papel importante do Cav_v2.3 na liberação de neurotransmissores pré-sinápticos induzida por estímulos nocivos a partir de aferentes primários peptidérgicos. Finalmente, Matthews e colaboradores (2007) utilizando eletrofisiologia *in vivo* evidenciaram que o bloqueio do Cav_v2.3 pelo SNX-482 em um modelo de dor neuropática inibiu as respostas neuronais mediadas por fibras C e Aδ no corno dorsal da medula.

O envolvimento do Cav_v2.3 nas vias nociceptivas foi também investigado em animais com deleção gênica para este canal. Nesses estudos foi possível constatar que animais com deleção gênica para o Cav_v2.3 se mostraram mais resistentes em modelos de dor inflamatória quando comparados aos animais selvagem (SAEGUSA *et al.*, 2000).

Além disso, animais com deleção gênica para o Cav2.3, que receberam morfina por via sistêmica, apresentaram analgesia e uma resistência para a tolerância à morfina (YOKOYAMA *et al.*, 2004). O conjunto de dados, de localização e deleção gênica, indica que o Cav2.3 controla o comportamento de dor por mecanismos espinhais e supra espinhais, tornando-se um possível alvo para o bloqueio da nocicepção. Mesmo que os animais com deleção gênica para o Cav2.3 tenham sido ferramentas importantes para o estudo destes canais, eles possuem limitações, pois esse tipo de deleção sistêmica gera um mecanismo de compensação que apesar de abolir a expressão do Cav2.3 causa um aumento da expressão dos outros CCDV para suprir a ausência do Cav2.3 (WEIERGRÄBER *et al.*, 2005). Desta forma, novas ferramentas para o estudo do Cav2.3. na dor são necessárias.

Uma maneira alternativa de causar a diminuição da expressão do Cav2.3 é através da terapia usando oligonucleotídeos antissensos (ASOs). Os ASOs são formados por uma pequena sequência de nucleotídeos, que interagem com o RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) mensageiro, interferindo assim na tradução de proteínas e conseqüentemente em sua expressão. Uma terapia com ASO foi aprovada recentemente pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para o tratamento da atrofia muscular espinhal (Nuisimersen). Além disso, outros estudos com ASOs encontram-se em fase clínica para o tratamento de doenças neurodegenerativas como doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, entre outras (SCHÖCH; MILLER, 2017). ASOs contra Cav2.3 tem sido utilizado em culturas de células para o estudo da função destes canais *in vitro*, onde o ASO é capaz de reduzir as correntes R sensíveis ou não ao SNX-482 (NEWCOMB *et al.*, 2000). Assim, ASOs contra Cav2.3 poderiam ser importantes ferramentas para o estudo deste canal na dor e para o desenvolvimento de protótipos de fármacos analgésicos. Porém, estudos não clínicos em modelos de dor são necessários para validar seu potencial terapêutico.

Apesar de serem úteis, modelos animais de dor neuropática traumática, por fármacos ou infecciosa submetem grande número de animais de experimentação a dor e desconforto intensos e crônicos (de semanas a meses) que podem ser desnecessários para triagem de novos fármacos. Uma alternativa a estes, é o uso do modelo de hiperalgisia secundária induzida pela capsaicina. A injeção de capsaicina é utilizada em roedores e humanos saudáveis para mimetizar a dor neuropática, porém com uma duração de poucas horas. Inicialmente essa aplicação causa dor ardente e espontânea no local da aplicação mediado pela ativação dos nociceptores aferentes primários. Em contraste a

hiperalgesia secundária observada na pele não tratada adjacente a área de aplicação, reflete a sensibilização central que é importante para a manutenção de dores crônicas, como a dor neuropática (YOU *et al.*, 2014; SCHWARTZ *et al.*, 2009). Devido as vias envolvidas, sintomas apresentados e a segurança do modelo, a injeção intradérmica de capsaicina é considerado um modelo preditivo humano de dor neuropática e é usado para investigar mecanismos centrais e para o teste de possíveis fármacos analgésicos (JOSHI *et al.*, 2006).

Apesar das terapias e estratégias atualmente disponíveis o tratamento de dores neuropáticas ainda são um desafio, pois existe uma diversidade de neuropatias envolvendo mecanismos de ação distintos, as terapias atuais geram diversos efeitos adversos além de muitos pacientes não experimentarem alívio suficiente da dor. Por isso a busca por novos fármacos analgésicos, mais eficazes e seguros fazem-se necessário.

2. HIPÓTESE

A inibição do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo R espinhal é capaz de reduzir a hiperalgesia secundária induzida pela injeção intradérmica de capsaicina.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento do canal de cálcio voltagem dependente $Ca_v2.3$ no modelo de hiperalgesia secundária induzida por capsaicina em camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar o modelo de hiperalgesia secundária induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.
2. Investigar o desenvolvimento de efeitos adversos motores e sensoriais pela administração intratecal das toxinas SNX-482, ω -conotoxina MVIIA e do ASO contra o $Ca_v2.3$ em camundongos.
3. Avaliar o efeito da administração intratecal do SNX-482, da ω -conotoxina MVIIA e do ASO contra o $Ca_v2.3$ no modelo de hiperalgesia secundária induzida por capsaicina em camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados animais *Mus musculus* da linhagem C57Bl/6-UFSC (18-25 g) fêmeas e machos, com seis a oito semanas de idade, sendo estes provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (LAFEX). Os animais foram acondicionados em caixas de acrílico com no máximo seis animais por caixa, sendo mantidos em micro-isoladores, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas e com acesso livre a água e ração.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com considerações éticas para a investigação experimental de dor em animais de acordo com Zimmerman (1983). Todos os procedimentos experimentais realizados no projeto seguiram a diretriz para pesquisa animal ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*, 2010). Alguns procedimentos foram aplicados para maximizar a reprodutibilidade e minimizar vieses experimentais, tais como: cálculo prévio do número de animais por grupos experimentais, cegamento, randomização e definição de critérios de exclusão a priori. Além disto, os experimentos foram realizados forma de blocos (não menos do que dois) em dias diferentes.

O N amostral foi calculado a partir de experimento piloto considerando o valor de limiares obtidos pelo teste do von Frey como desfecho primário. Foi realizado o cálculo utilizando a média do grupo controle para avaliar a reversão da hiperalgesia (30%), a partir do qual foi calculado o tamanho do efeito (1,5). Posteriormente o N amostral foi calculado utilizando o programa *G*Power* 3.1.9.2., onde foram utilizados os parâmetros: nível de significância (5%), poder do teste (95%), teste de hipótese bicaudal, encontrando assim o valor de $N = 8$ animais por grupo.

No início dos experimentos os animais eram numerados e randomizados de forma que, dentro do mesmo microambiente havia animais de todos os grupos experimentais. A alocação randomizada foi feita com auxílio do *website* random.org a partir dos valores dos limiares das medidas iniciais (basais) do desfecho primário, onde os animais eram acondicionados aos grupos experimentais de forma aleatória e homogênea. Além disso, o experimentador não possuía conhecimento de qual grupo de animais estava avaliando nem qual o tratamento foi realizado, devido ao cegamento, que foi realizado por um experimentador diferente do qual realiza as avaliações comportamentais, o qual as identidades só foram reveladas ao fim dos experimentos.

Após mensurado os valores dos limiares de retirada da pata, através do teste de von Frey, estes valores foram analisados para verificar a possível presença de algum valor *outlier* através do *website* graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm. Além da verificação de possíveis outliers, valores basais dos limiares menores que 0,200 g foram considerados como um fator de exclusão.

Este trabalho foi previamente aprovado na Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (PP00872).

4.2. FÁRMACOS E REAGENTES

A capsaicina, utilizada para indução do modelo de hiperalgesia secundária, foi obtida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Uma solução estoque foi preparada a 100 mM, sendo diluída em Tween 20 e etanol e acondicionada no freezer a -20 °C. A solução de trabalho foi preparada a 2 mM imediatamente antes dos experimentos.

O bloqueador farmacológico do CCVD do tipo R SNX-482 foi adquirido da Alomone Labs (Ein Kerem, Jerusalém, Israel). O SNX-482 foi reconstituído em PBS, sendo preparado uma solução estoque a 222,4 µM, esta foi separada em alíquotas de 10 µL. As soluções de trabalho eram diluídas imediatamente antes da realização dos experimentos (TERASHIMA *et al.*, 2013).

A toxina ω-conotoxina MVIIA foi utilizada para o bloqueio do CCVD do tipo N, foi obtida da Tocris Bioscience (Bristol, Inglaterra). A ω-conotoxina MVIIA foi reconstituída em PBS, sendo que a solução estoque foi preparada a 127 µM e as soluções de trabalho foram diluídas imediatamente antes da realização dos experimentos (RIGO *et al.*, 2013)

Para diminuir a expressão do CCVD do tipo R (também chamado de Cav2.3), os animais foram tratados com um oligonucleotídeo antissenso contra o RNAm codificante para esse canal (AS 5'- C*A*T* T*T*C* A*A*C* A*C*C* C*A*C* G*T*G -3') ou com um oligonucleotídeo controle (MM 5'- C*G*T* G*G*G* T*G*T* T*G*A* A*A*T* G -3'), que foram obtidos da Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) (PIEDRAS-RENTERIA; TSIEN, 1998). Com enfoque em aumentar a permeação e a estabilidade o oligonucleotídeo antissenso e seu controle passaram por um processo de dessanilização para retirar contaminantes orgânicos provenientes do processo de síntese e possui ligações nas bases com fosforotioato para aumentar sua estabilidade.

O ASO foi reconstituído em solução salina estéril (NaCl 0,9%) a 500 μ M, sendo preparadas alíquotas de 20 μ L. Estas foram acondicionadas no freezer a -20 °C.

Para realização de qPCR, foram utilizados iniciadores para o Cav2.3 e para os controlos β -actina e hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPRT). Estes foram obtidos da Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA).

Tabela 2 - Sequência de senso utilizados para os experimentos com o Cav2.3.

Alvo	Sequência senso	Sequência antissenso
Cav2.3	5'CCTGAGTGGTCGG AGTGGATA3'	5'CATCCGCTGGGTC CATACA3'
HPRT	5'GCAGACTTTGCTT TCCTTGG3'	5'TACTGGCCACATC AACAGGA3'
β-actina	5'CATTGCTGACAGG ATGCAGAAGG3'	5'TGCTGGAAGGTGG ACAGTGAGG3'

4.3. MODELO DE HIPERLAGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA

O modelo de hiperalgesia secundária foi induzido pela injeção de capsaicina (20 nmol/10 μ L) na região plantar da pata direita traseira de camundongos C57Bl/6 (LAIRD *et al.*, 2001). Imediatamente após a injeção de capsaicina intraplantar (i.pl.) ou do seu veículo (solução fisiológica NaCl 0,9%) foram realizadas avaliações referentes a nociceção espontânea. Além disto, a mensuração da hiperalgesia secundária foi realizada através do teste de von Frey, onde os filamentos de von Frey foram aplicados na área adjacente ao local primário da injeção. A sensibilidade térmica ao calor radiante foi avaliada para caracterização do modelo. Estas avaliações foram realizadas de 15 minutos a oito horas após injeção intraplantar de capsaicina ou veículo (SCHWARTZ *et al.*, 2009; SLUKA, 1997).

Os tratamentos com ω -conotoxina MVIIA (1, 3, 10 e 30 pmol/sítio) e SNX-482 (30, 100 e 300 pmol/sítio) foram feitos por administração via intratecal (i.t.), dez minutos antes da injeção de capsaicina (pré-tratamento) ou 60 minutos após a injeção de capsaicina (pós-tratamento) (TERASHIMA *et al.*, 2013, RIGO *et al.*, 2013).

O tratamento com antissenso ou controle (2,5 pmol/sítio) via intratecal foi feito antes da injeção de capsaicina sendo administrado de 12 em 12 horas, por três dias (última administração 12 horas antes da capsaicina) (ANDRADE *et al.*, 2008).

4.4. AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

4.4.1. AVALIAÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS SENSORIAIS E MOTORES

Antes da indução do modelo, as funções sensoriais e motoras foram cuidadosamente avaliadas após a administração intratecal dos bloqueadores de CCVD e do oligonucleotídeo antissenso, as avaliações foram realizadas de 30 a 60 minutos após as administrações intratecais. As avaliações incluem verificação da presença de tremores, serpentear de calda e comportamento de irritabilidade evocado pelo toque suave no flanco com um pincel (TERASHIMA *et al.*, 2013). Foram analisados o comportamento de resposta frente ao estímulo sonoro de estalo e a resposta de retirada ao pinçar da pata. A função motora foi avaliada pela elevação da pata no reflexo de pisada causada pelo estiramento do dorso da pata traseira e pelo reflexo de endireitamento onde o animal é colocado de costas na bancada e tende a retornar à posição normal com o dorso voltado para cima. A catalepsia foi mensurada colocando-se a pata dianteira em uma barra horizontal, imobilidade na barra por 30 segundos foi considerada como presença de catalepsia. Os dados foram expressos como número de animais que apresentaram comportamento, efeitos e funções anormais pelo número total de animais avaliados (MALMBERG; YAKSH, 1994).

4.4.2. AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO ESPONTÂNEA

Imediatamente após a injeção de capsaicina intraplantar, os camundongos foram acomodados em plataformas de acrílico e o tempo total que cada animal passou lambendo, chacoalhando e mordendo a pata injetada foram cronometrados por cinco minutos, sendo este um indicativo de nocicepção espontânea. Os dados foram expressos como somatório do tempo de resposta durante os cinco minutos avaliados (CHEN *et al.*, 2007).

4.4.3. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE TÉRMICA AO CALOR PELO TESTE DE HARGREAVES

A avaliação da sensibilidade térmica ao calor foi realizada através do teste de Hargreaves, conforme previamente descrito na literatura (HARGREAVES *et al.*, 1988), considerando algumas modificações. O teste de Hargreaves consistiu na estimulação da região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) dos animais com uma fonte radiante de luz infravermelha (calor) através de uma plataforma com cobertura de vidro acrílico. Os animais foram contidos pela mão do experimentador e a fonte radiante (Ugo Basile®) posicionada logo abaixo da pata ipsilateral e, quando o animal estava imóvel, a fonte foi ligada e a latência em segundos (s) para que o animal elevasse, chacoalhasse ou retirasse a pata da direção da fonte de calor foi automaticamente registrada pelo aparelho. Um limite de 20 segundos de estimulação foi estabelecido para evitar danos teciduais nas patas dos animais. Os animais passaram por uma sessão de aclimatização, com uma hora de duração, com as mesmas condições experimentais, para minimizar os níveis de estresse no momento do teste.

4.4.4. AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA PELO TESTE DE VON FREY

A hiperalgesia secundária foi avaliada pelo teste de von Frey segundo Chaplan e colaboradores (1994), utilizando a técnica de “up-and-down” com o uso de filamentos de von Frey. Os filamentos de von Frey de carga de 0,008 g a 4,0 g foram aplicados na superfície plantar da pata dos animais com aumento ou diminuição da carga dos filamentos, de acordo com a resposta dos animais, para determinar o filamento de retirada da pata. De acordo com o perfil de resposta e na força do último filamento, foi calculado o limiar de 50% de retirada da pata de cada animal em gramas (DIXON, 1980). De acordo com o perfil de resposta foi utilizado à convenção de X= retirada da pata e 0= ausência de resposta e o limiar de 50% de retirada da pata foi realizado através da fórmula:

$$\text{Limiar de retirada de pata 50\% (g)} = 10^{X_f + K\delta}$$

X_f = log do último filamento de von Frey utilizado;

K = valor tabelado para o perfil de respostas apresentado;

δ = diferença média entre os estímulos em unidades logarítmicas.

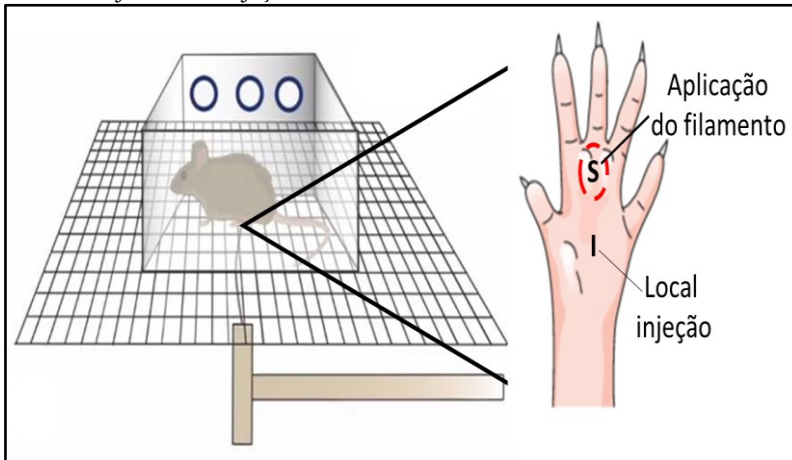
O teste foi realizado em uma plataforma de arame, onde os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita de acrílico e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma.

Os animais passaram por um processo de ambientação, onde foram colocados nas plataformas de acrílico um dia antes do procedimento para reconhecimento do local.

Os filamentos foram aplicados nas patas traseiras direitas, na região adjacente a área de aplicação da capsaicina, demonstrado na figura 3. A pressão aplicada sob os filamentos foi a suficiente para proporcionar a curvatura dos filamentos.

Para este parâmetro foi feita uma medida inicial, antes da indução do modelo (chamado de basal), no dia 0 e posteriormente foram avaliados vários tempos após a indução da hiperalgesia secundária pela capsaicina.

Figura 4 - Desenho ilustrativo do local da injeção de capsaicina i. pl. e da aplicação dos filamentos de von Frey para avaliação da hiperalgesia secundária nas áreas adjacentes à injeção.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2018.

4.5. REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

4.5.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Amostras biológicas de medula e GRD referentes ao experimento de silenciamento utilizando sequência antissenso foram coletadas, colocadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após retirada do freezer -80 °C em banho de gelo, adicionou-se as amostras 1 ml do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad) e as amostras foram mantidas por cinco minutos a temperatura ambiente antes da extração de RNA total. Em seguida, 200 µl de clorofórmio 98 % (Merck, Darmstadt) foram adicionados às amostras, as quais foram homogeneizadas por inversão por 15 segundos, mantidas a temperatura ambiente por dois minutos e, então, centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 400 µL de etanol 70%, o sedimento contendo o RNA total foi homogeneizado por inversão. Posteriormente foi utilizado kit de extração PureLink® (Invitrogen, Carlsbad) para purificação das amostras.

As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza avaliadas em um espectrofotômetro SpecterPhotometer (NanoDrop ND-1000), observando-se as relações de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm. A fim de eliminar qualquer DNA contaminante inadvertidamente purificado durante o processo de extração de RNA, as amostras de RNA (300 ng, conforme a concentração inicial disponível) foram submetidas a tratamento com DNase I (Invitrogen, Carlsbad), na razão de 1 unidade por µg de RNA extraído. A reação foi realizada durante 15 minutos a 37 °C, na presença de tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da enzima ocorreu com a adição de EDTA na concentração final de 2,5 mM e aquecimento a 65 °C por 5 min.

4.5.2. REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

A partir das amostras tratadas com DNaseI, 300 ng de RNA (conforme concentração inicial disponível) foram realizadas as reações de transcrição reversa. A reação foi realizada segundo o kit High-Capacity cDNA (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante. A reação ocorreu a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos. O DNA complementar (cDNA) obtido foi armazenado a -20 °C.

4.5.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

Para utilização como molde na qPCR, o cDNA foi diluído dez vezes em água ultrapura livre de nucleases. As reações ocorreram na presença do reagente *Maxima*® *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*

(Thermo Scientific), de acordo com as orientações do fabricante, e $0,3\mu\text{M}$ dos iniciadores de cada par descrito na tabela 2, sendo montadas em placas de 96 poços A-B-C (Axygen, Union City), em volume final de $10\ \mu\text{l}$. As placas, cobertas por selante óptico *MicroAmp*[®] *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) foram analisadas em equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) do Laboratório de Imunologia (LIDI-UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a $95\ ^\circ\text{C}$ por 10 min, seguida por 40 ciclos contendo uma etapa de desnaturação ($95\ ^\circ\text{C}$ por 15 segundos) e uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão ($60\ ^\circ\text{C}$ por um minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação ($95\ ^\circ\text{C}$ por 15 segundos, $60\ ^\circ\text{C}$ por 15 segundos e, novamente, $95\ ^\circ\text{C}$ por 15 segundos). Em cada placa adicionou-se um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde.

4.5.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados utilizando-se amostras biológicas de 5 animais por grupo (antissenso e controle), sendo os resultados posteriormente analisados pelo software StepOne Software 2.3 (Applied Biosystems, Carlsbad). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as amostras analisadas, utilizou-se o método da quantificação relativa (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001), comparando o C_q apresentado para o gene alvo à média dos C_q de dois genes de referência (HPRT e β -actina).

Os cálculos necessários para obtenção dos valores de abundância relativa foram realizados em planilha do Excel (Microsoft Office) através das seguintes equações:

$$\begin{aligned}\Delta C_q &= C_q (\text{gene alvo}) - C_q (\text{gene referência}) \\ \Delta\Delta C_q &= \Delta C_q (\text{amostra}) - \Delta C_q (\text{calibrador}) \\ QR &= 2^{-\Delta\Delta C_q}\end{aligned}$$

Onde o calibrador é a amostra a partir da qual as demais serão comparadas e QR é o valor de quantificação relativa. O valor de QR médio do calibrador é sempre próximo a 1.

As análises estatísticas, bem como a produção dos gráficos, foram realizadas no programa Prism 6.0 (GraphPad). Foram utilizados testes

estatísticos t de Student não-pareado. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4.6. VERIFICAÇÃO CICLO ESTRAL

A verificação do ciclo estral foi realizada a partir de lavados vaginais, onde uma ponteira contendo 10 μ L de NaCl 0,9% foi cuidadosamente introduzida no canal vaginal das fêmeas para que não houvesse estimulação de cérvix uterina e não ocorresse estresses pelo procedimento. Em seguida o lavado vaginal foi depositado em lâmina de vidro para visualização da morfologia em microscopia óptica em objetiva de 10 vezes. Foram considerados três tipos celulares: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos (MARCONDES *et. al.*, 2002). De acordo com a predominância destas células foi feita a classificação nos ciclos:

- Proestro: predominância de células epiteliais nucleadas e arredondadas;

- Estro: predominância de células anucleadas e irregulares;

- Metaestro: proporção similar dos tipos celulares;

- Diestro: Predominância de leucócitos e muco.

O presente estudo não teve o intuito de investigar os efeitos de cada fase do ciclo estral no processo nociceptivo, foi realizado apenas para controle dos grupos experimentais e para a padronização do modelo.

4.7. DESTINO DOS ANIMAIS

Ao final dos experimentos os animais foram encaminhados ao biotério setorial do Departamento de Farmacologia onde foi realizada a ortotanásia em câmara de CO₂. Alternativamente, quando este processo não foi possível, os animais foram submetidos à ortotanásia pelo método de deslocamento cervical (CONCEA, 2013).

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 8 animais por grupo experimental (conforme presença de *outliers*), conforme indicado na legenda das figuras. O teste de Grubbs foi utilizado para a verificação da existência de valores *outliers* entre os dados, e os valores identificados como tal foram excluídos das análises estatísticas. O teste de Grubbs foi realizado em uma plataforma virtual disponível *online* (<https://graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>). As

análises estatísticas foram realizadas por meio das análises de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com ou sem medidas repetidas, seguidas pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, ou ainda, pelo teste t de Student, conforme o necessário. O nível de diferença estatística foi considerado significativo quando os valores de P encontrados foram menores que 0,05 ($P < 0.05$). Os dados obtidos nos experimentos realizados para avaliar a hiperalgesia pelo teste de von Frey, foram transformados e expressos como logaritmo de base 10, com o intuito de atender aos critérios para realização de análise estatística paramétrica. As análises dos dados, assim como a confecção dos gráficos, foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 6® (La Jolla, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA

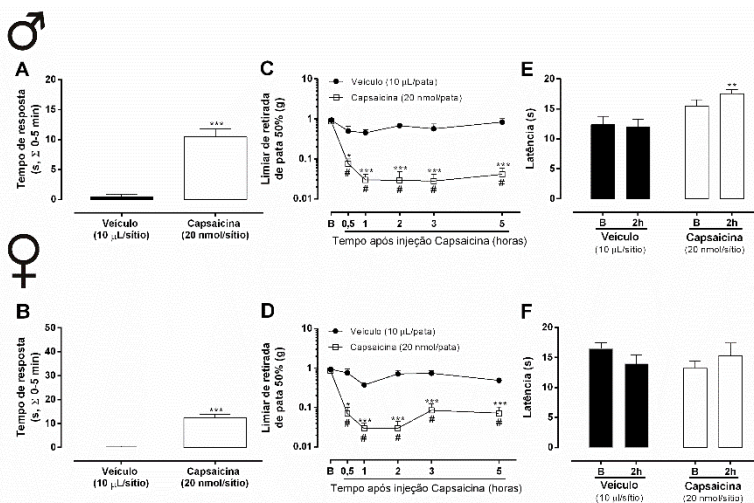
A injeção subcutânea na pata traseira direita dos animais com capsaicina (20 nmol/pata) promoveu, de forma significativa, uma elevação do tempo de nocicepção espontânea quando comparados ao grupo veículo, de maneira similar em machos e em fêmeas (Figura 5, painéis A e B, respectivamente). A reposta foi avaliada nos primeiros cinco minutos após a administração de capsaicina. Na estratificação do tempo por minuto percebe-se que a resposta demonstrou ser mais acentuada no primeiro minuto após a injeção intraplantar (i.pl.) com a capsaicina (dados não mostrados).

Comparados ao grupo veículo e aos valores basais foi possível observar que a injeção i.pl. de capsaicina gerou uma redução rápida no limiar de retirada de pata 50% (g), sendo o local de aplicação dos filamentos de von Frey adjacentes ao local da injeção com capsaicina, sendo assim caracterizada como hiperalgesia secundária. A partir de meia hora após a injeção i.pl. já houve hiperalgesia significativa, onde o máximo da resposta hiperalgésica foi observado a partir de uma hora após a injeção (queda do limiar de $78 \pm 4\%$ e $77 \pm 4\%$ para machos e fêmeas, respectivamente). O efeito hiperalgésico perdurou por até cinco horas após a injeção i.pl. de capsaicina quando comparados ao grupo veículo e aos valores basais, sendo que foram encontradas respostas com padrões semelhantes entre machos e fêmeas (Figura 5, painéis C e D, respectivamente).

Em relação à estimulação térmica ao calor, nos machos foi possível visualizar um aumento no tempo de latência (hipoalgesia) duas horas após a injeção i.pl. de capsaicina quando comparado aos valores do grupo veículo no mesmo tempo (Figura 5, painel E). Nas fêmeas (Figura 5, painel F) não foi observada alteração na latência frente a estimulação térmica ao calor quando comparado aos valores do grupo veículo.

Nesse bloco de experimentos a injeção i.pl. de capsaicina (20 nmol/pata) induziu o aumento da nocicepção espontânea, gerou hiperalgesia secundária, no qual o padrão de respostas expressou ser similar entre machos e fêmeas. A estimulação térmica ao calor gerou uma hipoalgesia nos machos e não causou alteração nas fêmeas. Nos experimentos seguintes foram mantidas as avaliações de nocicepção espontânea e hiperalgesia secundária, mas em relação ao parâmetro de estimulação térmica ao calor não foram realizadas novas avaliações.

Figura 5 - Caracterização do modelo de hiperalgesia secundária induzida por administração intraplantar na pata traseira direita de capsaicina (20 nmol/sítio), em camundongos machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F). A e B - Avaliação frente a nocicepção espontânea após administração de capsaicina (20 nmol/sítio, i.pl.) (Somatório do tempo de resposta após estimulação plantar com capsaicina, (0-5 min)). C e D - Decurso temporal do efeito da administração de capsaicina (20 nmol/sítio, i.pl.) sobre a hiperalgesia secundária (Limiar de retirada de pata 50% (g)). E e F - Efeito da administração de capsaicina (20 nmol/sítio, i.pl.) sobre a estimulação térmica ao calor (Latência para retirada de pata (s) avaliada pelo teste de Hargreaves, frente a estimulação plantar com calor radiante). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n= 8/grupo) sendo realizados 2-3 blocos de experimentos independentes, sendo A e B analisados pelo teste t de student não pareado, C, D, E e F analisados pela ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguidas do teste *post-hoc* de Bonferroni (#), (*), (**), e (***) Representam diferenças significativas (P<0,05) quando comparados aos valores das medidas basais, (P<0,05), (P<0,01), (P<0,001) quando comparados aos valores do grupo veículo, respectivamente. (B) – Basal. O teste de Grubbs foi utilizado para detectar possíveis *outliers* e não foram encontrados *outliers*.



5.2. AVALIAÇÕES DE TOXICIDADE

Antes de identificar possíveis efeitos antinociceptivos, foram realizadas avaliações de efeitos adversos sensoriais e motores imediatamente (e até 60 minutos após) a administração intratecal de

bloqueadores de canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD) tipo N (ω -conotoxina MVIIA) ou R (SNX-482) em camundongos não injetados com capsaicina.

Referente a ω -conotoxina MVIIA (30, 10, 3 e 1 pmol/sítio), foi observado que as doses mais elevadas (30 e 10 pmol/sítio) foram capazes de causar serpenteado de cauda e tremores além reduzir o reflexo de pinçar da pata. Mesmo em doses altas, a ω -conotoxina MVIIA não causou irritabilidade ou alterações nos reflexos de estalo ou pisada. A dose de 3 pmol/sítio de ω -conotoxina MVIIA provocou o aparecimento de irritabilidade em alguns animais, mas este não foi significativo. Assim, as doses menores de ω -conotoxina MVIIA (3 e 1 pmol/sítio) não causaram alterações significativas dos efeitos adversos mensurados (Tabela 3). Na avaliação da resposta frente a estimulação com filamentos de von Frey, nenhuma das doses testadas alterou os limiares de retirada *per se* (Log dos limiares de $0,1 \pm 0,1$; $-0,2 \pm 0,2$; $-0,3 \pm 0,2$; $-0,2 \pm 0,1$ e $-0,1 \pm 0,02$ para as doses de 30, 10, 3 e 1 pmol/sítio e veículo 60 min após a administração). Na estimulação frente ao calor radiante, também se constatou que não houve modificação na latência frente ao estímulo térmico em nenhuma das doses utilizadas (latência de 14 ± 3 ; 10 ± 1 ; 9 ± 1 ; 9 ± 1 e 15 ± 1 segundos para as doses de 30, 10, 3 e 1 pmol/sítio e veículo 60 min após administração). Assim, somente as doses elevadas de ω -conotoxina MVIIA (10 e 30 pmol/sítio) foram capazes de gerar efeitos adversos nas fêmeas.

Tabela 3 - Efeitos adversos em camundongos fêmeas tratados com doses de ω -conotoxina MVIIA (1, 3, 10 e 30 pmol/sítio, i.t.), sem injeção de capsaicina. Dados expressos como presença ou ausência de reflexo.

Substância	Dose (pmol/sítio)	n	Ausência do reflexo			Presença de resposta		
			Estalo	Pinçar da pata	Pisada	Serpentear de cauda	Tremores	Irritabilidade
PBS	0	7	1/7	0/7	1/7	0/7	0/7	1/7
MVIIA	30	4	2/4	3/4*	2/4	2/4*	4/4*	0/4
	10	4	0/4	3/4*	1/4	1/4	1/4	0/4
	3	7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7	4/7
	1	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Experimento realizado em fêmeas, com dados expressos como número de animais afetados pelo número total de animais avaliados. (*) representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo PBS, analisados pelo teste de chi-quadrado.

Também foram analisados efeitos adversos em camundongos tratados por via intratecal com SNX-482 (30-300 pmol/sítio, i.t.) sem

injeção de capsaicina na pata. Nas doses testadas a administração intratecal com SNX-482 não apresentou alterações estatisticamente diferentes (em comparação ao veículo) frente as avaliações de serpenteado, tremores e irritabilidade ou dos reflexos de estalo, pisada e pinçar da pata nem para machos, nem para fêmeas (Tabela 4).

Na mensuração de limiar mecânico uma hora após a administração intratecal de SNX-482 na dose mais elevada (300 pmol) não houve o surgimento de hiperalgesia (Log dos limiares de $-0,3 \pm 0,1$ e $-0,4 \pm 0,1$ para SNX-482 e seu veículo, para fêmeas). As menores doses de SNX-482 (100 e 30 pmol/sítio) nas fêmeas também não geraram modificações nos limiares mecânicos quando comparados ao grupo veículo (dados não mostrados).

Não foi possível averiguar mudança significativa na latência térmica frente ao calor radiante na região plantar após a administração intratecal com SNX-482 na dose mais elevada ($15 \pm 0,2$ e 15 ± 1 segundos para SNX e veículo ou $12 \pm 0,6$ e 15 ± 3 segundos para SNX e veículo, em machos ou fêmeas, respectivamente). As menores doses de SNX-482 foram avaliadas somente em fêmeas e não causaram modificações na latência térmica frente ao calor quando comparadas ao grupo veículo (Dados não mostrados).

Tabela 4 - Efeitos adversos em machos e fêmeas tratados com SNX-482, sem injeção de capsaicina. Dados expressos como presença ou ausência de reflexo.

	Substância	Dose (pmol/sítio)	n	Ausência do reflexo			Presença de resposta		
				Estalo	Pinçar da pata	Pisada	Serpentear de cauda	Tremores	Irritabilidade
♀	PBS	0	7	1/7	0/7	1/7	0/7	0/7	1/7
	SNX-482	300	6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	2/6
		100	4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		30	4	0/4	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4
♂	PBS	0	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	SNX-482	300	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Experimento realizado em fêmeas e machos, com dados expressos como número de animais afetados pelo número total de animais avaliados. (*) representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo PBS, analisados pelo teste de chi-quadrado.

Além dos parâmetros mencionados anteriormente, foram realizadas avaliações relacionadas ao efeito adverso de catalepsia, reflexo de endireitamento e avaliação térmica ao frio frente a estimulação com acetona. Machos e fêmeas não apresentaram nenhuma alteração nestes

parâmetros, em nenhuma das doses utilizadas para ω -conotoxina MVIIA ou SNX-482 (Dados não mostrados).

5.3. EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO TIPO R E N NA HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA

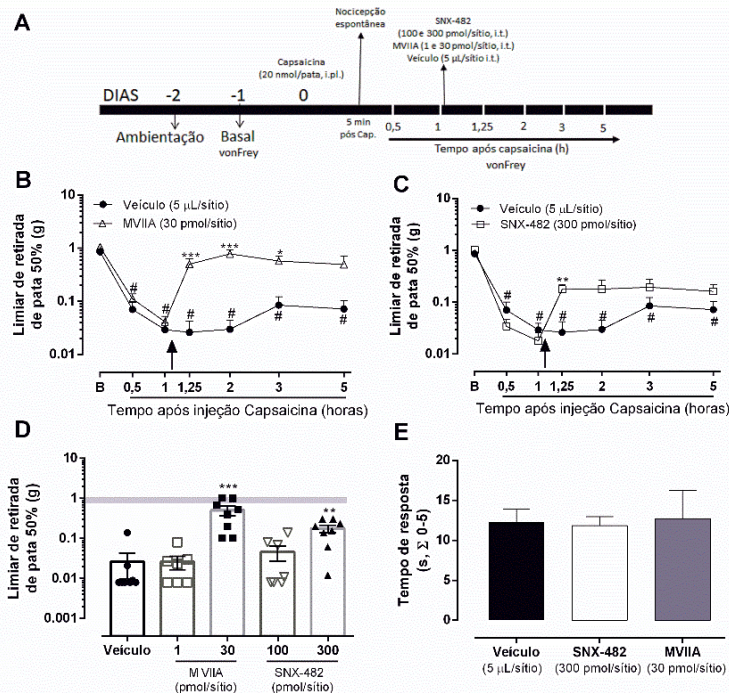
Para verificar o papel de CCVD em um processo hiperalgésico já estabelecido, foi realizado pós-tratamento com SNX-482 ou ω -conotoxina MVIIA, uma hora após a injeção i.pl. de capsaicina em camundongos machos e fêmeas. A capsaicina causou nocicepção espontânea e hiperalgisia secundária (Figura 6) de mesma intensidade em todos os grupos de animais que posteriormente receberam administração dos bloqueadores.

No decurso temporal do pós-tratamento com uma alta dose de ω -conotoxina MVIIA (30 pmol/sítio, i.t.) em fêmeas, foi possível observar uma reversão da hiperalgisia secundária nos primeiros 15 minutos após o tratamento com ω -conotoxina MVIIA, sendo que esta reversão perdurou significativamente por até duas horas após a administração (Figura 6, painel B).

O decurso temporal do pós-tratamento com uma dose alta de SNX-482 (300 pmol/sítio, i.t.) em fêmeas demonstrou que houve uma reversão da hiperalgisia nos primeiros 15 minutos após o tratamento com SNX-482. Contudo, o pós-tratamento com SNX-482, não foi eficaz em gerar uma reversão significativa da hiperalgisia que perdurasse de uma a quatro horas após administração do SNX-482 (Figura 6, painel C).

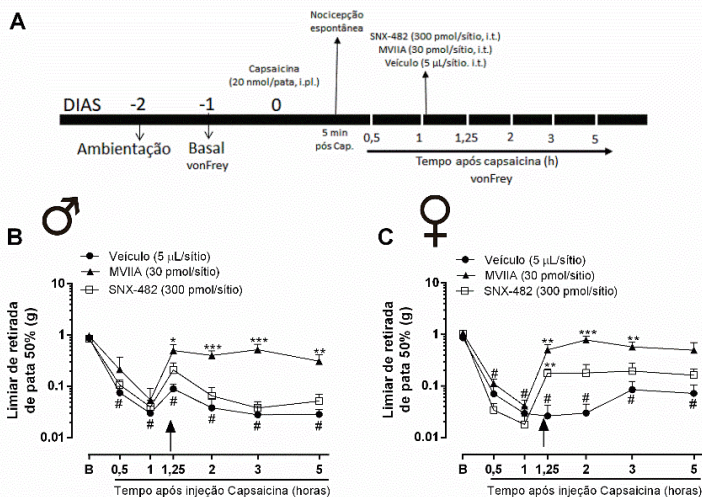
Diferente das altas doses, foi possível constatar que as menores doses de SNX-482 (100 pmol/sítio, i. t.) e ω -conotoxina MVIIA (1 pmol/sítio, i. t.) não conseguiram alterar a hiperalgisia secundária induzida pela injeção i. pl. de capsaicina em fêmeas quando comparados ao grupo veículo (Figura 6, painel D). A dose mais elevada de SNX-482 foi capaz de reverter a hiperalgisia em $53 \pm 7\%$ nos 15 minutos após o tratamento. Já a dose mais elevada de ω -conotoxina MVIIA foi capaz de reverter a hiperalgisia em $82 \pm 11\%$ nos 15 minutos após a sua administração.

Figura 6 - Efeito antinociceptivo da administração intratecal (i.t.) do SNX-482 no modelo de hiperalgisia secundária mediada pela administração subcutânea de capsaicina (20 nmol/sítio) de camundongos fêmeas. A – Protocolo experimental utilizado para pós tratamento com SNX-482 e MVIIA). B e C - Decurso temporal do pós-tratamento com MVIIA (B) ou SNX-482 (C) na hiperalgisia secundária induzida por capsaicina. D - Curva dose-resposta do efeito do SNX-482 e da MVIIA 15 minutos após administração i.t. E - Nociceção espontânea induzida por capsaicina antes da administração do SNX-482 e da MVIIA. Dados representados como média \pm E. P. M. (n= 8 por grupo), 2-3 blocos independentes por experimento. B e C analisados pela ANOVA duas vias com medidas repetidas seguidas pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, D e E analisado pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni e Dunnett, respectivamente. (#), (*), (**), e (***) Representam diferenças significativas ($P < 0,05$) quando comparados aos valores das medidas basais, ($P < 0,05$), ($P < 0,01$), ($P < 0,001$) quando comparados aos valores do grupo veículo, respectivamente. (B) – Basal. A barra horizontal cinza no gráfico D representa os valores basais. A flecha indica o momento da administração intratecal dos bloqueadores. O teste de Grubbs foi utilizado para detectar possíveis *outliers*, no qual foi excluído um animal do grupo veículo (C e D), um do grupo SNX-482 (100 pmol/sítio) e um do grupo MVIIA (1 pmol/sítio) (D).



Posteriormente comparamos as respostas anti-hiperalgésicas dos bloqueadores de CCVD entre fêmeas e machos. A administração de ω -conotoxina MVIIA reverteu a hiperalgesia secundária em machos com eficácia similar ao observado em fêmeas (Figura 7, painéis B e C, respectivamente). Por outro lado, o pós-tratamento com SNX-482 não foi capaz de reverter a hiperalgesia secundária após injeção de capsaicina em machos. (Figura 7, painéis B e C, respectivamente). Estes dados demonstram que o efeito anti-hiperalgésico do bloqueio de CCVD tipo R é susceptível à divergência sexual. Desta forma, os próximos experimentos com bloqueadores de CCVD foram feitos somente em fêmeas.

Figura 7 - Efeito por sexo, do pós-tratamento com bloqueadores de CCVD tipo R (SNX-482 300 pmol/sítio, i.t.) e N (MVIIA – 30 pmol/sítio, i.t.) na nocicepção induzida pela administração subcutânea de capsaicina (20 nmol/sítio) na região plantar da pata direita traseira de camundongos machos (B) e fêmeas (C). A – Protocolo experimental utilizado para o pós-tratamento com SNX-482 e MVIIA. B e C – Decurso temporal do efeito do pós-tratamento com os bloqueadores SNX-482 e MVIIA na hiperalgesia secundária. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n=8$ /grupo) sendo realizados 2-3 blocos de experimentos independentes, sendo os dados analisados pela ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. (#), (*), (**), (***) Representam diferenças significativas ($P<0,05$) quando comparados aos valores das medidas basais, ($P<0,05$), ($P<0,01$), ($P<0,001$) quando comparados aos valores do grupo veículo, respectivamente. (B) – Basal. O teste de Grubbs foi utilizado para detectar possíveis *outliers*, no qual foram excluídos dois animais, um do grupo veículo e um do grupo MVIIA (30 pmol) (B).



5.4. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO TIPO R E N NA HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA

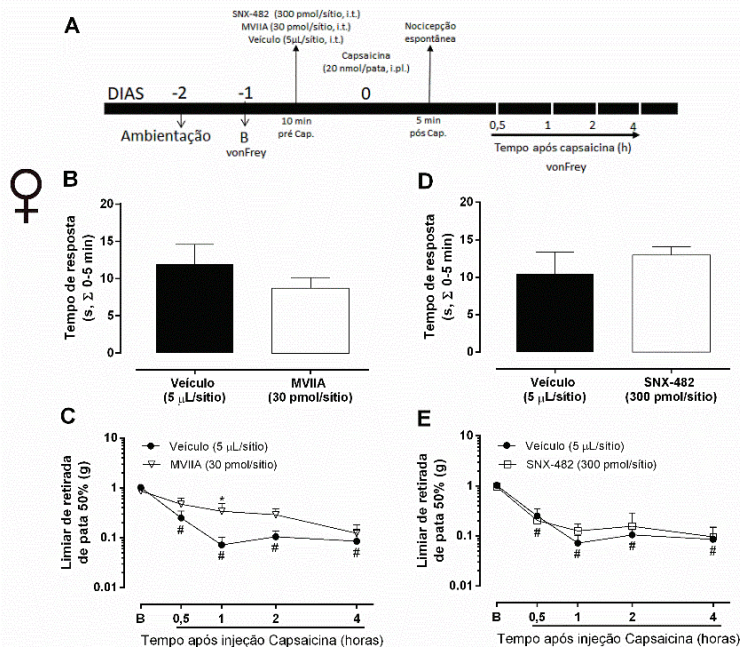
Para verificar o papel CCVD na prevenção de um processo hiperalgésico foi realizado um pré-tratamento com os bloqueadores 10 minutos antes da injeção i. pl. de capsaicina em camundongos fêmeas. O tratamento com bloqueador de CCVD do tipo N (MVIIA 30 pmol/sítio,

i.t.) ou R (SNX-482 300 pmol/sítio, i.t.) antes da injeção de capsaicina, não alterou de forma relevante a nocicepção espontânea, onde o tempo de resposta nos cinco minutos após injeção de capsaicina foi similar à do grupo veículo (Figura 8, painel B e D).

O pré-tratamento com MVIIA (30 pmol/sítio, i.t.) foi capaz de prevenir significativamente a hiperalgesia secundária apenas uma hora após a injeção de capsaicina, mas não alterou de forma significativa a hiperalgesia nos demais tempos avaliados (Figura 8, painel C).

No decurso temporal foi possível constatar que o pré-tratamento com SNX-482 (300 pmol/sítio, i.t.) não ocasionou nenhuma modificação na resposta nociceptiva causada após a injeção i. pl. de capsaicina. A hiperalgesia se manteve presente por até quatro horas após a injeção i. pl. de capsaicina e ocorreu de forma equivalente no grupo tratado com SNX-482 e no grupo veículo (Figura 8, painel E).

Figura 8 - Efeito do pré-tratamento com bloqueadores de CCVD tipo N (MVIIA - 30 pmol/sítio, i.t.) (B e C) e R (SNX-482 - 300 pmol/sítio, i.t.) (D e E), na nociceção induzida pela administração subcutânea de capsaicina (20 nmol/sítio) na região plantar da pata direita traseira de camundongos fêmeas. A - Protocolo experimental utilizado para o pré tratamento com MVIIA e SNX-482. B e D - Avaliação da nociceção espontânea induzida por capsaicina, após administração da MVIIA e do SNX-482 (Somatório do tempo de resposta após estimulação plantar com capsaicina, (0-5 min)). C e E - Decurso temporal do pré-tratamento com os bloqueadores MVIIA e SNX-482 na hiperalgesia secundária (Limiar de retirada de pata 50% (g). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n= 8/grupo) sendo realizados 2-3 blocos de experimentos independentes, sendo B e D analisados pelo teste t de student e C e E analisados pela ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguidas do teste *post-hoc* de Bonferroni. (#) e (*) Representam diferenças significativas ($P < 0,05$) quando comparados aos valores das medidas basais e quando comparados aos valores do grupo veículo, respectivamente. (B) - Basal. O teste de Grubbs foi utilizado para detectar possíveis *outliers*, não foram encontrados *outliers*.



5.5. EFEITO DO TRATAMENTO COM OLIGONUCLEOTÍDEO ANTISSENSO CONTRA CANAIS DE CÁLCIO TIPO R NA HIPERALGESIA SECUNDÁRIA INDUZIDA POR CAPSAICINA

Primeiramente foi realizada uma padronização do tratamento com ASO contra CCVD tipo R, via i.t., 2,5 nmol/sítio, duas vezes ao dia, por três dias, sendo utilizado como controle uma sequência não complementar (2,5 nmol/sítio, i.t., duas vezes ao dia, por três dias). Antes de identificar possíveis efeitos antinociceptivos, foram realizadas avaliações de efeitos adversos sensoriais e motores imediatamente (e até 60 minutos após) a administração intratecal do ASO contra o CCVD tipo R em camundongos não injetados com capsaicina.

O tratamento com ASO contra CCVD tipo R não gerou o aparecimento de serpentear de cauda, tremores e irritabilidade em nenhum dos animais avaliados. Não ocorreram modificações nos reflexos de pisada e estalo, no entanto alguns animais apresentaram diminuição do reflexo de pinçar da pata, mas este não foi significativo (Tabela 5). Não foi observado presença de catalepsia e de alterações relacionadas ao reflexo de endireitamento (Dados não mostrados).

Tabela 5 - Efeitos adversos em fêmeas tratados com ASO contra CCVD tipo R (2,5 nmol/sítio, i.t., duas vezes ao dia, por três dias), sem injeção de capsaicina. Dados expressos como presença ou ausência de reflexo.

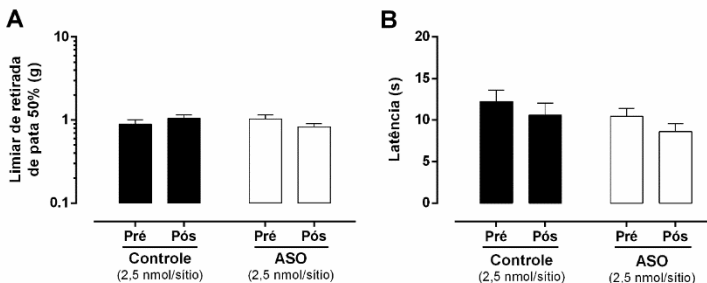
Substância	Dose (nmol/sítio)	n	Ausência do reflexo			Presença de resposta		
			Estalo	Pinçar da pata	Pisada	Serpentear de cauda	Tremores	Irritabilidade
Controle	2,5	8	0/8	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Antissenso	2,5	8	0/8	3/8	0/8	0/8	0/8	0/8

Dados expressos como número de animais afetados pelo número total de animais avaliados. (*) representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, analisados pelo teste de chi-quadrado.

O tratamento com ASO não foi capaz de modificar a nocicepção mecânica dos animais não injetados com capsaicina. O limiar de retirada de pata 50% (g) antes (pré) e após (pós) o tratamento com antissenso permaneceram semelhantes ($1,0 \pm 0,12$ e $0,8 \pm 0,07$ pré e pós, respectivamente). Também não ocorreram variações quando comparados o grupo ASO ao grupo controle ($0,8 \pm 0,12$ e $1,0 \pm 0,11$ pré e pós, respectivamente) (Figura 9, painel A). O tratamento com ASO também não causou modificações na latência frente a estimulação plantar por calor radiante. Em relação ao grupo controle também não houve alterações

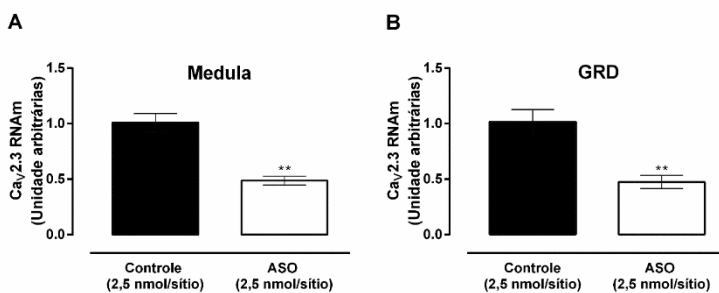
térmicas quando comparamos a latência antes e após o tratamento (Figura 9, painel B).

Figura 9 - Efeito do tratamento com controle (Mismatch) e do antissense (ASO) contra o CCVD tipo R (2,5 nmol/sítio 2x ao dia por 3 dias, i.t.) em camundongos fêmeas, antes da indução do modelo de hiperalgesia secundária. A - Avaliação da nocicepção mecânica frente ao tratamento com MM e o AS. B - Avaliação da estimulação térmica ao calor frente ao tratamento com Mismatch e o ASO. Dados representados como média \pm E. P. M. (grupo Mismatch n= 9, grupo ASO n= 10), 2-3 blocos independentes por experimento, analisados pela ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Foi utilizado teste de Grubbs para detecção de possíveis *outliers*, mas não foram encontrados.



Para confirmar molecularmente os nossos dados referentes ao silenciamento utilizando ASO contra o Cav2.3 foi realizada a quantificação dos níveis de RNAm para o Cav2.3 após o tratamento com o ASO. Foi possível constatar que o nosso tratamento utilizando o ASO contra o Cav2.3 foi eficiente em diminuir os níveis do RNAm do Cav2.3 quando comparados ao tratamento com o respectivo grupo controle. Na medula espinhal foi possível visualizar uma inibição de $51 \pm 4\%$ (Figura 10, painel A), enquanto no GRD a porcentagem de inibição chegou a $52 \pm 6\%$ (Figura 10, painel B).

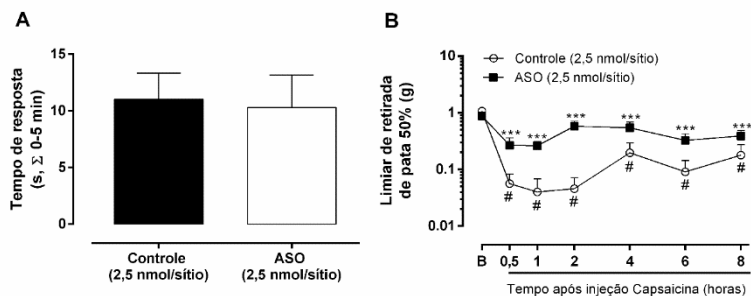
Figura 10 - Expressão do CaV2.3 após tratamento com ASO. A – Quantificação dos níveis de RNAm para o CaV2.3 na medula espinhal após tratamento com antisseno (ASO) ou seu controle (Mismatch) (2,5 nmol/sítio 2x ao dia por 3 dias, i.t.). B – Quantificação dos níveis de RNAm para o CaV2.3 no GRD após tratamento com antisseno (ASO) ou seu controle (Mismatch) (2,5 nmol/sítio 2x ao dia por 3 dias, i.t.). Dados expressos como unidades arbitrárias (n= 4 por grupo), analisados pelo teste-t de Student. (**) Representa diferença significativa ($P<0,01$) quando comparados ao grupo controle (MM). Foi utilizado teste de Grubbs para detecção de possíveis outliers, mas não foram encontrados.



Doze horas após a última injeção de ASO ou controle foi induzida a hiperalgesia secundária com injeção i. pl. de capsaicina (20 nmol/pata). Nos cinco minutos após a injeção de capsaicina foi possível constatar que o tratamento intratecal com o antisseno não gerou modificação na nocicepção espontânea. O tempo de resposta demonstrou ser homogêneo e semelhante, independente do tratamento (Figura 11, painel A).

No decurso temporal foi possível constatar que a hiperalgesia secundária induzida por capsaicina i. pl. foi prevenida pelo tratamento com ASO contra o CCVD tipo R, a partir de meia hora após a injeção de capsaicina quando comparada ao grupo controle. O efeito antihiperalgésico do ASO perdeu por até oito horas, estando o pico do efeito em duas horas após a injeção de capsaicina, onde a inibição da hiperalgesia chegou a $72 \pm 16\%$ (Figura 11, painel B).

Figura 11 - Avaliação do tratamento com ASO contra o CCVD tipo R no modelo de hiperalgisia secundária mediada pela administração subcutânea de capsaicina (20 nmol/sítio) na região plantar da pata direita traseira de camundongos fêmeas. A - Avaliação frente a nocicepção espontânea após administração de capsaicina (20 nmol/sítio, i.pl.). B - Decurso temporal do tratamento com ASO na hiperalgisia secundária. Dados representados como média \pm E.P.M. (n= 8 por grupo), 2-3 blocos independentes por experimento, A analisado pelo teste-t de Student e B analisado pela ANOVA duas vias com medidas repetidas seguidas pelo teste post-hoc de Bonferroni. (B) – Basal. (#) Representa diferença significativa ($P<0,05$) quando comparado aos valores basais. (***) Representa diferença significativa ($P<0,001$) quando comparado ao grupo controle (MM). Foi utilizado teste de Grubbs para detecção de possíveis outliers e foram excluídos 1 animal de cada grupo (A e B).



6. DISCUSSÃO

O envolvimento de vários canais de cálcio dependentes de voltagem tem sido amplamente estudado nas vias nociceptivas, principalmente no que diz respeito ao Ca_v2 . Alguns estudos apontam a participação dos Ca_v2 em mecanismos espinhais envolvidos em dores neuropáticas (LUVISETTO *et al.*, 2006; MATTHEWS *et al.*, 2007; SAEGUSA *et al.*, 2000). O uso do bloqueador do canal $Ca_v2.2$, ziconotida, demonstrou ser eficaz no tratamento de dores neuropáticas, assim, acredita-se que o bloqueio do $Ca_v2.3$ tenha um efeito analgésico promissor. No entanto, existem poucos relatos da literatura que esclareçam a participação do $Ca_v2.3$ na nocicepção.

A injeção intradérmica com uma dose elevada de capsaicina tem sido utilizada como um modelo seguro e eficaz de sensibilização central em humanos para o estudo dos mecanismos envolvidos em dores neuropáticas e na busca por novos fármacos analgésicos. Com isso, a primeira parte deste estudo procurou caracterizar o modelo de hiperalgesia secundária induzida pela injeção intraplantar (i. pl.) capsaicina em camundongos machos e fêmeas. Foi possível observar o desenvolvimento de comportamento nociceptivo espontâneo, independente do sexo, imediatamente após a injeção de capsaicina, o qual apresentou um pico de resposta no primeiro minuto avaliado. Esta dor imediata após a injeção de capsaicina é característica da dor em queimação causada pela ativação dos receptores TRPV1 pelo seu agonista (BASBAUM *et al.*, 2009). A hiperalgesia secundária foi visualizada rapidamente, em meia hora após a injeção de capsaicina e demonstrou ser duradoura, pois foi detectada por pelo menos até cinco horas após a injeção de capsaicina. Estes dados são condizentes com o que é visto na clínica, os pacientes relatam dor persistente e adjacente a área lesionada (JENSEN; FINNERUP, 2014). A sensibilização periférica ocorre no local da lesão, a capsaicina é um agente capaz de gerar hiperalgesia periférica no local da injeção devido a sensibilização periférica. Além disso, a capsaicina é capaz de desencadear a hiperalgesia secundária no local adjacente a injeção. No nosso estudo a avaliação dos parâmetros nociceptivos foi realizada na área adjacente a injeção de capsaicina (na área não lesionada) estando condizente com o processo de sensibilização central.

Devido as características de ativação dos receptores TRPV1 pela capsaicina esperávamos a visualização de uma hiperalgesia térmica ao calor, no entanto, nossos dados demonstraram uma hipoalgesia térmica ao calor em machos e uma tendência a hipoalgesia em fêmeas. Um estudo

que buscou caracterizar os fenótipos de pacientes com dores neuropáticas relatou que pacientes com hiperalgesia secundária apresentaram uma hipotalgesia como resposta a perda de sensibilidade térmica (VOLLERT *et al.*, 2018). Na literatura há relatos de estudos que utilizaram injeções com altas doses de capsaicina e observaram o surgimento de uma hipotalgesia nos testes de sensibilidade térmica ao calor (SLUKA, 2002; WANG *et al.*, 2017). Um fator que pode explicar essa perda de sensibilidade térmica seria a dessensibilização dos receptores TRPV1, encontrados nos nociceptores, pela injeção de altas doses de capsaicina (SLUKA, 2002).

No que diz respeito ao sexo dos animais os dados da caracterização do modelo mostraram ser semelhantes e homogêneos. Nos últimos anos cresceu a preocupação com inserção de animais machos e fêmeas nos estudos relacionados a dor (SORGE *et al.*, 2015). Desta forma, o nosso estudo buscou incluir ambos os gêneros animais na avaliação dos parâmetros nociceptivos. Foi realizada a avaliação do ciclo estral nas fêmeas em experimento, as quais demonstraram estar em fases do ciclo variadas, apesar disso, não houve diferença significativa na resposta nociceptiva nas diferentes fases do ciclo estral (dados não mostrados). Alguns pesquisadores se especializaram na pesquisa relacionada as diferentes respostas geradas pelos gêneros, alguns trabalhos relatam as diferenças relacionadas a modulação imune em mulheres e homens (ROSEN; HAM; MOGIL, 2017). Um estudo com fêmeas da linhagem C57Bl/6 constatou que as fêmeas desta linhagem não demonstraram diferença significativa dependente da fase do ciclo estral nos parâmetros nociceptivos avaliados. Além disso, relatos anteriores destacam que as variações detectadas em fêmeas foram as mesmas relatadas nos machos (MEZIANE *et al.*, 2007). Em um outro estudo que utilizou modelo de fratura, verificou que o comportamento de dor espontânea evocada pela injeção de capsaicina foi maior nas fêmeas do que nos machos com indução de fratura (SAHBAIE *et al.*, 2018). Contudo, nossos dados não demonstraram diferenças significativas no comportamento nociceptivo entre machos e fêmeas após injeção de capsaicina. Apesar de termos visualizado uma hipotalgesia térmica ao calor significativa somente nos machos, as fêmeas apresentaram comportamento similar demonstrando uma tendência a hipotalgesia, similar ao que ocorre nos machos.

Historicamente as toxinas bloqueadoras de CCDV são capazes de desenvolver efeitos adversos. Com isso, buscamos avaliar a presença de efeitos sensoriais e motores indesejáveis desencadeados pelo bloqueio dos canais tipo-N e tipo R em diferentes doses das toxinas ω -conotoxina MVIIA e SNX-482, respectivamente. As doses mais elevadas de ω -

conotoxina MVIIA foram capazes de gerar o surgimento de alguns efeitos adversos indesejáveis, principalmente relacionados a parte motora, enquanto as menores doses utilizados não causaram efeitos indesejáveis. Este resultado corrobora os dados da literatura, os quais utilizaram outros bloqueadores de CCDV tipo N e estes também alteraram a função motora (MALMBERG; YAKSH, 1994). Outro estudo que avalia animais controle, demonstrou que a injeção de ω -conotoxina MVIIA em doses altas causa efeitos adversos motores, enquanto as menores doses não desencadearam estes efeitos (DA SILVA *et al.*, 2015). Desta forma, esta toxina parece possuir uma janela terapêutica estreita e demonstra uma relação direta com os efeitos adversos vistos clinicamente pela administração da ziconotida.

Quando avaliamos os mesmos parâmetros para o bloqueador de canal tipo R (SNX-482) não foi possível observar surgimento de efeitos indesejáveis significativos, demonstrando uma melhor janela terapêutica quando comparada a ω -conotoxina MVIIA e indicando que o CCDV tipo R apesar de envolvido na transmissão de neurotransmissores, estes não devem estar envolvidos essencialmente na transmissão motora (DALMOLIN *et al.*, 2011; SAEGUSA *et al.*, 2000). Este bloqueio do CCDV tipo R pelo SNX-482, nas doses testadas, não desencadeou efeitos indesejáveis em machos e nem em fêmeas. Porém, estudo desenvolvido em ratos demonstrou que a injeção intratecal de doses cerca de 6 vezes maiores de SNX-482 causou efeitos adversos (TERASHIMA, 2013), que poderiam ser explicados pela perda de seletividade de altas doses desta toxina.

Além disso, a administração destes bloqueadores de CCDV não alterou os parâmetros nociceptivos avaliados em animais controle sem a injeção de capsaicina, mostrando que o simples bloqueio destes CCDV do tipo N e tipo R em condições fisiológicas na medula espinhal não altera a transmissão de estímulos nociceptivos sem presença de lesão. Relatos utilizando animais demonstram que a utilização de doses menores da ω -conotoxina MVIIA não alteram os parâmetros nociceptivos (HAMAD *et al.*, 2018). Além disso, nossos dados corroboram com os dados da literatura, onde estudos com eletrofisiologia demonstram que doses baixas do SNX-482, até 300 pmol/sítio, não desencadeiam alteração nos parâmetros nociceptivos, enquanto doses mais elevadas, próximas a 800 pmol/sítio, geram alterações nestes parâmetros (MATTHEWS *et al.*, 2007). Ainda, um outro trabalho que utiliza uma baixa dose de SNX-482 injetada via intracerebroventricular, também não demonstrou alterações nos parâmetros nociceptivos em animais controle (YOKOYAMA *et al.*, 2004).

Após a caracterização do modelo de hiperalgesia secundária e da verificação do surgimento de efeitos indesejáveis pelo bloqueio dos CCDV tipo N e tipo R em animais controle sem a injeção de capsaicina, fomos testar o tratamento com estes bloqueadores no modelo de hiperalgesia secundária induzida pela capsaicina. A utilização da ω -conotoxina MVIIA como controle experimental foi eficiente no modelo de hiperalgesia secundária induzida por capsaicina. Uma vez que este bloqueador de CCDV tipo N, na sua maior dose foi capaz de reverter a hiperalgesia secundária induzida pela capsaicina de forma eficiente, onde o efeito foi visualizado desde os primeiros minutos até duas horas após o tratamento. Estes dados evidenciam que o bloqueio do canal tipo N causa um efeito antinociceptivo imediato e potencialmente duradouro na sensibilização central, revelando a participação essencial destes canais nas vias nociceptivas centrais. A menor dose utilizada de ω -conotoxina MVIIA não teve efeito antinociceptivo, mas também não causou efeitos indesejáveis. Dados demonstram que a ω -conotoxina MVIIA é capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica no modelo de neuropatia a quimioterápicos (RIGO *et al.*, 2013), esse efeito se deve a alta expressão dos CCDV tipo N nos terminais nociceptivos, onde medeiam a liberação das vesículas sinápticas (MANUSCRIPT; STRUCTURES, 2009). Em estados de dores neuropáticas há alterações nos estados conformacionais dos CCDV, já foi demonstrado que dependendo do estado conformacional do canal a afinidade dos bloqueadores de CCDV também podem ser alteradas, com isso, toxinas possuem uma maior afinidade pelos canais quando os mesmos encontram-se no estado de inativação (FENG *et al.*, 2003; WINQUIST; PAN; GRIBKOFF, 2005). A sensibilização central induzida pela injeção de capsaicina parece induzir o estado conformacional do CCDV tipo N que favorece a ligação da ω -conotoxina MVIIA. Apesar do pronunciado efeito antinociceptivo, a dose mais elevada de ω -conotoxina MVIIA desencadeou efeitos adversos motores pronunciados e de forma significativa, ressaltando a estreita janela terapêutica desta toxina e revelando as suas limitações.

Em nosso estudo o bloqueador de canal tipo R na dose mais alta testada, foi capaz de reverter (pós-tratamento) parcialmente a hiperalgesia induzida pela injeção de capsaicina imediatamente após a realização do tratamento, contudo o efeito antinociceptivo não foi significativamente sustentado nos tempos posteriores. Os dados indicam que o bloqueio dos CCDV tipo R tem participação no efeito antinociceptivo na sensibilização central inicial e age de forma parcial. Estudos destacam o potencial efeito antinociceptivo exercido pelo bloqueio do CCDV tipo R, incluindo um estudo que utilizou a toxina SNX-482 em um modelo de dor neuropática

traumática (MATTHEWS *et al.*, 2007). Outro trabalho que utilizou o tratamento com SNX-482 no modelo da formalina, demonstrou uma diminuição na segunda fase da formalina nos animais tratados com a toxina, onde a segunda fase do modelo da formalina é considerada um modelo com sensibilização central (MURAKAMI *et al.*, 2004). Um estudo que utilizou camundongos knockout para o Cav2.3 relatou que estes não desenvolvem tolerância a morfina (YOKOYAMA *et al.*, 2004). Em outro estudo que utiliza animais com deleção gênica para o Cav2.3 há relatos de efeitos nociceptivos e antinociceptivos, demonstrando que o Cav2.3 pode agir de maneira distinta a nível espinhal e nas vias supra espinhais (SAEGUSA *et al.*, 2000). Assim, o Cav2.3 pode agir de diferentes maneiras em todo o sistema nociceptivo, o que pode explicar o papel ambíguo causado pelo bloqueio do Cav2.3.

A maior dose utilizada no tratamento com ω -conotoxina MVIIA teve um efeito antinociceptivo bastante semelhante em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de hiperalgisia secundária induzida por capsaicina. Um estudo que avaliou a resposta do tratamento com gabapentina em pacientes com dor neuropática não visualizou alterações na resposta ao tratamento relacionadas ao gênero (NAVARRO-ARTIEDA *et al.*, 2018). Em outro estudo que utilizou analgesia por morfina não foram encontradas diferenças significativas na eficácia entre homens e mulheres (BIJUR *et al.*, 2008). Curiosamente, nosso estudo demonstrou que a maior dose de SNX-482 utilizada teve um breve efeito antinociceptivo somente nas fêmeas. Nos machos o SNX-482 não gerou uma reversão significativa na hiperalgisia. O único parâmetro em que observamos uma divergência entre os sexos foi 15 minutos após o tratamento com SNX-482 após a indução do modelo de hiperalgisia secundária induzida pela capsaicina. As fêmeas parecem ser mais sensíveis ao tratamento com o bloqueador do CCDV tipo R. Este dado juntamente com o fato de a prevalência de dores neuropáticas ser maior em mulheres, nos levou a optar em prosseguir os experimentos apenas com as fêmeas (ATTAL; BOUHASSIRA; BARON, 2018). Estes achados podem ser decorrentes de alterações na modulação imune e ainda na modulação nociceptiva (ROSEN; HAM; MOGIL, 2017; SORGE *et al.*, 2015). O fato de o nosso tratamento com o SNX-482 ter gerado um breve efeito nociceptivo pode ser explicado devido ao fato de existirem correntes do tipo-R não responsivas ao bloqueio com o SNX-482 (NEWCOMB *et al.*, 2000).

Nosso pré-tratamento com o bloqueador de CCDV tipo N, antes da injeção de capsaicina, preveniu o desenvolvimento de hiperalgisia secundária apenas no tempo de uma hora após a injeção de capsaicina. Há

indicativos na literatura de que a transmissão nociceptiva em condições fisiológicas é realizada principalmente pelos CCDV tipo-N (MALMBERG; YAKSH, 1994). Um fator que pode estar relacionado com a atividade apenas no tempo de uma hora pode ser a expressão da subunidade $\alpha 2\delta$ dos CCDV. Uma vez que a expressão da subunidade $\alpha 2\delta$ influencia diretamente na expressão da subunidade $\alpha 1$ dos canais tipo-N, o que causa a redução na afinidade das conotoxinas pelo canal tipo N (MOULD *et al.*, 2004). Outro fator que deve ser levantado são os *splicing* alternativos relacionados ao gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do CCDV tipo-N. O *splicing* no exon37 do $\text{Ca}_v2.2$ é amplamente descrito, os canais passam a expressar a variante 37a, que gera o aumento da distribuição deste canal nos neurônios nociceptivos e alteram o tempo de abertura destes canais (CASTIGLIONI; RAINGO; LIPSCOMBE, 2006; JIANG; ANDRADE; LIPSCOMBE, 2013). Os *splicing* alternativos geram uma série de alterações nas propriedades dos canais $\text{Ca}_v2.2$, acreditamos assim, que estas alterações possam alterar as propriedades de ativação e bloqueio destes canais.

O pré-tratamento com o bloqueador de CCDV tipo R, antes da injeção de capsaicina, não foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hiperalgesia. Parece que os CCDV do tipo R aparentemente não são fundamentais para a transmissão nociceptiva em condições fisiológicas, no entanto, parecem estar intimamente relacionados com a transmissão dolorosa relacionadas a sensibilização central, como na segunda fase no teste da formalina (SAEGUSA *et al.*, 2000). Um trabalho avaliou o pós-tratamento com SNX-482, após a indução do modelo de neuropatia por ligação do nervo espinhal, destacou que os animais com neuropatia foram mais susceptíveis a inibição gerada pelo SNX-482 do que os animais controle. Isso indica que uma resposta adaptativa dos canais sensíveis ao SNX-482 em condições de dor neuropática aumenta a sensibilidade ao bloqueador SNX-482, esse dado sugere que a neuropatia pode gerar uma supra regulação no $\text{Ca}_v2.3$ (MATTHEWS *et al.*, 2007).

Há relatos na literatura demonstrando que a fosforilação do canal $\text{Ca}_v2.3$ é necessária para a funcionalidade do presente canal, contudo, até o presente momento não há relatos sobre a atividade do canal fosforilado, essa fosforilação pode alterar a afinidade do canal pelos seus bloqueadores como o SNX-482 (NEUMAIER *et al.*, 2018). As correntes do tipo R são heterogêneas, inclusive devido as variantes de *splicing* que geram diferentes sensibilidades ao SNX-482 (NEWCUMB *et al.*, 2000). Estudos com cultura primária de células granulares do cerebelo de ratos expressaram diferentes tamanhos na carboxila terminal da subunidade $\alpha 1E$, formadora do poro do $\text{Ca}_v2.3$, revelando corresponderem a

isoformas diferentes do Cav2.3 (SCHRAMM *et al.*, 1999). Essas alterações nas isoformas alteram as propriedades farmacológicas destes canais, deixando-os com propriedades porosas diferentes e alterando sua afinidade pelo SNX-482 (TOTTENE; VOLSSEN; PIETROBON, 2000). Além disso, as variantes de *splicing* do Cav2.3 geram isoformas com variações estruturais que acabam por alterar a expressão tecidual dos Cav2.3 (PEREVERZEV *et al.*, 2002). Em mamíferos já foram identificadas seis variantes de *splicing* do Cav2.3, as quais duas foram detectadas em neurônios trigeminais e do GRD (FANG *et al.*, 2007, 2010). Com isso, fatores como padrões de expressão, variações das subunidades formadoras do canal e de *splicing* são elementos que estão alterados durante condições de dor neuropática e que podem alterar a afinidade do SNX-482 pelo CCDC tipo R.

No experimento utilizando ASO contra o Cav2.3 foi possível visualizar que o tratamento por si só com esse ASO não alterou os parâmetros nociceptivos avaliados de hiperalgesia mecânica e térmica ao calor, não havendo alterações nos níveis antes e após o tratamento com o ASO. Além disso, também não houve o surgimento de efeitos motores indesejáveis. Esses dados demonstram que o simples tratamento com o ASO contra o Cav2.3 a nível medular não são capazes de causar o surgimento de nocicepção e não causam efeitos adversos, demonstrando que este tratamento possui uma boa tolerabilidade e um bom grau de segurança. Este dado é condizente com relatos descritos na literatura, que demonstram que o simples tratamento com a terapia antissense não alteram a resposta a dor quando comparados ao grupo controle (MOHAN *et al.*, 2017).

O tratamento com ASO contra o Cav2.3 foi capaz de reverter a hiperalgesia secundária induzida pela capsaicina, essa reversão foi visualizada nos primeiros 30 minutos após indução do modelo e perdurou por até oito horas. O mesmo tratamento não alterou a nocicepção espontânea, mostrando que essa estratégia possui um efeito analgésico duradouro e eficiente principalmente em mecanismos que envolvem sensibilização central. A sequência do ASO contra o Cav2.3 utilizado neste estudo foi baseada em um estudo de 1998, o qual, utilizou o antissense contra o Cav2.3 em uma cultura de neurônios de ratos (PIEDRAS-RENTERIA; TSIEN, 1998). Nos últimos anos vem crescendo o interesse pela utilização de ASOs na clínica, pois estes têm se mostrado candidatos ideais para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

A estratégia com terapia antissense tem demonstrado ser promissora para o tratamento de dores neuropáticas. Apesar disso, alguns

pontos sobre os ASOs devem ser considerados. Há uma certa preocupação em relação a sua possível toxicidade e efeitos adversos que possam surgir em decorrência da diminuição da expressão de proteínas na fase adulta. Outro ponto são as vias de administração e tempo de meia vida, os ASOs não atravessam a barreira hematoencefálica, com isso sua administração deve ser realizada direto no local, no caso do SNC deve ser realizada administração via intratecal, tornando o procedimento desconfortável para os pacientes (BISHOP, 2017). Em decorrência destes fatos, diversas alterações estruturais vêm sendo propostas durante os anos nos ASOs, visando a melhoria das propriedades relacionadas a cinética e dinâmica, tornando-os mais estáveis, mais toleráveis e aumentando a entrega e a sua afinidade pelo sítio de ação (SCHOCH; MILLER, 2017). O nosso protocolo utilizou um tratamento com ASO contra o Cav2.3 medular que constava com um tratamento intratecal de 12 em 12 horas por um período de três dias, no entanto, este protocolo de tratamento pode ser considerado incômodo. Na literatura há relatos da utilização de ASOs que contêm modificações estruturais de última geração onde uma única administração foi suficiente para sustentar a diminuição na expressão do gene alvo durante semanas (MOHAN *et al.*, 2017). Além disso, estratégias que visam direcionar o ASO para o local específico de ação vêm sendo mais abordadas. Um ASO foi direcionado para agir em hepatócitos a partir do reconhecimento de um açúcar altamente expresso no fígado (LEVIN; PH, 2017). Terapias que visam uma entrega dos ASOs maior no SNC estão sendo estudadas (BISHOP, 2017). Apesar do nosso tratamento com ASO contra o Cav2.3 ter revertido a hiperalgisia, é necessário que se projete um ASO contra o Cav2.3 mais resistente e com maior especificidade pelo alvo, para que o protocolo de tratamento seja menos invasivo e a eficácia seja aumentada.

Os nossos dados demonstraram uma diminuição significativa nos níveis de RNAm para o Cav2.3 após o tratamento com o ASO, tanto a nível medular, quanto no GRD, demonstrando que o ASO foi eficiente. Um trabalho que buscou avaliar a participação do Cav2.3 em células cardíacas, revelou que a ablação do Cav2.3 gerou um aumento na expressão do Cav3.1, revelando o mecanismo de compensação que pode ser desencadeado pela deleção gênica de genes relacionados aos CCDV (WEIERGRÄBER *et al.*, 2005). Assim, não podemos descartar que a sequência antissenso utilizada no presente estudo tenha agido de maneira inespecífica e esses mecanismos estejam envolvidos com os nossos resultados.

Os dados aqui relatados demonstram que o modelo de hiperalgisia secundária é um bom modelo preditivo para o teste de possíveis

moléculas analgésicas, contudo, há a necessidade de posteriormente realizar testes em um modelo mais robusto relacionado à sensibilização central. A realização da bateria de testes relacionados a efeitos indesejáveis realizada no presente estudo demonstrou ser um bom parâmetro para a triagem de moléculas que possam desencadear possíveis efeitos adversos, além disso, essa triagem auxilia na busca de doses efetivas mais adequadas. A ω -conotoxina MVIIA demonstrou ser um ótimo controle positivo, condizente com os dados clínicos e ressaltando a importância dos CCDV tipo N para a nocicepção. O SNX-482 reverteu parcialmente a nocicepção no modelo utilizado, mas o tratamento com ASO contra o canal Cav2.3 reverteu a hiperalgisia gerada no modelo. Diante do exposto o CCDV tipo R parece contribuir para o estabelecimento do processo nociceptivo e o seu bloqueio é capaz de reverter a nocicepção. No entanto, este canal parece atuar somente nas fases iniciais da nocicepção, outros CCDV devem gerar uma compensação e causar um equilíbrio na função perdida pelo bloqueio do CCDV. Além disso, ressaltamos aqui a relevância da utilização de ambos os sexos nos procedimentos experimentais para que tenhamos dados mais robustos e com maior representatividade.

Há a necessidade de realizar estudos com um modelo de dor neuropática e verificar se o bloqueio do Cav2.3 possui efeito analgésico neste modelo. Além disso, é preciso desenhar um ASO mais específico para o Cav2.3 e mais resistente a degradação, para que a diminuição da expressão do Cav2.3 seja mais efetiva e tenhamos uma ferramenta mais adequada para o estudo do Cav2.3 em mecanismos nociceptivos.

7. CONCLUSÃO

O bloqueio ou redução da expressão do canal de cálcio voltagem dependente $Ca_v2.3$ reduz a hiperalgesia secundária induzida por capsaicina em camundongos, participando do processo de sensibilização central e indicando ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento da dor neuropática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Eunice; LUIZ, Ana P.; FERREIRA, Juliano; CALIXTO, João B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience** v. 152, n. 2, p. 511–520, 2008.

ATTAL, Nadine; BOUHASSIRA, Didier; BARON, Ralf. Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. **The Lancet Neurology** v. 17, n. 5, p. 456–466, 2018.

BARON, Ralf; BINDER, Andreas; WASNER, Gunnar. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology** v. 9, n. 8, p. 807–819, 2010.

BASBAUM, Allan I.; BAUTISTA, Diana M.; SCHERRER, Grégory; JULIUS, David. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell** v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.

BIJUR, Polly E.; ESSES, David; BIRNBAUM, Adrienne; CHANG, Andrew K.; SCHECHTER, Clyde; GALLAGHER, John E. Response to morphine in male and female patients: Analgesia and adverse events. **Clinical Journal of Pain** v. 24, n. 3, p. 192–198, 2008.

BISHOP, Kathie M. Progress and promise of antisense oligonucleotide therapeutics for central nervous system diseases. **Neuropharmacology** v. 120, p. 56–62, 2017.

CASTIGLIONI, Andrew J.; RAINGO, Jesica; LIPSCOMBE, Diane. Alternative splicing in the C-terminus of CaV2.2 controls expression and gating of N-type calcium channels. **Journal of Physiology** v. 576, n. 1, p. 119–134, 2006.

CATTERALL, William A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** v. 3, n. 8, p. 1–23, 2011.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 53, n. 1, Jul, p. 55–63, 1994.

CHEN, Hui-Sheng; HE, Xiang; WANG, Yang; WEN, Wei-Wei; YOU,

Hao-Jun; ARANDT-NIELSEN, Lars. Roles of capsaicin-sensitive primary afferents in differential rat models of inflammatory pain: A systematic comparative study in conscious rats. **Experimental Neurology** v. 204, n. 1, p. 244–251, 2007.

COLLOCA, Luana.; LUDMAN, Taylor.; BOUHASSIRA, Didier.; BARON, Ralf.; DICKENSON, Anthony.; YARNITSKY, David.; FREEMAN, Roy.; TRUINI, Andrea.; ATTAL, Nadine. FINNERUP, Nanna; ECCLESTON, Christopher; KALSO, Eija; BENNETT, David; DWORKIN, Robert; RAJA, Srinivasa. Neuropathic Pain. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3, p. 1-20, 2017.

CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA**. BRASÍLIA-DF, p. 1-54, 2013.

CRUCCU, G.; SOMMER, C.; ANAND, P.; ATTAL, N.; BARON, R.; GARCIA-LARREA, L.; HAANPAA, M.; JENSEN, T. S.; SERRA, J.; TREEDE, D. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: Revised 2009. **European Journal of Neurology** v. 17, n. 8, p. 1010–1018, 2010.

DA SILVA, Juliana Figueira; CASTRO JUNIOR, Célio José; OLIVEIRA, Sara Marchesan; DALMOLIN, Gerusa Duarte; SILVA, Cássia Regina; VIEIRA, Bruno; DINIZ, Danuza Montijo; CORDEIRO, Marta do Nascimento; FERREIRA, Juliano; SOUZA, Alessandra Hubner; GOMEZ, Marcus Vinícius. Characterization of the antinociceptive effect of PhTx3-4, a toxin from *Phoneutria nigriventer*, in models of thermal, chemical and incisional pain in mice. **Toxicon** v. 108, p. 53–61, 2015.

DALMOLIN, Gerusa Duarte, SILVA, Cássia Regina; RIGO, Flávia Karine; GOMES, Guilherme Monteiro; CORDEIRO, Marta do Nascimento; RICHARDSON, Michal; SILVA, Marco Aurélio Romano; PRADO, Marco Antonio Máximo; GOMEZ, Marcus Vinicius; FERREIRA, Juliano. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. **Pain** v. 152, n. 10, p. 2224–2232, 2011.

DICKENSON, Anthony H; BEE, Lucy a; SUZUKI, Rie. Pains, gains, and midbrains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 102, n. 50, p. 17885–17886, 2005.

DIXON, WJ. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v. 20, p. 441-462, 1980.

DOLPHIN, Annette C. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **Journal of Physiology** v. 594, n. 19, p. 5369–5390, 2016.

ECCLESTON, Christopher; HEARN, Leslie; WILLIAMS, Amanda C de C. Psychological therapies for the management of chronic neuropathic pain in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews** n. 10, p. 1-30, 2015.

ELMOFTY, Dalia H; ANITESCU, Magdalena; BUVANENDRAN, Asokumar. Best practices in the treatment of neuropathic pain. **Pain management** v. 3, n. 6, p. 475–483, 2013.

FANG, Zhi; PARK, Chul-Kyu; LI, Hai Y.; KIM, Hyun Y.; PARK, Seong-Hae; JUNG, Sung J.; KIM, Joong S.; MONTEIL, Arnaud; OH, Seog B.; MILLER, Richard J. Molecular basis of Ca(v)2.3 calcium channels in rat nociceptive neurons. **The Journal of Biological Chemistry** v. 282, n. 7, p. 4757–64, 2007.

FANG, Zhi; HWANG, Jae H.; KIM, Joong S.; JUNG, Sung J.; OH, Seog B. R-type Calcium Channel Isoform in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. **The Korean Journal of Physiology and Pharmacology** v. 14, n. 1, p. 45, 2010.

FENG, Zhong Ping; DOERING, Clinton J.; WINKFEIN, Robert J.; BEEDLE, Aaron M.; SPAFFORD, David J.; ZAMPONI, Gerald W. Determinants of inhibition of transiently expressed voltage-gated calcium channels by ω -conotoxins GVIA and MVIIA. **Journal of Biological Chemistry** v. 278, n. 22, p. 20171–20178, 2003.

FINNERUP, Nanna B; ATTAL, Nadine; HAROUTOUNIAN, Simon; MCNICOL, Ewan; BARON, Ralf; DWORKIN, Robert H.; GILRON, Ian; HAANPAA, Maija; HANSSON, Per; JENSEN, Troels S.; KAMERMAN, Peter R.; LUND, Karen; MOORE, Andrew; RAJA, Srinivasa N.; RICE, Andrew S. C.; ROWBOTHAM, Michael; SENA, Emily; SIDDALL, Phillip; SMITH, Blair H.; WALLACE, Mark. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. **The Lancet**

Neurology v. 14, n. 2, p. 162–173, 2016.

GILRON, Ian; JENSEN, Troels S.; DICKENSON, Anthony H. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: From bench to bedside. **The Lancet Neurology** v. 12, n. 11, p. 1084–1095, 2013.

HAMAD, Mousa K.; HE, Kevin; ABDULRAZEQ, Hael F.; MUSTAFA, Ali M.; KAMAL, Naveed; ALI, Mohsin; NAKHLA, Jonathan; HERZALLAH, Mohammad M.; MAMMIS, Antonios. Potential Uses of Isolated Toxin Peptides in Neuropathic Pain Relief: A Literature Review. **World Neurosurgery** v. 113, p. 333–347, 2018.

HARGREAVES, K.; DUBNER, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain** v. 32, n. 1, p. 11, 1988.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Epidemiology of Neuropathic Pain : How Common is Neuropathic Pain , and What Is Its Impact ? **International Association for the Study of Pain** p. 1–2, 2015.

JENSEN, Troels S.; FINNERUP, Nanna B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. **The Lancet Neurology** v. 13, n. 9, p. 924–935, 2014.

JIANG, Yu Qiu; ANDRADE, Arturo; LIPSCOMBE, Diane. Spinal morphine but not ziconotide or gabapentin analgesia is affected by alternative splicing of voltage-gated calcium channel CaV2.2 pre-mRNA. **Molecular Pain** v. 9, n. 1, p. 1–11, 2013.

JONES, Robert Carter Wellford; LAWSON, Erin; BACKONJA, Miroslav. Managing Neuropathic Pain. **Medical Clinics of North America** v. 100, n. 1, p. 151–167, 2016.

JOSHI, S. K.; HERNANDEZ, G.; MIKUSA, J. P.; ZHU, C. Z.; ZHONG, C.; SALYERS, A.; WISMER, T.; CHANDRAN, P.; DECKER, M. W.; HONORE, P. Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. **Neuroscience** v. 143, n. 2, p. 587–596, 2006.

LAIRD, J. M.A.; MARTINEZ-CARO, L.; GARCIA-NICAS, E.; CERVERO, F. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain** v. 92, n. 3, p. 335–342, 2001.

LATREMOLIERE, A; WOOLF, C.J. Central Sensitization: a generator of pain hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain** v. 10, n. 9, p. 895–926, 2010.

LEVIN, Arthur A; PH, D. Clinical Implications of Basic Research Targeting Therapeutic Oligonucleotides. **The New England Journal of Medicine** v. 5, p. 86–88, 2017.

LOESER, John D.; TREEDE, Rolf Detlef. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain** v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

LUVISETTO, S.; MARINELLI, S.; PANASITI, M. S.; D'AMATO, F. R.; FLETCHER, C. F.; PAVONE, F.; PIETROBON, D. Pain sensitivity in mice lacking the Cav2.1 α 1 subunit of P/Q-type Ca²⁺ channels. **Neuroscience** v. 142, n. 3, p. 823–832, 2006.

MAIER, C.; BARON, R.; TÖLLE, T. R.; BINDER, A.; BIRBAUMER, N.; BIRKLEIN, F.; GIERTHMÜHLEN, J.; FLOR, H.; GEBER, C.; HUGE, V.; KRUMOVA, E. K.; LANDWEHRMEYER, G. B.; MAGERL, W.; MAIHÖFNER, C.; RICHTER, H.; ROLKE, R.; SCHERENS, A.; SCHWRTZ, A.; SOMMER, C.; TRONNIER, V.; ÜÇEYLER, N.; VALET, M.; WASNER, G.; TREEDE, R. D. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): Somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. **Pain** v. 150, n. 3, p. 439–450, 2010.

MALMBERG, A B; YAKSH, T L. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. **The Journal of neuroscience** v. 14, n. 8, p. 4882–90, 1994.

MATTHEWS, Elizabeth A.; BEE, Lucy A.; STEPHENS, Gary J.; DICKENSON, Anthony H. The Cav2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. **European Journal of Neuroscience** v. 25, n. 12, p. 3561–3569, 2007.

MEZIANE, H.; OUAGAZZAL, A. M.; AUBERT, L.; WIETRZYCH, M.; KREZEL, W. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: Implications for phenotyping strategies. **Genes, Brain and Behavior** v. 6, n. 2, p. 192–200, 2007.

MODIR, James G.; WALLACE, Mark S. Human Experimental Pain Models 3: Heat/Capsaicin Sensitization and Intradermal Capsaicin Models. **Analgesia: Methods and Protocols**. v. 617, p. 169–174, 2010.

MOHAN, Apoorva; FITZSIMMONS, Bethany; ZHAO, Hien T.; JIANG, Yuhong; MAZUR, Curt; SWAYZE, Eric E.; KORDASIEWICZ, Holly B. Antisense oligonucleotides selectively suppress target RNA in nociceptive neurons of the pain system and can ameliorate mechanical pain. **Pain** v. 159, p. 139-149, 2018.

MOULD, Jorgen; YASUDA, Takahiro; SCHROEDER, Christina I.; BEEDLE, Aaron M.; DOERING, Clinton J.; ZAMPONI, Gerald W.; ADAMS, David J.; LEWIS, Richard J. The $\alpha 2\delta$ auxiliary subunit reduces affinity of ω -conotoxins for recombinant N-type (Ca v2.2) calcium channels. **Journal of Biological Chemistry** v. 279, n. 33, p. 34705–34714, 2004.

MURAKAMI, Manabu; NAKAGAWASAI, Osamu; SUZUKI, Takashi; MOBARAKEH, Izadi I.; SAKURADA, Yumiko; MURATA, Astunobu; YAMADERA, Fumihiko; MIYOSHI, Ichiro; YANAI, Kazuhiko; TAN-NO, Koichi; SASANO, Hironobu; TADANO, Takeshi; IJIMA, Toshihiko. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel $\alpha 1$ subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. **Brain Research** v. 1024, n. 1–2, p. 122–129, 2004.

MURAKAMI, Manabu; SUZUKI, Takashi; NAKAGAWASAI, Osamu; MURAKAMI, Hiroshi; MURAKAMI, Shinobu; ESAAHI, Akihisa; TANAGUCHI, Ryoo; YANAGISAWA, Teruyuki; TAN-NO, Koichi; MIYOSHI, Ichiro; SASANO, Hironobu; TADANO, Takeshi. Distribution of various calcium channel $\alpha 1$ subunits in murine DRG neurons and antinociceptive effect of ω -conotoxin SVIB in mice. **Brain Research** v. 903, n. 1–2, p. 231–236, 2001.

NAVARRO-ARTIEDA, R.; REJAS-GUTIÉRREZ, J.; PÉREZ-

PARAMO, M.; SICRAS-MAINAR, A. Efecto de la edad y el género sobre las consecuencias clínicas y económicas del tratamiento con especialidad farmacéutica de marca o genérica en pacientes con dolor neuropático periférico en práctica clínica habitual. **Neurologia** v. 33, n. 3, p. 141–153, 2018.

NEUMAIER, Felix; ALPDOGAN, Serdar; HESCHELER, Jürgen; SCHNEIDER, Toni. Protein phosphorylation maintains the normal function of cloned human Cav2.3 channels. **The Journal of General Physiology** v. 150, n. 3, p. 1-20, 2018.

NEUMAIER, Felix; DIBUÉ-ADJEI, Maxine; HESCHELER, Jürgen; SCHNEIDER, Toni. Voltage-gated calcium channels: Determinants of channel function and modulation by inorganic cations. **Progress in Neurobiology** v. 129, p. 1–36, 2015.

NEWCOMB, Robert; CHEN, Xiao-hua; DEAN, Robin; DAYANITHI, Govinvin; CONG, Ruth; SZOKE, Balazs; LEMOS, Jose; BOWERSOX, Scott; MILJANICH, George. SNX-482 : A Novel Class E Calcium Channel Antagonist from Tarantula Venom. **CNS Drug Reviews** v. 6, n. 2, p. 153–173, 2000.

NEWCOMB, Robert; SZOKE, Balazs; PALMA, Andrew; WANG, Gang; CHEN, Xiao-hua; HOPKINS, William; CONG, Ruth; MILLER, Jim; URGE, Laszlo; TARCZT-HORNOCH, Katalin; LOO, Joseph A.; DOOLEY, David J. NADASDI, Laszlo; TSIEN, Richard W.; LEMOS, José; MILJANICH, George. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysteroecrates gigas*. **Biochemistry** v. 37, n. 44, p. 15353–15362, 1998.

NIJS, Jo; MEEUS, Mira; VERSIJPT, Jan; MOENS, Maarten; BOS, Inge; KNAEPEN, Kristel; MEEUSEN, Romain. Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? **Expert Opinion on Therapeutic Targets** v. 19, n. 4, p. 565–576, 2015.

OLIVERA, B M; GRAY, William R.; ZEIKUS, Regina; MCINTOSH, Michael J.; VARGA, Janos; RIVIER, Jean; SANTOS, Victoria; CRUZ, Lourdes J. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. **Science (New York, N.Y.)** v. 230, n. 4732, p. 1338–43, 1985.

PEREVERZEV, Alexey; LEROY, Jérôme; KRIEGER, Andreas; MALÉCOT, Claire O.; HESCHELER, Jürgen; PFITZER, Gabriele; KLÖCKNER Udo; SCHNEIDER, Toni. Alternate splicing in the cytosolic II-III loop and the carboxy terminus of human E-type voltage-gated Ca²⁺ channels: Electrophysiological characterization of isoforms. **Molecular and Cellular Neuroscience** v. 21, n. 2, p. 352–365, 2002.

PIEDRAS-RENTERIA, E S; TSIEN, R W. Antisense oligonucleotides against alpha1E reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 95, n. 13, p. 7760–7765, 1998.

REMPE, Torge; WOLFF, Stephan; RIEDEL, Christian; BARON, Ralf; STROMAN, Patricj W.; JANSEN, Olav; GIERTHMÜHLEN, Janne. Spinal FMRI reveals decreased descending inhibition during secondary mechanical hyperalgesia. **PLOS ONE** v. 9, n. 11, p. 3–11, 2014.

RIGO, Flávia K.; DALMOLIN, Gerusa D.; TREVISAN, Gabriela; TONELLO, Raquel; SILVA, Mariane A.; ROSSATO, Mateus F.; KLAFKE, Jonatas; CORDEIRO, Marta N. C.; CASTRO JUNIOR, Célio J.; MONTIJO, Danuza; GOMEZ, Marcus V.; FERREIRA, J. Effect of ω -conotoxin MVIIA and Ph α 1 β on paclitaxel-induced acute and chronic pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 114–115, p. 16–22, 2013.

ROSEN, Sarah; HAM, Boram; MOGIL, Jeffrey S. Sex differences in neuroimmunity and pain. **Journal of Neuroscience Research** v. 95, n. 1–2, p. 500–508 , 2017.0360-4012.

SAEGUSA, H.; KURIHARA, Takashi; ZONG, Shuqin; MINOWA, Osamu; KASUMO, An-a; HAN, Wenhua; MATSUDA, Yoshihiro; YAMANAKA, Makoto; NODA, Tetsuo; TANABLE, Tsutomu. Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 97, n. 11, p. 6132–6137, 2000.

SAHBAIE, Peyman; TAJERIAN, Maral; YANG, Phillip; IRVINE, Karen A.; HUANG, Ting-Ting; LUO, Jian; WYSS-CORAY, Tony; CLARK, David J. Nociceptive and Cognitive Changes in a Murine Model of Polytrauma. **The Journal of Pain** , 2018.

SCHNEIDER, Toni; DIBUÉ, Maxine; HESCHELER, Jürgen. How “Pharmacoresistant” is Cav2.3, the Major Component of Voltage-Gated R-type Ca²⁺ Channels? **Pharmaceuticals** v. 6, n. 6, p. 759–776, 2013.

SCHOCH, Kathleen M.; MILLER, Timothy M. Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. **Neuron** v. 94, n. 6, p. 1056–1070, 2017.

SCHRAMM, M; PEREVERZEV, A.; TOTTENE, A.; KLÖCKNER, U.; PIETROBON, D.; HESSCHELER, J.; SCHENEIDER, T. Isoforms of alpha1E voltage-gated calcium channels in rat cerebellar granule cells-- detection of major calcium channel alpha1-transcripts by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Neuroscience** v. 92, n. 2, p. 565–75, 1999.

SCHWARTZ, E. S.; KIM, Hee Y.; WANG, Jigong; LEE, Inhyung; KLANN, Eric; CHUNG, Jin Mo; CHUNG, Kyungsoon. Persistent Pain Is Dependent on Spinal Mitochondrial Antioxidant Levels. **Journal of Neuroscience** v. 29, n. 1, p. 159–168, 2009.

SKOV, Michael J.; BECK, James C.; KATER, Annelies W.; SHOPP, George M. Nonclinical safety of ziconotide: An intrathecal analgesic of a new pharmaceutical class. **International Journal of Toxicology** v. 26, n. 5, p. 411–421, 2007.

SLUKA, K A. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. **The Journal of Neuroscience** v. 22, n. 13, p. 5687–5693, 2002.

SORGE, Robert E; MAPPLEBECK, Josiane C. S.; ROSEN, Sarah; BEGGS, Simon; TAVES, Sarah; ALEXANDER, Jessica K.; MARTIN, Loren J.; AUSTIN, Jean-Sebastien; SOTOCINAL, Susana G.; CHEN, Di; YANG, Mu; SHI, Xiang Q. HUANG, Hao; PILLON, Nicolas J.; BILAN, Philip J.; TU, YuShan; KLIP, Amira; JI, Ru-Rong; ZHANG, Ji; SALTER, Michael W.; MOGIL, Jeffrey. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience** v. 18, n. 8, p. 1081–1083, 2015.

TERASHIMA, Tetsuji; XU, Qinghao; YAMAGUCHI, Shigeki; YAKSH, Tony L. Intrathecal P/Q and R-type calcium channel

blockades on spinal substance P release and c-Fos expression.

Neuropharmacology v. 75, p. 1-8, 2013.

TOREBJÖRK, H. E.; LUNDBERG, L. E.; LAMOTTE, R. H. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. **The Journal of Physiology** v. 448, n. 1, p. 765–780, 1992.

TOTTENE, A; VOLSEN, S; PIETROBON, D. alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. **The Journal of Neuroscience** v. 20, n. 1, p. 171–178, 2000.

VAN DEN BROEKE, Emanuel Nathanael; MOURAUX, André; GRONEBERG, Antonia H.; PFAU, Doreen B.; TREEDE, Rolf-Detlef; KLEIN, Thomas. Characterizing pinprick evoked brain potentials before and after experimentally-induced secondary hyperalgesia. **Journal of Neurophysiology** v. 114, p. 2672-2681, 2015.

VOLLERT, Jan; MAGERT, Walter; BARON, Ralf; BINDER, Andreas; ENAX-KRUMOVA, Elena K.; GEISSLINGER, Gerd; GIERTHMÜHLEN, Janne; HENRICH, Florian; HÜLLEMANN, Philipp; KLEIN, Thomas; LÖTSCH, Jörn; MAIER, Christoph; SCHUH-HOFER, Sigrid; TÖLLE, Thomas R.; TREEDE, Rolf-Detlef. Pathophysiological mechanisms of neuropathic pain. **Pain** Manuscript Author 2018.

WALLACE, Mark S; RAUCK, Richard; FISHER, Robert; CHARAPATA, Steven G.; ELLIS, David; DISSANAYAKE, Sanjeeva. Intrathecal ziconotide for severe chronic pain: Safety and tolerability results of an open-label, long-term trial. **Anesthesia and Analgesia** v. 106, n. 2, p. 628–637, 2008.

WANG, Sheng; WANG, Sen; ASGAR, Jamila; JOSEPH, John; RO, Jin Y.; WEI, Feng; CAMPBELL, James N.; CHUNG, Man-Kyo. Ca²⁺ and calpain mediate capsaicin-induced ablation of axonal terminals expressing transient receptor potential vanilloid 1. **Journal of Biological Chemistry** v. 292, n. 20, p. 8291–8303, 2017.

WEIERGRÄBER, Marco; HENRY, Margit; SÜDKAMP, Michael; VIVIE, Ernst-Rainer; HESCHELER, Jürgen; SCHNEIDER, Toni.

Ablation of Cav2.3 / E-type voltage-gated calcium channel results in cardiac arrhythmia and altered autonomic control within the murine cardiovascular system. **Basic Research in Cardiology** v. 100, n. 1, p. 1–13, 2005.

WINQUIST, Raymond J.; PAN, Jennifer Qian; GRIBKOFF, Valentin K. Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. **Biochemical Pharmacology** v. 70, n. 4, p. 489–499, 2005.

WOOLF, Clifford J. Central Sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain** v. 152, n. 3 Supplemental, p. 1–31, 2012.

WORMUTH, Carola; LUNDT, Andreas; HENSELER, Christina; MÜLLER, Ralf; BROICH, Karl; PAPAZOGLU, Anna; WEIERGRÄBER, Marco. Review: Ca_v2.3 R-type Voltage-Gated Ca Channels - Functional Implications in Convulsive and Non-convulsive Seizure Activity. **The Open Neurology Journal** v. 10, n. 1, p. 99–126, 2016.

YOKOYAMA, Kazuaki; KURIHARA, Takashi; SAEGUSA, Hironao; ZONQ, Shuqin; MAKITA, Koshi; TANABLE, Tsutomu. Blocking the R-type (Cav2.3) Ca²⁺-channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. **European Journal of Neuroscience** v. 20, n. 12, p. 3516–3519, 2004.

YOU, Dokyoung S; CREECH, Suzannah K.; VICHAYA, Elisabeth G.; YOUNG, Erin E.; SMITH, Jerrell S.; MEAGHER, Mary W. Effect of written emotional disclosure on secondary hyperalgesia in women with trauma history. **Psychosomatic Medicine** v. 76, n. 5, p. 337–346, 2014.

ZAMPONI, Gerald W.; LEWIS, Richard J.; TODOROVIC, Slobodan M.; ARNERIC, Stephen P.; SNUTH, Terrance P. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. **Brain Research Reviews** v. 60, n. 1, p. 84–89, 2009.

ZAMPONI, Gerald W.; STRIESSNIG, Joerg; KOSCHAK, Alexandra; DOLPHIN, Anette C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacology Review** v. 67, p. 821–870, 2015.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain** v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.