



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Marcella de Amorim Ferreira

Potencial analgésico do bloqueio ou da redução da expressão do canal de cálcio dependente de voltagem (CCDV) Cav2.3 no modelo de dor pós-operatória em camundongos

Florianópolis

2022

Marcella de Amorim Ferreira

Potencial analgésico do bloqueio ou da redução da expressão do canal de cálcio dependente de voltagem (CCDV) Cav2.3 no modelo de dor pós-operatória em camundongos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Florianópolis

2022

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

Ferreira, Marcella de Amorim
Potencial analgésico do bloqueio ou da redução da
expressão do canal de cálcio dependente de voltagem (CCDV)
Cav2.3 no modelo de dor pós-operatória em camundongos /
Marcella de Amorim Ferreira ; orientador, Juliano
Ferreira, 2022.
103 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. CCDV tipo R. 3. Cav2.3. 4. CACNA1E.
5. Dor pós-operatória. I. Ferreira, Juliano. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Marcella de Amorim Ferreira

Potencial analgésico do bloqueio ou da redução da expressão do canal de cálcio dependente de voltagem (CCDV) Cav2.3 no modelo de dor pós-operatória em camundongos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Gabriela Trevisan dos Santos, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Maria

Prof.^a Sara Marchesan de Oliveira Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em farmacologia atribuído pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Prof. José Eduardo da Silva Santos, Dr.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Juliano Ferreira, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Juliano Ferreira pela orientação ao longo dos anos de iniciação científica, mestrado e doutorado. Muito obrigada por compartilhar comigo sua paixão pela ciência, seu conhecimento, seus ensinamentos, pelo incentivo e por me proporcionar uma boa formação científica. Ao longo dos anos o professor me proporcionou grandes ensinamentos que me ajudaram a conquistar as qualidades necessárias para ser um cientista. Agradeço pela motivação demonstrada mesmo com os constantes cortes em investimentos que a ciência em nosso país sofreu nos últimos anos. O caminho pode ter sido difícil, mas agradeço por ter aceitado entrar nessa jornada científica junto comigo. Você é uma inspiração e referência em nossa área, obrigada!

Agradeço a todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Farmacologia Experimental (LaFEX) e contribuíram de alguma forma para minha formação científica.

Em especial gostaria de agradecer a minha amiga Dra. Debora Denardin Luckmeyer (Débs) por ter me abraçado e me auxiliado em todas as etapas na minha formação científica. Obrigada por todo auxílio nos experimentos, cegamentos e todo o ensinamento nas técnicas de biologia molecular, mas principalmente muito obrigada por ser meu suporte durante todos esses anos. 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, por se fazer presente em todos os momentos mesmo que a distância, por sempre lembrar de mim. Independente do lugar do mundo que cada uma esteja, sei que em você tenho uma amiga leal. Só tenho a lhe agradecer por tornar essa jornada mais leve, prazerosa e divertida.

Ao Dr. Arthur Prudente (Bauru) e ao Dr. Sérgio José Macedo Júnior (Ginho) por me proporcionarem discussões científicas coerentes, oportunas e sempre me esclarecerem dúvidas com uma clareza e paciência honráveis. Agradeço também pelos momentos de descontração compartilhados ao longo desses anos, muito obrigada!

Agradeço as minhas amigas do LaFEX Roberta Giusti Schran, Ana Merian da Silva e Fernanda Martins por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho. Além disso, agradeço pelos momentos compartilhados, desabafos, brigas, puxões de orelha e risadas. Saibam que vocês são o futuro do LaFEX e desejo que o caminho de vocês seja prazeroso e repleto de aprendizado, assim como o meu foi durante esses anos de LaFEX.

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, muitíssimo obrigada por tornarem esse caminho mais prazeroso. O PPG me trouxe amigades que ficarão comigo para sempre e que se tornaram minha família ao longo dos anos.

Em especial muito obrigada ao Dr. Daniel Patrício (Filho) pelo auxílio na utilização dos equipamentos do Laboratório de Imunologia (LIM), mas principalmente muito obrigada pela amizade, pela parceria nossa de toda a semana. Obrigada por ser meu amigo e por estar presente em todos os momentos nos últimos anos, pelos bares, pelas indicações de animes, pelos roles em casa para beber e ver séries, pelas idas ao cartório, pelos desabafos e por todos os momentos compartilhados, meu muito obrigada.

Agradeço a Letícia Correa Nakatsukasa (Lele) por ser minha gêmea de outra idade e pela amizade dos últimos anos (que para mim mais parece uma década de amizade). Muito obrigada amiga, você é um dos presentes que a Farmaco me deu, obrigada por sempre estar presente, por ser esse ser humano incrível, que em qualquer lugar do mundo será sempre minha amiga preciosa, conte comigo sempre comigo e muito obrigada.

Agradeço a Priscila Zimath (Pri) a quem tornou a caminhada do doutorado muito mais prazerosa. Obrigada pela parceria e por todos os momentos de descontração, você se tornou uma parte especial dessa jornada.

Gostaria de agradecer também ao Filipe Oliveira, Ericks Souza e Marina Delgobo por todos os momentos de desabafo e risadas. Sem dúvidas, a jornada com vocês ao meu lado foi muito mais leve e divertida.

Agradeço ao professor Dr. Gerald W. Zamponi por me acolher em seu laboratório e ceder o seu laboratório para o aprimoramento deste trabalho. Em seu laboratório pude acompanhar pesquisadores de todos os lugares do mundo e me aprimorar como cientista. Não poderia deixar de agradecer especialmente ao Eder de

Andrade Gambeta, aluno de doutorado do professor Zamponi, que me auxiliou em todos os experimentos durante meu doutorado sanduíche, mas principalmente pela amizade e parceria. Muito obrigada amigo, por tudo, por toda ajuda, por todo o desabafo, por ser meu chão durante todo esse período e por estar presente. Espero que possamos nos encontrar logo pelas esquinas do mundo.

Ao meu marido, Felipe Eduardo da Silva, muito obrigada por tudo. Por me aturar nos momentos de estresse, por me acalmar, por acreditar, por sem me dizer que tudo irá dar certo e por confiar em mim. Muito obrigada por ser essa calma em meio ao meu estresse e confusão, por me animar e nunca duvidar de que eu conseguiria. Obrigada por topa todas as minhas maluquices e loucuras ao longo desses anos. Fomos de casamento, mudança de país, nos desfazer de tudo que temos para começar uma vida nova no outro lado do mundo, muito obrigada. A jornada com você ao meu lado com certeza é mais tranquila e essa conquista também é sua.

Gostaria de agradecer 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 acreditarem, por sonharem comigo, por toparem todas as minhas maluquices. Só cheguei até aqui por ter vocês ao meu lado, sem vocês essa jornada não seria possível, obrigada por todo apoio que vocês me proporcionam, essa conquista é para vocês.

As professoras Dr^a. Sara Marchesan, Dr^a. Gabriela Trevisan e ao professor Dr. Alfeu Zanotto Filho por aceitarem o convite para compor a banca de avaliação desta tese, 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, a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

*“Dizem que sou louco por pensar assim
Se eu sou muito louco por eu ser feliz
Mas louco é quem me diz
E não é feliz, não é feliz”
(OS MUTANTES, 1972).*

RESUMO

O número de procedimentos cirúrgicos vem aumentando nos últimos anos. Aproximadamente 80% dos pacientes experienciam dor aguda após procedimento cirúrgico e destes cerca de 70% relatam dor de moderada a intensa mesmo após passarem pelos protocolos de tratamento para dor pós-operatória. O tratamento padrão ouro para dor pós-operatória é a terapia opioide. No entanto, os opioides possuem limitação em sua segurança devido ao desenvolvimento de efeitos adversos. Os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) têm um importante papel no desenvolvimento e manutenção da dor. No entanto, o envolvimento do CCDV Cav2.3 na dor e analgesia ainda não é claro. Alguns estudos indicaram uma associação entre polimorfismos no gene que codifica o Cav2.3 (*CACNA1E*) com a dor pós-operatória e com o consumo de opioides. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial efeito antinociceptivo do Cav2.3 como alvo terapêutico para o tratamento da dor pós-operatória e como adjuvante para reduzir os efeitos adversos gerados pelos opioides em um modelo de dor pós-operatória em camundongos. A incisão plantar em camundongos fêmeas e machos causou nocicepção aguda, com pico em três horas após a cirurgia. Além disso, houve o aumento na expressão proteica e nos níveis de RNAm para o Cav2.3 na medula espinhal de camundongas fêmeas operadas, mas não nos machos operados. O tratamento intratecal com siRNA contra o Cav2.3 preveniu o desenvolvimento da nocicepção induzida pela cirurgia, com um efeito duradouro nas fêmeas. Detectamos também uma correlação nas fêmeas tratadas com siRNA entre a nocicepção pós-operatória e os níveis de RNAm para o Cav2.3. Doses altas isoladas de SNX-482, uma toxina que bloqueia seletivamente o Cav2.3, e de morfina reverteram a nocicepção pós-operatória, mas também induziam efeitos adversos. Enquanto a combinação de baixas doses de SNX-482 e morfina reverteram a nocicepção pós-operatória com efeito prolongado em fêmeas e em machos sem induzir efeitos adversos. Nossos resultados demonstram que o Cav2.3 tem um papel pró-nociceptivo na indução da dor pós-operatória indicando seu potencial como alvo terapêutico para o tratamento da dor pós-operatória.

Palavras-chave: CCDV tipo R, Cav2.3, *CACNA1E*, dor pós-operatória.

ABSTRACT

The number of surgical procedures has increased in recent years. More than 80% of the patients experience acute pain after a surgical procedure and approximately 70% of these patients report moderate to severe pain even after the application of the pain treatment for surgical procedure protocols. The gold standard treatment for pain in surgical procedures is opioids. Although, the development of adverse effects is one of the limitations of opioid therapy. Voltage-gated calcium channels (VGCC) have an important role in pain development and maintenance. Although, the participation of VGCC Cav2.3 (R-type) in pain and analgesia remains incompletely understood. Some studies reported the association of single-nucleotide polymorphisms in the Cav2.3 gene (*CACNA1E*) with postoperative pain and opioid consumption. Our study aimed to identify Cav2.3 as a potential target to treat postoperative pain and to reduce opioid-related side effects in a mice model. Paw incision in female or male mice caused acute nociception, which peaked 1 to 5 hours after surgery, as well as increased Cav2.3 mRNA expression at the spinal cord, but not at the incised tissue. The intrathecal treatment with a siRNA against Cav2.3, but not a scrambled siRNA, prevented the development of surgery-induced nociception with a long-lasting effect in female mice. Moreover, we detected a positive correlation between postoperative hyperalgesia and spinal Cav2.3 expression. High doses of either intrathecal SNX-482 (a toxin that selectively blockade Cav2.3) or morphine injected alone reversed postoperative nociception but also induced adverse effects. The association of low doses of morphine plus SNX-482 long-lastingly reversed nociception induced by incision in female or male mice. Our results demonstrated that Cav2.3 has a pronociceptive role in the induction of postoperative pain indicating that it is a potential target for the development of newer, safer, and more effective drugs for the treatment of postoperative pain.

Key words: VGCC r-type, Cav2.3, *Cacna1e*, post-operative pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação e representação da estrutura dos CCDV.	20
Figura 2 – Inibição do Cav2.3 por moléculas com efeito analgésico/antinociceptivo.	27
Figura 3 – Nocicepção induzida pela incisão plantar..	47
Figura 4 – Níveis de RNAm no modelo de dor pós-operatória.....	49
Figura 5 – Tratamento com <i>Cacna1e</i> -siRNA no modelo de dor pós-operatória.....	51
Figura 6 – Correlação entre os níveis de hiperalgesia e os níveis de <i>Cacna1e</i> ppós tratamento com <i>Cacna1e</i> -siRNA.....	53
Figura 7 – Níveis de RNAm após o tratamento com <i>Cacna1e</i> -siRNA..	54
Figura 8 – Efeito antinociceptivo do tratamento com morfina no modelo de dor pós- operatória.....	56
Figura 9 – Comparação sexual do feito antinociceptivo da morfina no modelo de dor pós-operatória..	58
Figura 10 – Efeito antinociceptivo do tratamento com SNX-482 no modelo de dor pós- operatória.....	60
Figura 11– Comparação sexual do feito antinociceptivo do SNX-482 no modelo de dor pós-operatória.....	62
Figura 12 – Efeito intratecal de doses sub efetivas de morfina e SNX-482 no modelo de dor pós-operatória.....	63
Figura 13 – Efeito antinociceptivo da combinação de doses sub efetivas de morfina e SNX-482 no modelo de dor pós-operatória.....	65
Figura 14 – Comparação sexual do feito antinociceptivo da combinação de morfina e SNX-482 no modelo de dor pós-operatória.....	67
Figura 15 – Tratamento com combinação de morfina e SNX-482, 24 horas pós cirurgia.....	68
Figura 16 – Efeito antinociceptivo do pré-tratamento com a combinação de morfina e SNX-482 no modelo de dor pós-operatória.....	69
Figura 17 – Efeito do tratamento intraplantar com SNX-482 no modelo de dor pós- operatória.....	71
Figura suplementar 1 – Fluxograma revisão	95

Figura suplementar 2 – Nocicepção induzida pelo modelo NS-HIV.....	97
Figura suplementar 3 – Efeito antinociceptivo do tratamento com pregabalina ou SNX-482 no NS-HIV.....	98
Figura suplementar 4 – Tratamento com SNX-482 local no NS-HIV.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão do Cav2.3 nas vias de transmissão da dor.	23
Tabela 2 – Inibição direta das correntes tipo R em cultura de células por moléculas com efeito analgésico/antinociceptivo.	24
Tabela 3 – Inibição indireta das correntes tipo R em cultura de células por moléculas com efeito analgésico/antinociceptivo.	26
Tabela 4 – Modulação do Cav2.3 na transmissão nociceptiva.	28
Tabela 5 – Modulação do Cav2.3 em modelos animais de dor.	29
Tabela 6 – Primers utilizados para verificação dos níveis de RNAm.	43
Tabela suplementar 1 – Estratégia de busca usada na revisão.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT1B – receptor de 5-hidroxitriptamina

AAVs-shRNA = Adeno virus associado a shRNA

Actb – Gene que codifica β -actina

Aif1 – Fator inflamatório 1 (do inglês, *Allograft inflammatory factor 1*)

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais

AMB – Comportamento afetivo motivacional (do inglês, *Affective-motivational behavior*)

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*)

Atf3 - Fator de transcrição dependente de AMP cíclico (do inglês, *Cyclic AMP-dependent transcription factor*)

B – Basal

BCA – Ensaio proteico (do inglês, *Bicinchoninic acid assay*)

Cacna1a – Gene que codifica Cav2.1

Cacna1b – Gene que codifica Cav2.2

Cacna1e – Gene que codifica Cav2.3

Cav – Canal ativado por voltagem

CCDV – Canais de cálcio dependentes de voltagem

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

c-FOS – Proto-oncogene

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, *Calcitonin Gene-Related Peptide*)

Cq – Ciclo de quantificação

CRISPR – Conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

d4T – Estavudina

E.P.M. – Erro padrão da média

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FDA – Administração de Drogas e Alimentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

GABA_B – receptor do ácido-gama-aminobutírico tipo B

Gal – gene repórter do Cav2.3

GFAP – proteína ácida fibrilar glial (do inglês, *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GRD – Gânglio da raiz dorsal

GRK2 = Receptor de quinase 2 acoplado a proteína G

H – Horas

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*)

IB4 – Isolectina B4

LaFEX – Laboratório de Farmacologia Experimental

LIM – Laboratório de Imunologia

LVA – Ativado por baixa voltagem (do inglês, *Low voltage-activated*)

Min – minutos

N – Número amostral

NF200 – Neurofilamento 200

NGF – Fator de crescimento do nervo (do inglês, *Nerve Growth Factor*)

NK1 – Receptor de neurocinina 1 (do inglês, *Neurokinin 1*)

NMDA – Receptor de glutamato N-metil D-aspartato

NS-HIV – Neuropatia sensorial associada ao HIV

NTSR2 – Receptor de neotensina do tipo 2 (do inglês, *Neurotensin receptor 2*)

ODN-AS – Oligonucleotídeo antisentido

Oprk1 – Gene que codifica receptor kappa-opioide (KOR)

Oprm1 – Gene que codifica receptor mu-opioide (MOR)

P – Fosforilação (do inglês, *Phosphorylation*)

PAG - Substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *Periaqueductal gray*)

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

Pdyn – Gene que codifica prodinorfina

Penk – Gene que codifica encefalina

PKC – Proteína quinase C

POP – modelo de dor pós-operatória (do inglês, *Post-operative pain*)

PSNL – modelo de neuropatia de ligação parcial do nervo ciático (do inglês *Partial sciatic nerve ligation*)

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

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

RNA_m – RNA mensageiro

RVM – Bulbo rostral ventromedial (do inglês, *Rostral ventromedial medulla*)

SIP – Sem intervenção prévia

siRNA – RNA de interferência

SNC – Sistema Nervoso Central

SNL – modelo de neuropatia de ligação do nervo espinhal (do inglês, *Spinal Nerve Ligation*)

Src – Proto-oncogene tirosina-proteína quinase Src

SSTR2 – Receptor de somatostatina tipo 2 (do inglês, *Somatostatin receptor 2*)

TNBS – Ácido trinitrobenzenossulfônico (do inglês, *Trinitrobenzenesulfonic acid*)

TrkA – Receptor de tropomiosina quinase A (do inglês, *Tropomyosin receptor kinase A*)

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

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Dor.....	15
1.2. Canais de cálcio voltagem dependentes	19
1.3. Expressão do Cav2.3 em vias de transmissão da dor	22
1.4. Inibição das correntes tipo R por moléculas com efeito analgésico/antinociceptivo.....	23
1.5. Modulação do Cav2.3 na transmissão nociceptiva	27
1.6. Modulação do Cav2.3 em modelos de dor em animais.....	28
1.7. Participação do Cav2.3 em condições de dor na clínica	32
1.8. Dor pós-operatória	33
2. HIPÓTESE	36
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos Específicos	36
4. METODOLOGIA.....	37
4.1. Animais.....	37
4.2. Fármacos e Reagentes	38
4.3. Modelo de dor pós-operatória	39
4.4. Avaliações comportamentais	39
4.4.1. Avaliações de efeitos adversos	40
4.4.2. Avaliação do comportamento de guarda da pata.....	40
4.4.3. Avaliação da hiperalgesia mecânica pelo teste de von Frey	40
4.4.4. Comportamento Afetivo Motivacional (AMB) relacionado a dor.....	41
4.5. Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	41
4.5.1. Extração de RNA total.....	41
4.5.2. Reação de transcriptase reversa (RT-PCR).....	42
4.5.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	42

4.5.4. Análise dos resultados.....	43
4.6. Verificação proteica por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	44
4.7. Análises Estatísticas	44
5. RESULTADOS	46
5.1. Caracterização do modelo de dor pós-operatória (POP) em camundongos	46
5.2. Efeito do silenciamento gênico do Cav2.3 na dor pós-operatória.....	49
5.3. Efeito do pós-tratamento intratecal com morfina na dor pós-operatória	54
5.4. Efeito do pós-tratamento intratecal com o bloqueador do Cav2.3 na dor pós-operatória.....	58
5.5. Efeito do pós-tratamento com a combinação de doses sub efetivas de morfina e SNX-482 na dor pós-operatória	62
5.6. Efeito do tratamento com a combinação em diferentes tempos na dor pós-operatória	67
5.7. Efeito do tratamento intraplantar com o bloqueador do Cav2.3 na dor pós-operatória .	69
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE I.....	96
APÊNDICE II.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor

Os processos dolorosos afetam milhões de pessoas e são a principal causa de procura aos serviços de saúde por todo o mundo. Um estudo relatou que em 2013 condições dolorosas foram a terceira principal causa de gastos em saúde e em 2016 americanos gastaram cerca de 380 bilhões de dólares em seu tratamento (DIELEMAN et al., 2016). Nos EUA entre 2007 a 2017 dos dez problemas de saúde que mais causam incapacidade e prejudicam a vida dos pacientes, dois estão relacionadas diretamente com dor (Global Burden of Disease, 2017). 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, ou semelhante, a um dano tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). A dor engloba o processo de codificação do estímulo nocivo (nocicepção), mas também engloba as experiências pessoais que são influenciadas pela variação biológica, psicológica e por fatores sociais (LOESER; TREEDE, 2008). Apesar de desempenhar papel protetor/fisiológico contra estímulos com potencial de produzir lesão tecidual (p.ex. um objeto aquecido), em muitas condições clínicas a dor exerce um papel patológico debilitante, como ocorre após lesões de nervos (dor neuropática) ou após cirurgias (dor pós-operatória) (ARMITAGE; BERRY, 1987).

A dor apresenta variações em sua intensidade podendo ser de intensidade leve, moderada ou intensa, pode variar quanto a sua causa podendo ser decorrente de doenças metabólicas como diabetes mellitus, neoplasias, decorrente de lesão nervosa traumática. De acordo com a duração, a dor pode ser aguda que seria a dor que ocorre imediatamente após lesão ou doença e ainda podendo ser crônica que ocorre quando a dor persiste por mais de três meses. Quanto a localização a dor pode ser somática, que é uma dor superficial que atinge tecidos como pele, músculo e articulações ou ainda a dor visceral que é uma dor profunda e difusa que atinge as vísceras. Em relação ao sexo também há variedade na dor, pois diferentes tipos de dor podem levar a uma maior prevalência em determinado sexo, como por exemplo a dor pós-operatória é mais frequente em mulheres (BOEZAART et al., 2021; LATREMOLIERE; WOOLF, 2010).

A IASP classifica dor em nociceptiva, que é a dor que ocorre de um dano tecidual não neuronal real ou iminente e que ativa os nociceptores. Esse termo é

usado para descrever a dor que ocorre em um sistema nervoso somatossensorial que funciona normalmente. Nesse conceito está contida as dores inflamatórias que tem função de proteger o organismo, mas pode perder essa função quando não há resolução dessa inflamação. Nesse caso a sensibilidade sensorial é aumentada após danos aos tecidos de maneira a auxiliar a recuperação do local lesionado. A artrite reumatoide é um exemplo de dor inflamatória e a dor pós-operatória possui componentes de dor inflamatória (WOOLF, 2010).

A dor nociplástica é uma dor que ocorre em decorrência de uma alteração na nocicepção apesar de nenhuma evidência clara de dano tecidual, doença ou lesão que afete o sistema somatossensorial, como por exemplo é o caso da enxaqueca e da fibromialgia. Os mecanismos envolvidos nesse tipo de dor ainda não foram completamente elucidados (FITZCHARLES et al., 2021).

Além dessas, ainda temos a dor neuropática que é uma dor que ocorre devido a uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial. A dor neuropática tem etiologias diversas, podendo ser causada por lesão nervosa relacionada a trauma ou tumor, por desordens metabólicas como é o caso da neuropatia diabética, por infecções virais como a neuropatia relacionada ao vírus da imunodeficiência adquirida (do inglês *Human Immunodeficiency Virus* – HIV) e ao herpes vírus, entre outras causas. Essa dor é uma consequência grave e complexa de dano nervoso acompanhada de alterações no sistema nervoso central e periférico (ATTAL; BOUHASSIRA; BARON, 2018).

Além do mais, existem alguns tipos de dor que podem ser descritos como mistos, pois os pacientes apresentam características de mais de um tipo de dor. Um exemplo é a dor pós-cirúrgica, que exhibe respostas inflamatórias decorrentes da incisão e apresenta lesões nervosas decorrentes dos mecanismos de sensibilização periférica e central. Assim, a dor pós-operatória persistente é considerada uma dor mista, por exibir características de mais de um tipo de dor (RICHEBÉ; CAPDEVILA; RIVAT, 2018).

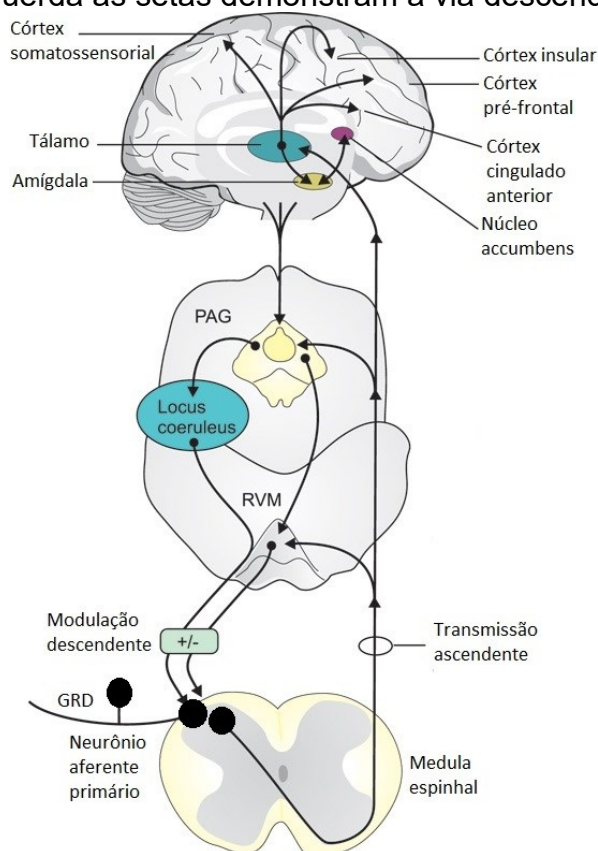
Estímulos como compressão, frio, calor e algumas substâncias químicas são interpretados como estímulos nociceptivos. Esses estímulos nociceptivos são detectados na periferia pelos nociceptores, que transmitem este estímulo até a medula espinhal. Existem duas principais classes de nociceptores, uma composta por neurônios não mielinizados, as fibras C, e outra formada por neurônios finamente mielinizados, as fibras A δ . As fibras A δ diferem das fibras mielinizadas de grande

diâmetro, as fibras A β , que respondem a estímulos mecânicos inócuos, como um leve toque. Os corpos celulares dos nociceptores ficam em sua maioria no gânglio da raiz dorsal (GRD) para os neurônios que inervam o corpo, no gânglio trigeminal (GT) para os neurônios que inervam a cabeça e nos gânglios nodoso e vagal para os neurônios que inervam os tecidos viscerais. As fibras C são nociceptores polimodais, que respondem a várias formas de estímulos nocivos (térmicos, mecânicos e químicos). Essas fibras são classificadas em dois grupos de acordo com seu conteúdo de peptídeos. As fibras C que expressam o receptor purinérgico P2X₃ e sítios de ligação para a isolectina B4 (IB4), são classificadas como fibras C não-peptidérgicas. O outro grupo de fibras C sintetiza peptídeos como substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês *Calcitonin Gene-Related Peptide* – CGRP) e expressa receptores TrkA para o fator de crescimento do nervo (do inglês *Nerve Growth Factor* – NGF) (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010).

Os estímulos nocivos são detectados pelos nociceptores e geram um potencial de ação que é conduzido até o corno dorsal da medula espinhal. Na medula espinhal ocorrerá uma sinapse entre essa fibra nervosa e neurônios de segunda ordem ocorrendo a liberação de neurotransmissores excitatórios, tais como substância P e glutamato, que irão estimular os neurônios de segunda ordem. Uma vez estimulados, os neurônios de segunda ordem irão ativar vias paralelas que irão distribuir informações para circuitos supraespinhais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais e afetivo-motivacionais da dor. Os axônios ascendem através da via espinotalâmica, responsável pela atividade discriminatória do estímulo, terminam no tálamo e posteriormente são projetados para o córtex. A segunda via percorrida pelos axônios provenientes do corno dorsal da medula espinhal é a via espinoparabraquial amigdaloide que termina no núcleo parabraquial e tem projeções para hipotálamo e amígdala e substância cinzenta periaquedutal (do inglês *Periaqueductal Gray* – PAG), que é relevante para a modulação das dimensões afetivas da experiência dolorosa. Algumas áreas encefálicas regulam a via descendente da dor, onde ocorre a ativação do sistema opioide, que são sensíveis ao opioides endógenos e inclusive opioides exógenos, ocorrendo a supressão da dor na medula espinhal, resultando em analgesia (BASBAUM et al., 2009) (Figura 1). Nas dores patológicas ocorrem alterações na transmissão nas vias de dor, culminando nos mecanismos de sensibilização periférica e central. A sensibilização periférica ocorre no local da lesão tecidual, causando alteração nos limiares de dor,

aumentando a resposta a estímulos considerados nocivos e aumentando a resposta dolorosa (WOOLF, 2012; VAN DEN BROEKE *et al.*, 2015). A sensibilização central é uma forma de neuroplasticidade que causa responsividade aumentada dos neurônios nociceptivos no SNC, especialmente da medula espinhal (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 disso, a transmissão dos estímulos mecânicos pelas fibras A β passam a ser interpretadas como estímulo doloroso. Além disso, esses neurônios passam a exibir mudanças na transcrição, propriedades de membrana, crescimento e neurotransmissão (GILRON; JENSEN; DICKENSON, 2013). Com esses mecanismos, os pacientes acometidos por estas dores patológicas desenvolvem dor a estímulos antes inócuos (alodínia), percepção exacerbada a dor a estímulos dolorosos (hiperalgesia) e dor espontânea, descrita como dor em queimação ou choque (CRUCCU *et al.*, 2010).

Figura 1 – Principais vias envolvidas na transmissão da dor. A direita as setas indicam a via ascendente e a esquerda as setas demonstram a via descendente.



GRD = Gânglio da raiz dorsal; RVM = Bulbo rostral ventromedial e PAG = Substância cinzenta periaquedutal.

Fonte: Adaptado de Brodin, 2016.

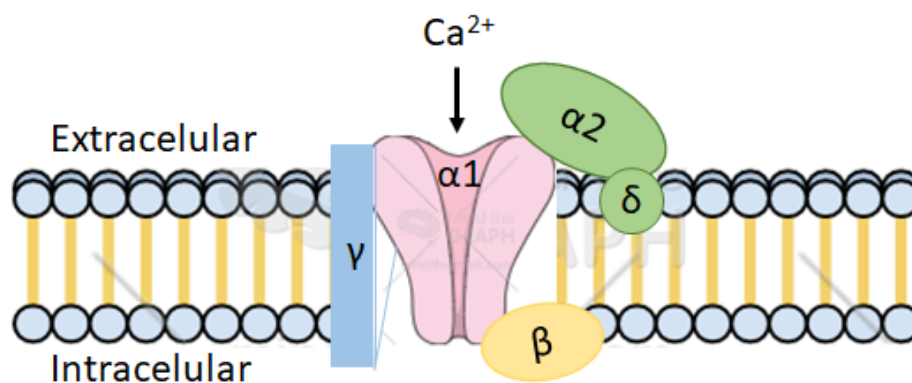
1.2. Canais de cálcio voltagem dependentes

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) são importantes mediadores do influxo de cálcio em células excitáveis, como os neurônios. Esses canais são expressos em sua maioria na membrana plasmática das células e são necessários para várias funções celulares como regulação da liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios, transcrição gênica, entre outros (SIMMS; ZAMPONI, 2014). OS CCDV são ativados pela despolarização da membrana e são classificados de acordo com suas propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas em ativados por baixa voltagem (do inglês *Low Voltage Activated* – LVA) que abrem em potenciais de membrana de menor intensidade e os canais ativados por alta voltagem (do inglês *High Voltage Activated* – HVA) que necessitam de uma ampla despolarização para abrirem. Dentro os canais ativados por alta voltagem temos os canais do tipo L (que produzem correntes de longa duração), os canais do tipo P/Q (que foram isolados primeiramente em células de Purkinje), os canais do tipo N (encontrados principalmente em tecidos neuronais) e os canais do tipo R (que produzem correntes farmacologicamente resistentes). Os canais ativados por baixa voltagem são representados pelos canais do tipo T (produzem correntes do tipo transitórias) (CATTERALL, 2011; ZAMPONI et al., 2015). Canais ativados por alta voltagem são formados pela subunidade principal α_1 , que é a subunidade formadora do poro e pelas subunidades auxiliares ($\alpha_2\delta$, β e γ), enquanto os canais ativados por baixa voltagem podem ser formados somente pela subunidade principal α_1 , sem necessidade das subunidades auxiliares para serem funcionais (ZAMPONI et al., 2015). O genoma de mamíferos codifica 10 diferentes subunidades α_1 , estas são nomeadas e subdivididas em famílias baseado em sua homologia: família 1 (Cav1.1-1.4) produzem as correntes do tipo L, membros da família 2 produzem as correntes do tipo P/Q (Cav2.1), tipo N (Cav2.2) e tipo R (Cav2.3), enquanto a família 3 (Cav3.1-3.3) produzem as correntes do tipo T (DOLPHIN, 2016) (Figura 2).

A família de canais Cav2 são encontrados principalmente em tecidos neuronais, especialmente nas vias de transmissão da dor, como por exemplo nos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro e no corno dorsal da medula espinhal, sugerindo uma participação importante desta família de canais na transmissão da dor (ZAMPONI et al., 2015).

Figura 2 – Classificação e representação da estrutura dos CCDV. A – Classificação dos CCDV de acordo com a subunidade $\alpha 1$ formadora, gene codificante e corrente produzida. B – Representação das subunidades formadoras dos CCDV ($\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β e γ).

	Canal	Gene	Corrente
A	Cav1.1	CACNA1S	Tipo L
	Cav1.2	CACNA1C	
	Cav1.3	CACNA1D	
	Cav1.4	CACNA1F	
	Cav2.1	CACNA1A	Tipo P/Q
	Cav2.2	CACNA1B	Tipo N
	Cav2.3	CACNA1E	Tipo R
	Cav3.1	CACNA1G	Tipo T
	Cav3.2	CACNA1H	
	Cav3.3	CACNA1I	



Fonte: Autora, 2022.

A participação da família de Cav2 na transmissão da dor é evidenciada através da utilização clínica de alguns compostos com atividade analgésica. Os gabapentinóides (gabapentina e pregabalina), são analgésicos que possuem como alvo as subunidades auxiliares $\alpha 2\delta$ dos CCDV, levando a diminuição da amplitude das correntes de cálcio, gerando uma alteração no tráfego desses canais e são utilizados clinicamente para o tratamento das dores neuropáticas (DOLPHIN, 2016). Foram identificados 4 subtipos de subunidade $\alpha 2\delta$ ($\alpha 2\delta$ -1 a $\alpha 2\delta$ -4) e os gabapentinóides agem nos subtipos $\alpha 2\delta$ -1 e $\alpha 2\delta$ -2 que são altamente associados com os canais HVA (ZAMPONI et al., 2015). Toxinas peptídicas que bloqueiam o Cav2.1 (como a ω -conotoxina MVIIC e a ω -Agatoxina IVA) demonstraram efeitos antinociceptivos em modelos animais de dor. No entanto, o bloqueio do Cav2.1 por essas toxinas leva ao surgimento de efeitos adversos graves como paralisia e flacidez muscular, o que impossibilita o uso dessas toxinas na clínica (DALMOLIN et al., 2011; MALMBERG; YAKSH, 1994). A ziconotida (Prialt®) é a versão sintética da ω -

conotoxina MVIIA que produz um uma inibição potente e seletiva do Cav2.2 (E. BROOKES; ELDABE; BATTERHAM, 2016). A administração intratecal de ziconotida produz efeitos antinociceptivos em uma ampla gama de modelos animais e foi aprovado pelo FDA (do inglês *Food Drug Administration*) para o tratamento da dor crônica grave (MOGIL; DAVIS; DERBYSHIRE, 2010; WALLACE et al., 2008). A ziconotida foi a primeira droga bloqueadora de CCDV aprovada para o uso clínico no tratamento de dores crônicas e representa uma forma inovadora de intervir nos mecanismos relacionados a dores crônicas. Entretanto, ela apresenta limitações visto que possui uma janela terapêutica estreita, precisa ser administrada por via intratecal por ser tratar de uma toxina peptídica e produz efeitos adversos como hipotensão postural, sedação e agitação (STAATS et al., 2004). Esses exemplos com toxinas destacam o uso clínico dos canais de cálcio da família Cav2 como alvos analgésicos.

Diferente do que ocorre com o Cav2.1 e Cav2.2, a participação do Cav2.3 na transmissão da dor é menos evidenciada. No sistema nervoso central (SNC), o Cav2.3 participa da plasticidade sináptica e na liberação de neurotransmissores (WORMUTH et al., 2016). De fato, a literatura que relaciona o Cav2.3 com dor e analgesia ainda é muito escassa. Assim, realizamos uma revisão de escopo para identificar as evidências nesta área.

Recentemente, o número de revisões de escopo vem aumentando, apesar de serem semelhantes às revisões sistemáticas, as revisões de escopo são realizadas por motivos diferentes e possuem diferenças na abordagem metodológica. Uma revisão de escopo pode ser realizada para identificar os tipos de evidências disponíveis em determinada área, esclarecer conceitos da literatura, examinar como a pesquisa é conduzida em uma determinada área de conhecimento e pode ser conduzida como precursora de uma revisão sistemática (PHAM et al., 2014). Na nossa revisão de escopo seguimos uma estratégia de busca, com critérios de inclusão e exclusão (ver metodologia da revisão de escopo em Apêndice I). Por termos encontrado artigos com características e objetivos muito distintos, classificamos os artigos encontrados nessa revisão em cinco categorias. A primeira categoria são os estudos que verificaram a expressão do Cav2.3 em vias relacionadas a transmissão da dor. Na segunda categoria agrupamos estudos que utilizaram cultura de células de neurônios que expressam o Cav2.3 que verificaram a inibição das correntes tipo R por moléculas que possuem algum efeito tipo-analgésico. A terceira categoria de estudos temos os estudos que utilizaram bloqueadores do canal Cav2.3 e verificaram

sua modulação na transmissão nociceptiva. Como quarta categoria temos os estudos que utilizaram ferramentas que modulam o Cav2.3 e verificaram o surgimento de efeito tipo analgésico em modelos animais de dor. Como quinta categoria temos os estudos que verificaram a participação do Cav2.3 em condições dolorosas na clínica.

1.3. Expressão do Cav2.3 em vias de transmissão da dor

Evidências indicam expressão do Cav2.3 em gânglios sensoriais, incluindo GRD e nervo trigeminal, em nível de RNAm e proteína. Um estudo utilizou uma injeção com um micro RNA que causou a redução da expressão do Cav2.3 no GRD e gerou um efeito pronociceptivo (GANDLA et al., 2017). Além disso, há evidências demonstrando a co-expressão nos gânglios sensoriais do Cav2.3 com alguns marcadores e receptores relacionados a dor, como por exemplo com os receptores GABA_B, TRPV1, NTSR2 e com o canal Cav2.2. Encontramos evidências que demonstram a co-marcação do Cav2.3 com marcadores para corpos celulares de fibras C não peptidérgicas (IB4+), fibras C peptidérgicas (IB4, substância P e TrkA) e para fibras A β (NF200) (CASTRO et al., 2017; FANG et al., 2007, 2010; MARTIN et al., 2021; MURAKAMI et al., 2001; QIAN et al., 2013; SAEGUSA et al., 2000).

Estudos demonstram a expressão do Cav2.3 na medula espinhal, principalmente na porção pré-sináptica (MARTIN et al., 2021; MURAKAMI et al., 2001; SAEGUSA et al., 2000; YANG et al., 2004). Apesar disso, a expressão do Cav2.3 se manteve inalterada no corno dorsal da medula em camundongos submetidos a um modelo de neuropatia traumática (MARTIN et al., 2021). Na verdade, relatos demonstram a expressão do Cav2.3 em estruturas supraespinhais que estão relacionadas com a transmissão da dor como PAG, hipotálamo e amígdala (SAEGUSA et al., 2000; YOKOYAMA et al., 1995). Um estudo relatou que os níveis de RNAm para o gene *Cacna1e*, que codifica o Cav2.3, se encontram aumentados no corno dorsal da medula de ratos após axotomia (YANG et al., 2004). Há relatos que demonstram a expressão do Cav2.3 no sistema nervoso entérico, mais precisamente em neurônios aferentes primários intrínsecos (NEEDHAM et al., 2010).

Assim, esses estudos demonstram que o Cav2.3 é expresso nas vias de transmissão da dor e co-expresso com receptores envolvidos em sua transmissão.

Tabela 1 - Expressão do Cav2.3 nas vias de transmissão da dor.

<i>Localização</i>	<i>Referência</i>	<i>Achados</i>
Gânglios sensoriais	(SAEGUSA et al., 2000)	Gene reporter do Cav2.3 (Gal) expresso no GRD e possui co-expressão com substância P e IB4+
	(MURAKAMI et al., 2001)	Cav2.3 (RNAm) detectado no GRD de camundongos
	(FANG et al., 2007, 2010)	Co-expressão do Cav2.3 (mRNA) com TrkA e com TRPV1 em GRD e no nervo trigeminal de ratos
	(QIAN et al., 2013)	Expressão do Cav2.3 no GRD de ratos isolados após modelo de hipersensibilidade visceral induzido por TNBS
	(CASTRO et al., 2017)	Co-expressão do Cav2.3 (RNAm e proteína) com o receptor GABA _B e com o Cav2.2 em GRD de humanos e de camundongos
	(GANDLA et al., 2017)	Cav2.3 (proteína) expresso em neurônios (PGP+) e em células satélites (GFAP+) de camundongos. Co-expressão do Cav2.3 com marcadores IB4+, NF200 e com SP no GRD
	(MARTIN et al., 2021)	Co-expressão Cav2.3 (RNAm) com receptor NTSR2 no GRD de camundongos
Medula espinhal	(WESTENBROEK; HOSKINS; CATTERALL, 1998)	Cav2.3 (proteína) expresso no corpo celular dos neurônios no corno dorsal da medula de ratos
	(SAEGUSA et al., 2000)	Gene reporter do Cav2.3 expresso no corno dorsal da medula (laminae I-III) de camundongos. Co-expressão do Cav2.3 com terminais IB4+ e IB4-
	(MURAKAMI et al., 2001)	Cav2.3 (proteína) expresso no corno dorsal da medula de camundongos
	(YANG, et al., 2004)	Cav2.3 (RNAm) foi detectado no corno dorsal da medula de ratos naïve
	(MARTIN et al., 2021)	Cav2.3 (proteína) foi detectado na fração pré-sináptica da medula espinhal
Estruturas supra-espinhais	(YOKOYAMA et al., 1995)	Cav2.3 (proteína) exibiu coloração mais proeminente no tálamo, hipotálamo e amígdala de ratos
	(SAEGUSA et al., 2000)	Gene reporter do Cav2.3 expresso na PAG, mas não no núcleo da rafe de camundongos
Sistema nervoso entérico	(NEEDHAM et al., 2010)	Cav2.3 (proteína) expresso em neurônios aferentes primários intrínsecos de porquinhos-da-índia

RNAm = RNA mensageiro; GRD = gânglio da raiz dorsal; IB4 = Isolectina B4; SP = Substância P; GABA_BR = receptor do ácido-gama-aminobutírico tipo B; TrkA = Receptor de tropomiosina quinase A; TRPV1 = Receptor de potencial transitório catiônico da subfamília V membro 1; GFAP = Proteína glial fibrilar ácida; NF200 = Neurofilamento 200; NTSR2 = Receptor de neurotensina tipo 2; TNBS = ácido trinitrobenzenossulfônico; PGP = do inglês Protein Gene Product.

1.4. Inibição das correntes tipo R por moléculas com afeito analgésico/antinociceptivo

Há estudos em cultura de células que expressam heterologicamente o Cav2.3 e cultura de neurônios sensoriais que expressam nativamente o Cav2.3 que demonstram a atividade de alguns compostos com efeitos analgésicos ou antinociceptivos no bloqueio das correntes R de forma direta ou indireta (Tabela 2 e 3). Dentre os compostos que bloqueiam as correntes R de forma direta temos alguns peptídeos extraídos do veneno de animais peçonhentos (FANG et al., 2007; LEÃO et al., 2000; MURAKAMI et al., 2004) (Tabela 2). Toxinas extraídas dos venenos de

aranhas, cobras e caracóis marinhos vêm sendo amplamente estudadas como possíveis bloqueadores dos CCDV. Como é o caso do bloqueador farmacológico das correntes do tipo R, o SNX-482. Este peptídeo formado por 41 aminoácidos é extraído do veneno da aranha africana *Hysteroocrates gigas* (NEWCOMB et al., 1998). Estudos *in vitro* demonstram que o SNX-482 é altamente seletivo para o canal Cav2.3, assim o SNX-482 a única molécula identificada até o momento que é capaz de bloquear de maneira seletiva o Cav2.3. No entanto, em concentrações elevadas o SNX-482 pode sofrer alterações na sua seletividade e bloquear outros canais, assim como ocorre com bloqueadores dos outros CCDV que também possuem sua seletividade alteradas de acordo com a variação da sua concentração (NEWCOMB et al., 1998). Além de tudo, o SNX-482 não é capaz de bloquear todas as correntes do tipo R, restando algumas correntes remanescentes, conhecidas como correntes sensíveis e não sensíveis ao SNX-482 (NEWCOMB et al., 2000).

Além do SNX-482, a PnTx3-3 é uma toxina extraída de uma fração do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* que parece bloquear as correntes tipo R (Tabela 2). Temos também o peptídeo sintético TAT-CBD3A6K, a fisalina F que é um esteroide derivado de planta e todas essas moléculas e são capazes de inibir diretamente as correntes do tipo R e demonstraram efeito tipo analgésico em modelos de dor em roedores (PIEKARZ et al., 2012; SHAN et al., 2019). O eugenol também é um derivado de planta que bloqueia diretamente as correntes do tipo R e é utilizado em pacientes durante em procedimentos odontológicos (CHUNG et al., 2008) (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2 – Inibição direto das correntes tipo R em cultura de células por moléculas com efeito analgésico/antinociceptivo.

<i>Tipo de célula</i>	<i>Referência</i>	<i>Achados</i>	<i>Implicações na dor</i>
Bloqueio Direto			
Células HEK293 expressando o Cav2.3 com ou sem TRPV1	(CHUNG et al., 2008)	Eugenol derivado de planta inibiu as correntes do tipo R, efeito inalterado pelo TRPV1	Eugenol tópico usado como anestésico/analgésico na odontologia
GRD e GT de ratos e camundongos	(FANG et al., 2007; MURAKAMI et al., 2004)	SNX-482 seletivamente inibiu as correntes do tipo R com eficácia variada em diferentes neurônios	SNX-482 causou efeito antinociceptivo em modelos de dor em animais
Grânulo cerebellar de ratos	(LEÃO et al., 2000)	Toxina PnTx3-3 inibiu as correntes tipo R de maneira não seletiva (R > N)	PnTx3-3 causou efeito antinociceptivo em modelos de dor em animais
GRD de ratos	(PIEKARZ et al., 2012)	O peptídeo sintético TAT-CBD3A6K inibiu as correntes do tipo R e T em neurônios de pequeno diâmetro	TAT-CBD3A6K causou efeito antinociceptivo em modelos de dor em animais

(SHAN et al., 2019)	O esteroide derivado de planta Fisolina F inibiu as correntes tipo N e R (N > R)	Filasina F causou efeito antinociceptivo em modelos de dor em animais
---------------------	--	---

Algumas moléculas que possuem efeito analgésico em pacientes são capazes de bloquear as correntes tipo R de maneira indireta (Tabela 3). Dentre eles temos os fármacos opioides que são analgésicos clássicos, são utilizados para o tratamento da dor intensa, o fármaco baclofeno que é usado no tratamento da dor relacionada a espasticidade e se liga ao receptor do tipo GABA_B, os triptanos são usados para o tratamento da enxaqueca e se ligam aos receptores 5-HT_{1B} (BERECKI; MOTIN; ADAMS, 2016; BOURINET et al., 1996; FERRARI et al., 2002; MARATHE et al., 2021; MORIKAWA et al., 2006; OTTOLIA et al., 1998). A somatostatina, liga-se aos receptores SSTR₂, demonstrou efeito analgésico em um estudo em pacientes com dor relacionada ao câncer e a toxina contalaquina-G (CGX) se liga aos receptores NTS₂, demonstrou efeito analgésico em um estudo em pacientes com dor neuropática (MARTIN et al., 2021; MEHRKE et al., 1997; MOLLENHOLT et al., 1994; SANG; BARNABE; KERN, 2016). Esses compostos são capazes de inibir as correntes do tipo R através da sua ligação aos seus respectivos receptores, que irão ativar uma proteína Gi e irão bloquear as correntes tipo R através das subunidades $\beta\gamma$ da proteína Gi e pela ativação de vias dependentes de quinases, como GRK2 e a tirosina quinase (Tabela 3, Figura 2).

A capsaicina é utilizada topicamente na clínica para o tratamento de dores neuropáticas e é capaz de bloquear as correntes do tipo R de maneira dependente do seu receptor TRPV1 (CHUNG et al., 2008; GASKELL; DERRY; MOORE, 2014). A ativação do receptor para a substância neuropeptídica pronociceptiva (NK1) produz um efeito ambíguo: a ativação fraca desse receptor estimula o Cav2.3, enquanto ativação forte do NK1 bloqueia o Cav2.3 (MEZA et al., 2007). Clinicamente, o antagonismo dos receptores NK1 diminuem as náuseas e vômitos no pós-operatório, enquanto aumenta a tolerância analgésica em procedimentos ginecológicos laparoscópicos (KAKUTA et al., 2011) (Tabela 3, Figura 2).

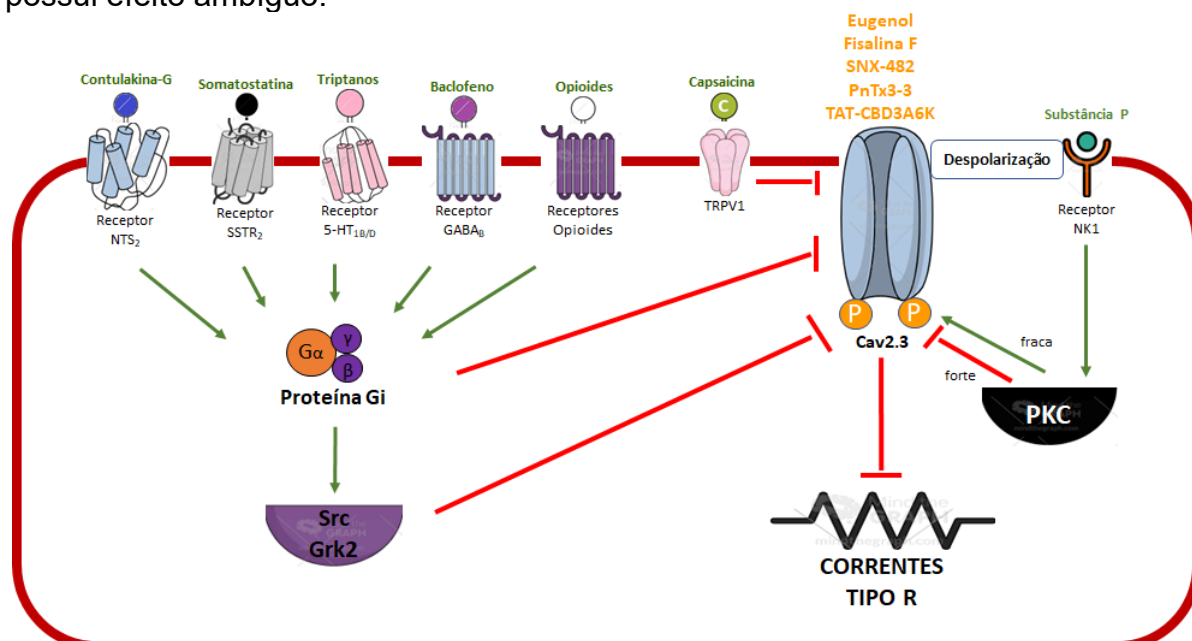
Como descrito, há vários compostos que produzem a inibição das correntes do tipo R, mas esses compostos possuem múltiplos alvos e por isso ainda é incerto se seu efeito analgésico ocorre devido a inibição do Cav2.3. Até o momento o único bloqueador seletivo identificado para o Cav2.3 é o SNX-482.

Tabela 3 – Inibição indireto das correntes tipo R em cultura de células por moléculas com efeito analgésico/antinociceptivo.

<i>Tipo de célula</i>	<i>Referência</i>	<i>Achados</i>	<i>Implicações na dor</i>
Bloqueio indireto			
<i>Xenopus oocytes co-expressando Cav2.3 e receptor μ-opioide de ratos</i>	(BOURINET et al., 1996)	Agonista seletivo do receptor μ -opioide não alterou as correntes tipo R	Opioides são os analgésicos padrão ouro para o tratamento de diversos tipos dores intensas
<i>Xenopus oocytes co-expressando Cav2.3 e receptor μ-opioide de murinos</i>	(OTTOLIA et al., 1998)	Agonista seletivo do receptor μ -opioide inibiu as correntes tipo R dependente das vias da proteína G	Opioides são os analgésicos padrão ouro para o tratamento de diversos tipos dores intensas
<i>Células HEK293 co-expressando Cav2.3 e receptores opioides ($\mu/\delta/\kappa$) de humanos</i>	(BERECKI; MOTIN; ADAMS, 2016)	Agonistas seletivos dos receptores opioides (μ , δ e κ) inibiram as correntes tipo R dependente da quinase GRK2	Opioides são os analgésicos padrão ouro para o tratamento de diversos tipos dores intensas
<i>Células HEK293 co-expressando Cav2.3 e receptor GABA_B de humanos</i>	(BERECKI et al., 2014)	Baclofeno ou α -conotoxina Vc1.1 inobem as correntes tipo R dependente de proteína G e da quinase Src	Baclofeno efeito analgésico em pacientes com espasticidade intensa (MARATHE et al., 2021) Vc1.1 efeito antinociceptivo em modelos de do em animais
<i>Células HEK293 co-expressando Cav2.3 e receptor NK1 de humanos</i>	(MEZA et al., 2007)	Fraca ativação do receptor NK1 estimula Cav2.3 de maneira dependente de PKC, mas uma forte ativação do receptor NK1 inibe Cav2.3	Antagonismo de receptor NK1 reduz dor pós-operatória (KAKUTA et al., 2011)
<i>Células HEK293 expressando Cav2.3 e TRPV1</i>	(CHUNG et al., 2008)	Capsaicina inibiu as correntes tipo R de maneira dependente de TRPV1	Capsaicina tópica é usada como analgésico em pacientes com dor neuropática (GASKELL; DERRY; MOORE, 2014)
<i>Células HEK293 expressando Cav2.3</i>	(MORIKAWA et al., 2006)	Zolmitriptano inibiu indiretamente as correntes tipo P/Q e R de maneira dependente do receptor 5-HT _{1B/1D} e da proteína Gi/o (P/Q > R)	Triptanos são o tratamento padrão ouro para enxaqueca (FERRARI et al., 2002)
<i>GT de ratos</i>	(MEHRKE et al., 1997)	Somatostatina inibiu as correntes tipo R dependente das vias da proteína G	Administração intratecal e epidural de somatostatina produziu analgesia em humanos com dor relacionada ao câncer (MOLLENHOLT et al., 1994)
<i>GRD de ratos</i>	(MARTIN et al., 2021)	Toxina contulakina-G inibiu as correntes tipo R e N via receptor NTSR2 (R > N)	Contulakina-G teve efeito analgésico em pacientes com injúria na medula espinhal (SANG; BARNABE; KERN, 2016)

GRK2 = Receptor de quinase 2 acoplado a proteína G; PKC = Proteína quinase C; NK1 = Receptor de neurocinina 1; 5-HT_{1B/1D} = receptor de 5-hidroxitriptamina; Src = Proto-oncogene tirosina-proteína quinase.

Figura 3 – Inibição do Cav2.3 por moléculas com efeito analgésico/antinociceptivo. Eugenol, finalina F, SNX-482, Tx3-3 e CBD3A6K bloqueiam o Cav2.3 de maneira direta. Opioides, baclofeno, triptanos, somatostatina e neurotensina ligam-se aos seus respectivos receptores e por mecanismos relacionados a ativação da proteína Gi e por vias de proteínas quinases causam o bloqueio do Cav2.3. Capsaicina bloqueia o Cav2.3 através da ativação do receptor TRPV1. Ativação do receptor NK1 possui efeito ambíguo.



NTS2R = Receptor de neurotensina do tipo 2; SSTR2 = Receptor de somatostatina tipo 2; HT1B/1D = receptor de 5-hidroxitriptamina; GABA_B = receptor do ácido-gama-aminobutírico tipo B; TRPV1 = Receptor de potencial transitório catiônico da subfamília V membro 1; NK1 = Receptor de neurocinina 1; GRK2 = Receptor de quinase 2 acoplado a proteína G; PKC = Proteína quinase C; Src = Proto-oncogene tirosina-proteína quinase Src; P = Fosforilação.

Fonte: Autora 2022.

1.5. Modulação do Cav2.3 na transmissão nociceptiva

Estudos utilizando bloqueadores do Cav2.3 demonstraram o efeito da inibição do Cav2.3 na transmissão nociceptiva. Dois estudos mostraram que no GRD de ratos controles, o SNX-482 reduziu as correntes de cálcio de pequeno diâmetro, mais especificamente as correntes do tipo R. No entanto, em ratos neuropáticos (do inglês *Spinal Nerve Ligation* – SNL) um primeiro estudo mostrou uma perda de sensibilidade frente ao SNX-482 e o segundo estudo a sensibilidade ao SNX-482 foi mantida mesmo nos ratos neuropáticos (FUCHS et al., 2007; MCCALLUM, 2011). Na medula espinhal de ratos e camundongos controles, o SNX-482 e a fisalina F reduziram a frequência de correntes pós-sinápticas (MARTIN et al., 2021; SHAN et al., 2019; YANG et al., 2013). No corno dorsal da medula, o bloqueio do Cav2.3 pelo SNX-482 e pela PnTx3-3 em modelos de dor neuropática inibiram as respostas neuronais mediadas por fibras C e Aδ. (DALMOLIN et al., 2017; MATTHEWS et al., 2007). Em

um estudo com camundongos tanto o SNX-482 quanto a α -conotoxina Vc1.1 foram capazes de inibir a despolarização do aferente sensorial no colón (CASTRO et al., 2017)

Com isso, há evidências demonstrando que o Cav2.3 é um importante mediador das funções neuronais na via aferente primária da dor e como esses canais são importantes para a transmissão nociceptiva (Tabela 4).

Tabela 4 – Modulação do Cav2.3 na transmissão nociceptiva.

<i>Tecido (Espécie)</i>	<i>Referência</i>	<i>Condição</i>	<i>Achados principais</i>
GRD fibras A/ Potencial de membrana celular (Rato)	(LIRK, 2008)	SIP	SNX-482 causou excitabilidade neuronal
GRD/ Liberação de neurotransmissores (Galinha)	(ROZANSKI et al., 2013)	SIP	SNX-482 não alterou a liberação de neurotransmissores
GRD/ Ativação das correntes de Ca²⁺ transitórias (Ratos)	(FUCHS et al., 2007)	SIP ou neuropático	SNX-482 diminuiu as correntes de Ca ²⁺ em neurônios de pequeno diâmetro de ratos basais, com redução na sensibilidade de ratos neuropáticos
GRD/ Ativação das correntes tipo R (Rato)	(MCCALLUM, 2011)	SIP ou neuropático	SNX-482 diminuiu as correntes em neurônios de pequeno diâmetro de ratos vasais, sem alterar a sensibilidade de ratos neuropáticos
Medula espinhal/ Correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (Camundongo)	(MARTIN et al., 2021)	SIP	SNX-482 reduziu as correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas
Medula espinhal/ Correntes pós-sinápticas espontâneas (Rato)	(YANG et al., 2013)	SIP	SNX-482 reduziu a frequência das correntes pós-sinápticas espontâneas no corno dorsal da medula, um efeito reduzido pelo nocaute para Cav2.3
Medula espinhal/ Correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (Rato)	(SHAN et al., 2019)	SIP	Fisalina F reduziu a frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas
Corno dorsal da medula espinhal/ Eletrofisiologia (Rato)	(MATTHEWS et al., 2007)	SIP ou neuropático	SNX-482 inibiu as respostas neuronais nocivos mediados por fibras C e A δ em condições neuropáticas, mas sem alteração nos animais não operados
	(DALMOLINI et al., 2017)	SIP ou neuropático	PnTx3-3 inibiu as respostas neuronais nocivos mediados por fibras C e A δ em condições neuropáticas, mas sem alteração nos animais não operados
Aferente sensorial do colón/ Eletrofisiologia (Camundongo)	(CASTRO et al., 2017)	SIP ou inflamado	SNX-482 e Vc1.1 inibiram a despolarização do aferente sensorial

SIP = Sem intervenção prévia.

1.6. Modulação do Cav2.3 em modelos de dor em animais

Existem estudos que utilizaram modelos animais de dor para estudar a participação do Cav2.3. Algumas estratégias podem ser utilizadas para estudar a participação de canais na nocicepção. Uma dessas estratégias é através da utilização de animais nocautes globais para o Cav2.3. Esses animais nocautes globais não expressam o Cav2.3 em nenhum de seus tecidos desde o seu nascimento. Alguns estudos utilizaram esses camundongos nocautes globais e estes em condições basais demonstraram uma melhor analgesia causada pela morfina frente a estímulos térmicos ao calor e não demonstraram alteração na nocicepção frente a estímulos térmicos ou mecânicos (SAEGUSA et al., 2000; YOKOYAMA et al., 2004). Estudos demonstraram que camundongos nocautes globais para o Cav2.3 continuaram a desenvolver nocicepção induzida pelo ácido acético e na neuropatia causada pela ligação parcial do nervo ciático (do inglês *Partial Sciatic Nerve Ligation* – PSLN). Em um desses estudos a nocicepção é revertida pela L-cisteína, que aumentou as correntes do tipo R. No segundo estudo a modelo de PSLN reduziu as correntes tipo R no GRD (MOHAMMADREZA et al., 2022; SAEGUSA et al., 2000; YANG; STEPHENS, 2009) (Tabela 5).

Tabela 5 – Modulação do Cav2.3 em modelos animais de dor.

<i>Espécie/Modelo</i>	<i>Referência</i>	<i>Principais achados</i>
Camundongo/ von Frey, placa quente, retirada de cauda, teste da formalina e do ácido acético	(SAEGUSA et al., 2000)	Camundongos nocaute globais para o Cav2.3 não tiveram alteração na nocicepção frente a estímulos térmicos, mecânicos e na nocicepção induzida pelo ácido acético. Efeito antinociceptivo nas duas fases do teste da formalina.
Camundongo/ von Frey	(GANDLA et al., 2017)	Camundongos com diminuição da expressão do Cav2.3 (AAVs-shRNA Cav2.3) desenvolveram hiperalgesia
Camundongo/ Retirada de cauda	(YOKOYAMA et al., 2004)	Camundongos nocautes globais para o Cav2.3 tiveram uma melhora na analgesia induzida pela morfina frente a nocicepção induzida por estímulos térmicos ou pelo nado forçado comparados a camundongos controle
Camundongo/ Formalina	(MURAKAMI et al., 2004)	Administração intratecal de SNX-482 teve efeito antinociceptivo na segunda fase do teste da formalina, mas aumentou a nocicepção na primeira fase do teste
Rato/ Formalina	(TERASHIMA et al., 2013)	Administração intratecal de SNX-482 causou efeito antinociceptivo no teste da formalina, em ambas as fases
Rato/ TNBS	(QIAN et al., 2013)	Administração intratecal de SNX-482 reduziu o reflexo de retirada abdominal em resposta a distensão colorretal
Camundongo/ Ácido acético	(MOHAMMADREZA et al., 2022)	Camundongos nocaute globais para o Cav2.3 demonstraram um aumento na nocicepção induzida pelo ácido acético, efeito reduzido pela L-cisteína
	(YANG; STEPHENS, 2009)	Camundongos nocautes globais para o Cav2.3 continuaram a desenvolver hiperalgesia mecânica induzida por PSLN

Camundongo/ PSNL	(MARTIN et al., 2021)	Deleção do Cav2.3 no GRD e medula espinhal por CRISPR/Cas9 não alterou a hiperalgisia mecânica, mas reverteu o efeito antinociceptivo causado pela somatostatina sem alterar o efeito da morfina no PSNL
Rato e Camundongo/ PSNL e estreptozotocina	(DALMOLIN et al., 2011)	Administração intratecal de PnTx3-3 reduziu a hiperalgisia mecânica em animais neuropáticos, mas não em animais em condições basais
Rato/ Estavudina	(PIEKARZ et al., 2012)	Administração intraperitoneal de TAT-CBD3A6K produziu efeito antinociceptivo em modelos de dor em roedores
Rato / Paclitaxel e SNL	(SHAN et al., 2019)	Administração intratecal de Fialina F produziu efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática em ratos
Camundongo / Capsaicina	(FERREIRA et al., 2021)	Administração intratecal de SNX-482 e a diminuição da expressão do Cav2.3 pelo ODN-AS contra o Cav2.3 produziu efeito antinociceptivo na hiperalgisia secundária induzida por capsaicina somente nas fêmeas. Sem alteração na nocicepção frente a estímulos mecânicos e térmicos em condições basais

AAVs-shRNA = Adeno vírus associado a shRNA; PSNL = Ligação parcial do nervo ciático; TNBS = ácido trinitrobenzenossulfônico; SNL = Ligação do nervo espinhal; ODN-AS = Oligonucleotídeo antisentido.

Outras evidências demonstram redução na nocicepção induzida pelo teste da formalina nos animais nocautes para o Cav2.3, sendo este considerado um modelo de dor inflamatória onde ocorre o processo de sensibilização central (SAEGUSA et al., 2000). Apesar de serem ótimas ferramentas para estudar os mecanismos envolvidos na nocicepção, os resultados obtidos com o uso dos animais nocautes para Cav2.3 devem ser analisados com cautela, pois esses animais desenvolvem acabam por desenvolver um mecanismo de compensação, onde ocorre o aumento da expressão dos outros CCDV para compensar a falta do Cav2.3 (WEIERGRÄBER et al., 2005). Esses estudos utilizando animais nocautes para o Cav2.3 mostram que o Cav2.3 tem papel geralmente pró-nociceptivo e esses resultados conflitantes podem estar relacionados com a localização da dor e com o efeito de compensação (Tabela 5).

Outra estratégia para estudar a participação do Cav2.3 na nocicepção é através da utilização de animais nocaute condicionais para o Cav2.3. Através da utilização de algumas ferramentas é possível diminuir a expressão do Cav2.3 em um tecido específico. Um estudo usou uma injeção utilizando adenovírus como vetor viral para diminuir a expressão do Cav2.3 no GRD e com isso houve um aumento da hiperalgisia frente a estímulos mecânicos nesses animais em condições basais (GANDLA et al., 2017). Um outro estudo utilizou CRISPR/Cas9 para fazer a deleção gênica do Cav2.3 na medula espinhal e no GRD, posteriormente os camundongos foram submetidos ao modelo de dor neuropática induzida pela ligação do nervo

espinhal (SNL) e continuaram desenvolvendo hiperalgesia mecânica. Além disso, esses animais foram tratados com morfina e neurotensina, a morfina continuou causando seu efeito analgésico, mas a neurotensina teve seu efeito tipo-analgésico revertido nos animais nocautes locais para o Cav2.3, mostrando a interação entre o efeito da neurotensina e o Cav2.3 (MARTIN et al., 2021). Um outro trabalho utilizou um oligonucleotídeo antisentido (ODN-AS) por via intratecal para diminuir a expressão do Cav2.3 na medula espinhal e em condições basais não houve alteração na nocicepção frente a estímulos térmicos e mecânicos. Posteriormente esses camundongos foram submetidos a um modelo de hiperalgesia secundária (sensibilização central) induzido pela injeção de capsaicina e foi observado um efeito antinociceptivo nas fêmeas tratadas com o ODN-AS contra o Cav2.3, mas não nos machos tratados com esse ODN-AS (FERREIRA et al., 2021). Esse ODN-AS contra o Cav2.3 reduziu os níveis de RNAm para o *Cacna1e* na medula espinhal de camundongos. Vale a pena ressaltar que desses estudos apenas um deles teve como objetivo avaliar a participação do Cav2.3 na transmissão da dor, os outros usaram ferramentas relacionadas ao Cav2.3 para outros fins. Com isso, os resultados conflitantes encontrados nesses estudos podem estar relacionados com o modelo de dor escolhido não ser o mais apropriado para verificação da participação do Cav2.3 na dor. Também não se descarta a possibilidade de que as injeções locais para diminuição da expressão do Cav2.3 possam gerar o efeito de compensação dos outros CCDV (Tabela 5).

Uma outra estratégia para estudar a participação do Cav2.3 na nocicepção é através da utilização de bloqueadores farmacológicos que bloqueiam do Cav2.3. Dois estudos demonstraram que a administração intratecal de SNX-482 reduziu o comportamento nociceptivo na segunda fase do teste da formalina. Salienta-se ainda que além de reduzir a nocicepção, o SNX-482 atenuou fortemente a internalização do receptor para substância P (NK1) causada pela formalina, sugerindo um papel importante do Cav2.3 na liberação de neurotransmissores pré-sinápticos induzida pelos estímulos nocivos dos aferentes primários peptidérgicos (MURAKAMI et al., 2004; TERASHIMA et al., 2013). Em um modelo de dor inflamatória visceral induzida por TNBS (do inglês *2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid*), o SNX-482 diminuiu o reflexo de retirada abdominal (QIAN et al., 2013). A administração intratecal de SNX-482 no modelo de hiperalgesia secundária induzida por mostrou um efeito antinociceptivo

nas fêmeas tratadas com o SNX-482, mas não nos machos (FERREIRA et al., 2021) (Tabela 5).

Como mostrado anteriormente, a fisalina F, PnTx3.3 e TAT-CBD3A6K são moléculas capazes de bloquear diretamente o Cav2.3. O tratamento intratecal com fisalina F e com a Tx3-3 foram capazes de gerar um efeito antinociceptivo nos modelos de neuropatia traumática (SNL e PSNL, respectivamente) (DALMOLIN et al., 2011; SHAN et al., 2019). Já o tratamento intraperitoneal com TAT-CBD3A6K também produziu um efeito antinociceptivo em na neuropatia induzida por estavudina (PIEKARZ et al., 2012). Esses estudos com bloqueadores do Cav2.3 mostram que o Cav2.3 tem um papel pronociceptivo e o bloqueio desse canal causa um efeito antinociceptivo (Tabela 5).

Uma descrição detalhada e transparente de como a pesquisa foi conduzida são considerados fatores de qualidade na pesquisa com animais. Alguns fatores que são considerados critérios de qualidade de um estudo com animais são: cálculo prévio do número de animais, randomização, cegamento, relato de bem-estar animal, temperatura que as caixas são mantidas, bem como espécie e sexo dos animais utilizados no estudo (PERCIE DU SERT; RICE, 2014; SENA et al., 2007). Levando em consideração esses critérios de qualidade na pesquisa com animais, observamos que a maioria dos estudos que verificam a participação do Cav2.3 na dor possuem deficiências e limitações por não relatarem esses critérios de qualidade. Apesar da maioria dos estudos que utilizaram animais demonstrarem que a modulação do Cav2.3 tem geralmente um papel antinociceptivo, esses estudos utilizaram poucos critérios de qualidade, sendo essa uma limitação da maioria desses estudos. Assim, mais estudos para verificação da participação do Cav2.3 na dor e que levem os critérios de qualidade na pesquisa com animais em consideração se fazem necessários.

1.7. Participação do Cav2.3 em condições de dor na clínica

Há poucos estudos que relacionam o Cav2.3 com condição relacionadas a dor em pacientes. Os estudos até o momento indicam que polimorfismos no gene que codifica o Cav2.3 (*CACNA1E*) podem alterar a dor e o consumo de analgésicos. Um único polimorfismo em *CACNA1E* é mais prevalente na enxaqueca hemiplégica e aura do tronco cerebral e esse polimorfismo pode modular a função do cálcio tipo R (AMBROSINI et al., 2017). Um outro estudo mostra a associação entre um

polimorfismo genético em *CACNA1E* e a sensibilidade a opioides em pacientes com dor pós-operatória (IDE et al., 2013). Além disso, um único polimorfismo no gene *CACNA1E* diminui o consumo de opioides após cirurgia estética, mas após cirurgia gastrointestinal o polimorfismo em *CACNA1E* leva a maiores necessidades de opioides e aumento nos escores de dor (AMANO et al., 2016).

Assim, esses estudos indicam que o Cav2.3 parece modular a dor de diferentes maneiras dependendo do tipo de dor envolvida (pós-operatória, enxaqueca, somática e visceral) e que o Cav2.3 parece estar envolvido com o consumo de opioides.

1.8. Dor pós-operatória

O número de procedimentos cirúrgicos vem aumentando ao longo dos anos, sendo que no ano de 2012 foram cerca de 312 milhões de procedimentos realizados (WEISER et al., 2015). Com isso, a dor pós-operatória é uma forma comum de dor na prática clínica. Mais de 80% dos pacientes que passam por procedimentos cirúrgicos apresentam dor aguda após cirurgia e até 71% dos pacientes relatam dor de moderada a extrema mesmo passando pelos protocolos de tratamento para procedimentos cirúrgicos (MUELLER et al., 2019). O tratamento inadequado após a cirurgia pode contribuir para o desenvolvimento da dor pós-operatória persistente. Esta por sua vez, pode acabar por gerar uma degeneração axonal, causando um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes que passam a conviver com uma dor crônica e de difícil tratamento (SNG et al., 2009; STAFF et al., 2010). Alguns fatores de risco já foram identificados para a dor pré-operatória, como transtornos de ansiedade e duração prolongada dos procedimentos. De fato, a dor pós-operatória persistente é mais prevalente em adultos jovens e em mulheres (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019).

Nos últimos anos, o tratamento da dor aguda em pacientes cirúrgicos tem sido amplamente reconhecido como uma questão importante nos cuidados de saúde. Entretanto, aproximadamente 50-70% dos pacientes ainda experimentam dor moderada a grave após a cirurgia (POGATZKI-ZAHN; ZAHN; BRENNAN, 2007). O tratamento inadequado da dor aguda também pode contribuir para o desenvolvimento de dor pós-cirúrgica persistente e pode estar associado a um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (SNG et al., 2009). Um fator a ser considerado é a diferença na efetividade dos tratamentos analgésicos frente ao sexo, visto que

estudos indicam que há uma diferença intersexual no efeito analgésico (PRICE et al., 2018). Relatos na clínica demonstram que a eficácia de tratamentos para a dor pós-operatória é diferente em homens e mulheres, a eficácia de cada fármaco em regimes multimodais podem ter efeitos diferentes, sob diferentes condições (KIM et al., 2007).

Os opioides são considerados o tratamento “padrão ouro” para a dor pós-operatória. O uso de opioides sintéticos, como o fentanil, ou opioides naturais, como a morfina, durante o perioperatório fornece uma anestesia e analgesia balanceadas (COLVIN; BULL; HALES, 2019). No entanto, alguns pacientes fazem uso inadequado ou persistente desses opioides, o que prejudica a qualidade de vida pós-cirúrgica (SNG et al., 2009). Há algumas preocupações em relação ao uso de opioides, como o desenvolvimento de tolerância, dependência e o surgimento de vários efeitos adversos, incluindo constipação, depressão respiratória e euforia (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2017). Um outro fator relevante na terapia opioide é a variação do efeito analgésico frente as divergências sexuais, visto que o efeito analgésico desencadeado por agonistas dos receptores kappa-opioides é eficaz somente nas mulheres (MOGIL et al., 2003).

Uma estratégia utilizada para diminuir os efeitos adversos causados pelo uso dos opioides é a administração concomitante de analgésicos opioides com não opioides que atuem em locais diferentes, com o objetivo de melhorar o controle da dor e simultaneamente eliminar os efeitos indesejáveis relacionados ao uso do opioides, realizando assim uma terapia multimodal. Comumente são utilizados na terapia multimodal fármacos como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (como o paracetamol) opioides fracos (como o tramadol ou codeína), anestésicos locais (como a bupivacaína), agonistas do receptor $\alpha 2$ adrenérgico (como a clonidina) e os antagonistas dos receptores NMDA (como a ketamina). Apesar disso, muitas vezes esses fármacos necessitam de um tratamento prolongado o que dificulta a adesão ao tratamento (LEE et al., 2011). As terapias e estratégias atualmente disponíveis para o tratamento da dor pós-operatória são ineficazes e geram diversos efeitos adversos. Por isso a identificação e validação de alvos para desenvolvimento de novos fármacos analgésicos, mais eficazes que prolonguem o efeito analgésico e diminuam o surgimento de efeitos adversos se faz necessária.

Os estudos clínicos com Cav2.3 relacionam os polimorfismos desse canal com o consumo de opioides e com a intensidade a dor pós procedimentos cirúrgicos (AMANO et al., 2016; IDE et al., 2013). Com isso, há evidências indicando que CCDV

são um importante alvo na analgesia induzida pelos opioides (KISSIN, 2005; YOKOYAMA *et al.*, 2004). Apesar desses estudos clínicos que indicam que o Cav2.3 é um alvo para analgesia, o papel do Cav2.3 na dor ainda precisa ser melhor estudado. Assim, o presente estudo buscou investigar a participação do Cav2.3 em um modelo de dor pós-operatória, utilizando a combinação de algumas ferramentas e considerando as possíveis divergências sexuais que podem ocorrer.

2. HIPÓTESE

A inibição do canal de cálcio dependente de voltagem Cav2.3 é capaz de causar um efeito antinociceptivo em um modelo de dor pós-operatória.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial analgésico do bloqueio farmacológico ou da redução da expressão do canal de cálcio voltagem dependente Cav2.3 em um modelo de dor pós-operatória em camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar o modelo de dor pós-operatória por desfechos comportamentais e moleculares;
- 2) Avaliar o possível efeito antinociceptivo e efeitos adversos causados pela redução da expressão ou pelo bloqueio do Cav2.3 no modelo de dor pós-operatória;
- 3) Avaliar o bloqueio do Cav2.3 como adjuvante na analgesia induzida por opioide no modelo de dor pós-operatória.

4. METODOLOGIA

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) e do Biotério Setorial da Cumming School of Medicine, University of Calgary. Os animais foram mantidos em caixas de acrílico mantendo a proporção de dois a seis animais por caixa (39,6 x 21,5 x 17,2 cm). As caixas foram acondicionadas 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 animais foram aclimatizados por pelo menos 7 dias nos biotérios antes de qualquer intervenção e foram ambientados nos aparatos experimentais por uma hora antes da realização dos experimentos. Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (2019-1704260819) e pelo Animal Care Committee da University of Calgary (AC1800031).

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 (do inglês *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 na forma de blocos (não menos do que dois) em dias diferentes, de 3-4 animais por bloco experimental, no período das 8:00 às 18:00 horas.

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 protocolo de 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.

4.2. Fármacos e Reagentes

O bloqueador farmacológico do CCDV do tipo R SNX-482 foi adquirido da Alomone Labs (Ein Kerem, Jerusalém, Israel). O SNX-482 foi reconstituído em solução tampão fosfato (do inglês *Phosphate-buffered saline* – PBS), sendo preparado uma solução estoque a 222,4 μ M, esta foi separada em alíquotas de 10 μ L. As soluções de trabalho eram diluídas imediatamente antes da realização dos experimentos (TERASHIMA *et al.*, 2013). Sulfato de morfina foi obtido da Cristália (Campinas, SP, Brasil). A solução de trabalho foi diluída em salina (NaCl 0,9 %) imediatamente antes do uso. Como controle positivo foi utilizado o anestésico local bupivacaína (Tradinol®, Cloridrato de Bupivacaína 0,5%, sem vasoconstritor).

Para diminuir a expressão do CCDV do tipo R (Cav2.3), os animais foram tratados com um RNA de interferência (siRNA) contra o RNAm codificante para esse canal (siRNA ON-TARGETplus Mouse *Cacna1e* - SMARTpool) ou com o seu siRNA controle (siRNA ON-TARGETplus Non-targeting Pool), que foram obtidos da Horizon Discovery (Colorado, USA). O siRNA foi reconstituído em água livre de Rnase e DNase 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 controles β -actina e hipoxantina guanina fosforibosil transferase (*Hprt*). Estes foram obtidos da Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA).

Os tratamentos foram administrados por via intratecal (HYLDEN; WILCOX, 1980) ou por via intraplantar (KUMAR et al., 2019). Os tratamentos foram seguidos de acordo com cada protocolo experimental, tratamentos intratecais com morfina (1, 3 e 10 nmol/sítio), SNX-482 (0,1; 0,3 e 0,6 nmil/sítio, sua associação de doses sub efetivas (morfina 1 nmol/sítio mais SNX-482 0,1 nmol/sítio) e os tratamentos intraplantares com bupivacaína (17,5 μ M/sítio) e SNX-482 (20 μ M/sítio). Os pré-tratamentos intratecais (5 μ L) foram feitos 10 minutos antes da indução do modelo de dor pós-operatória, os pós-tratamentos intratecais (5 μ L) foram feitos 60 minutos ou 24 horas após a cirurgia (FERREIRA et al., 2021; MUELLER et al., 2019; TONELLO et al., 2020). Os tratamentos intraplantares foram feitos imediatamente antes (10 μ L) e intra-operatório (5 μ L). O tratamento com siRNA foi feito por via intratecal (3,3 μ g/sítio) a cada 24 horas por 3 dias e a indução do modelo de dor pós-operatória foi feita 24 horas após a última injeção com siRNA (MICHELI et al., 2021; NJOO; HEINL; KUNER, 2014).

4.3. Modelo de dor pós-operatória

O modelo de dor pós-operatória (POP) foi realizado de acordo com o procedimento descrito para ratos (BRENNAN; VANDERMEULEN; GEBHART, 1996), adaptado para camundongos (OLIVEIRA et al., 2011; POGATZKI; RAJA, 2003). Antes da cirurgia, foi verificada a medida basal do limiar mecânico de retirada de pata dos animais. Após anestesia foi realizada uma incisão na pele da pata traseira direita com lâmina 11. A incisão foi iniciada na borda proximal do calcanhar e estendido para os dedos dos pés, o músculo adjacente foi elevado. Posteriormente foi feita sutura com um fio de nylon cirúrgico 6,0. Os camundongos não operados foram submetidos a um procedimento que consiste em anestesia e preparação antissépticas, sem incisão plantar. Foram realizados os tratamentos para bloqueio do Cav2.3 e posteriormente foram realizadas as mensurações de parâmetros nociceptivos.

4.4. Avaliações comportamentais

4.4.1. Avaliações de efeitos adversos

As funções sensoriais e motoras foram cuidadosamente avaliadas após a administração intratecal dos tratamentos utilizados, as avaliações foram realizadas de até 60 minutos após as administrações intratecais. As avaliações incluem verificação da presença de cauda de Straub, hiperlocomoção e disfunção motora. 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 do comportamento de guarda da pata

Para verificação da nocicepção espontânea (sem estímulos) os camundongos foram acomodados em plataformas de acrílico e foram avaliados durante 30 minutos para verificação do comportamento de guarda da pata. Foram atribuídos escores de acordo com o posicionamento prevalente da pata operada dos animais a cada 5 minutos, no fim da avaliação cada animal possui um total de 6 escores. Os escores atribuídos foram: 0 (pata normal), 1 (lateral da pata encosta a malha de arame), 2 (pata elevada) e 3 (morder, chacoalhar ou lambar da pata). Os dados foram expressos como somatório dos 6 escores no total de 30 minutos (CHEN *et al.*, 2007; XU e BRENNAN, 2010).

4.4.3. Avaliação da hiperalgesia mecânica pelo teste de von Frey

A hiperalgesia mecânica 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:

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

Xf = 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 operadas. 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 POP.

4.4.4. Comportamento Afetivo Motivacional (AMB) relacionado a dor

Para verificação da parte afetiva da dor foi avaliado o comportamento afetivo motivacional. A pata do animal foi observada por um minuto após a aplicação de cada filamento de von Frey. De acordo com a posição da pata durante o período de observação, foram atribuídos diferentes escores. Os escores atribuídos foram: 0 (pata normal), 1 (lateral da pata encosta a malha de arame), 2 (pata elevada) e 3 (morder, chacoalhar ou lambar da pata). No final do teste obtemos um total de 6 medidas e o resultado foi expresso como o somatório dos escores obtidos nas 6 medidas (XU e BRENNAN, 2010; CORDER et al., 2017).

4.5. Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

4.5.1. Extração de RNA total

Amostras biológicas de medula e GRD foram coletadas, colocadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80 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 0,3µM dos iniciadores de cada par (Tabela 1), montadas em placas de 96 poços A-B-C (Axygen, Union City), em volume final de 10 µl. 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 (LIM-UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos

contendo uma etapa de desnaturação (95°C por 15 segundos) e uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão (60 °C por um minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e, novamente, 95 °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. Os genes avaliados têm relação com outros CCDV da família Cav2, com o sistema opioide endógeno, marcador de dano neuronal e de ativação celular.

Tabela 6 – Sequências de primers utilizados para verificação dos níveis de RNAm.

Gene	Forward (5'- 3')	Reverse (5'- 3')
<i>Cacna1a</i>	GAGGAGAACCAACGGTACCAC	TGGTCATGCTCAGATCTGTCC
<i>Cacna1b</i>	TTCGGCAAAGAGGTGCAACTT	GACAGCGACTCCTTGATGCC
<i>Cacna1e</i>	CCTGAGTGGTCCGGAGTGGATA	CATCCGCTGGGTCCATACA
<i>Oprm1</i>	GAGCCACAGCCTGTTGCCCA	GTGCTAGTGGCTAAGGCATC
<i>Oprk1</i>	ATCACCGCTGTCTACTCTGTGG	GTGGTAGTAACCAAAGCATCTGC
<i>Pdyn</i>	CTGTGTGCAGTGAGGATTCAGG	GAGACCGTCAGGGTGAGAAAAG
<i>Penk</i>	TGCAGCCAGGACTGCGCTAAAT	GATCCTTGCAGGTCTCCCAGAT
<i>Gfap</i>	TGCAGGAGTAACCAGGATCTAC	GATCTGGAGGTTGGAGAAAAGTC
<i>C-fos</i>	GGGAATGGTGAAGACCGTGTCA	GCAGCCATCTTATTCCGTTCC
<i>Aif1</i>	AGGAGAAAAACAAAGAACAAGA	CAATCAGGGCAGCTCGGAGATAGC
<i>Atf3</i>	AGCTGAGATTCGCCATCCAGAA	CTCGCCGCCTCCTTTTCCT
<i>Hprt</i>	GCAGACTTTGCTTTTCCTTGG	TACTGGCCACATCAACAGGA
<i>Actb</i>	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

4.5.4. Análise dos resultados

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados utilizando-se amostras biológicas de 4 animais por grupo, 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 Cq apresentado para o gene alvo à média dos Cq 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:

$$\Delta Cq = Cq \text{ (gene alvo)} - Cq \text{ (gene referência)}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ (amostra)} - Cq \text{ (calibrador)}$$

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

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.

4.6. Verificação proteica por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Amostras de medula espinhal, GRD e tecido da pele da pata operada foram coletados, homogeneizados em PBS contendo um mix com inibidor de protease (Roche Applied Science), posteriormente foram submetidas a dois ciclos de congelamento-descongelamento para o rompimento das membranas celulares. Após, as amostras foram centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O sobrenadante foi quantificado utilizando o ensaio proteico de baseado no ácido bicinconínico (do inglês *Bicinchoninic Acid Assay* – BCA). Posteriormente, 10 microgramas de proteína foram usados para determinar a concentração de Cav2.3 (1:10) (MyBioSource, MBS454668) usando o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática e seguindo as instruções do fabricante.

4.7. 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 pontos fora da curva entre os dados, e os valores identificados como tal foram excluídos das análises estatísticas. 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 Tukey ou Dunnett, 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 ($P < 0.05$). A análise de correlação foi realizada pelo teste “r” de Pearson. Os dados obtidos nos experimentos realizados para avaliar a

hiperalgesia pelo teste de von Frey, foram transformados e expressos como logaritmo de base 10 e os de expressão de RNAm como logaritmo base 2, 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 8® (La Jolla, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do modelo de dor pós-operatória (POP) em camundongos

A incisão de pele na pata direita traseira de camundongos promoveu, de forma significativa, uma diminuição no limiar de retirada de pata 50 % (g) dos animais quando comparados aos valores basais e aos valores do grupo falso operado. Essa diminuição no limiar de retirada da pata foi vista a partir da terceira hora após a incisão durando até 48 horas após a incisão e a hiperalgesia mecânica ocorreu de forma similar em fêmeas e machos (Limiar de retirada de pata em 3 horas após a cirurgia diminuiu $94 \pm 9\%$ e $98 \pm 8\%$, em camundongos fêmeas e machos, respectivamente) (Figura 4B).

Foi possível observar um aumento no escore referente ao comportamento afetivo motivacional nos animais operados quando comparados aos valores basais e ao grupo falso operado. Esse aumento nos escores começou três horas após a cirurgia e durou por até 24 horas nas fêmeas e 48 horas nos machos (aumento do AMB em 3 horas após a cirurgia foi de $57 \pm 6\%$ e $57 \pm 11\%$ em fêmeas e em machos, respectivamente) (Figura 4C).

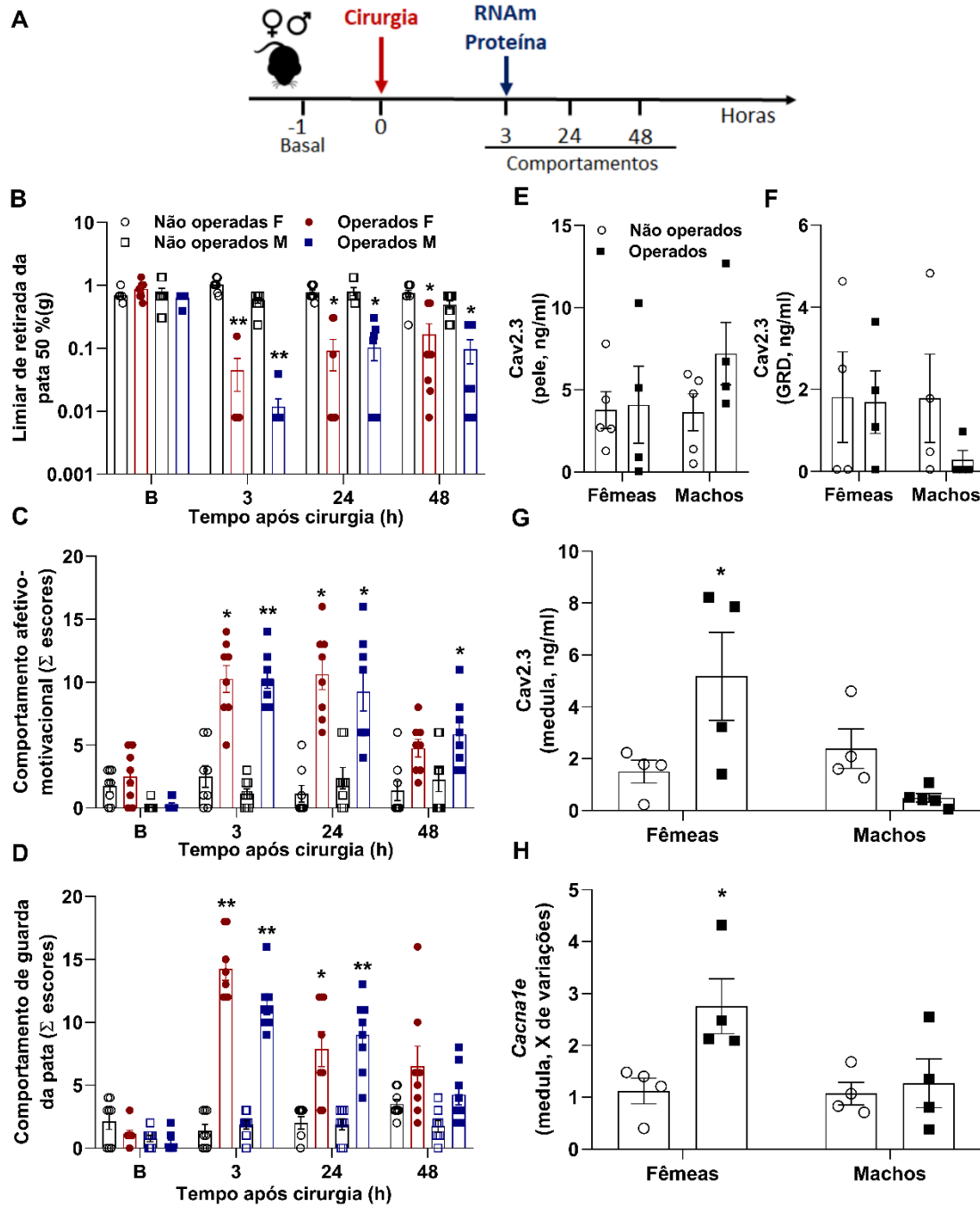
De fato, houve um aumento nos escores relacionada a nocicepção espontânea quando comparados aos valores basais e aos valores do grupo falso operados. Observamos um aumento no comportamento de guarda da pata da terceira hora até 24 horas após a cirurgia, sendo encontradas valores de escores similares entre fêmeas e machos (aumento do comportamento de guarda da pata em 3 horas após a cirurgia foi de $79 \pm 14\%$ e $63 \pm 11\%$ em fêmeas e em machos, respectivamente) (Figura 4D).

Esses dados demonstram que a incisão plantar na pata traseira direita de camundongos foi capaz de causar hiperalgesia mecânica, visto pela diminuição do limiar de retirada da pata e aumento do comportamento afetivo motivacional e foi capaz de gerar nocicepção espontânea, visto pelo aumento do comportamento de guarda da pata. A nocicepção gerada pela cirurgia ocorreu de forma semelhante entre camundongos fêmeas e machos. Como não foi visto diferença na resposta entre camundongos fêmeas e machos os experimentos seguintes tiveram um foco maior nas fêmeas, pois há uma maior prevalência de dor pós-operatória em mulheres.

Para caracterização molecular do modelo de POP foi realizada a coleta de tecidos para verificação nos níveis de RNAm através da técnica de qPCR e análise

dos níveis de expressão proteica do Cav2.3 por ELISA. Foram avaliados os níveis de RNAm na medula espinhal de 3 horas após a cirurgia, visto que este foi o pico da nocicepção causada pela cirurgia na pata. Foram verificados os níveis de RNAm para genes relacionados a nocicepção. Não foi verificada nenhuma alteração na expressão (proteína) do Cav2.3 na pata e nem no GRD de animais operados quando comparados aos falsos operados, nem nas fêmeas e nem nos machos (Figura 4E e F). No entanto, foi verificado um aumento da expressão (proteína) do Cav2.3 na medula de fêmeas operadas quando comparadas ao grupo falso operado (Figura 4G). Foi detectado um aumento nos níveis do RNAm para o gene que codifica o Cav2.3 (*Cacna1e*) na medula espinhal de fêmeas operadas quando comparadas ao grupo falso operado (Figura 3H). Diferente do que ocorre nas fêmeas, não verificamos nenhuma alteração na expressão do Cav2.3 (proteína) e nem nos níveis de RNAm para o gene que codifica o Cav2.3 (*Cacna1e*) em machos operados quando comparados ao grupo falso operado (Figura 4H).

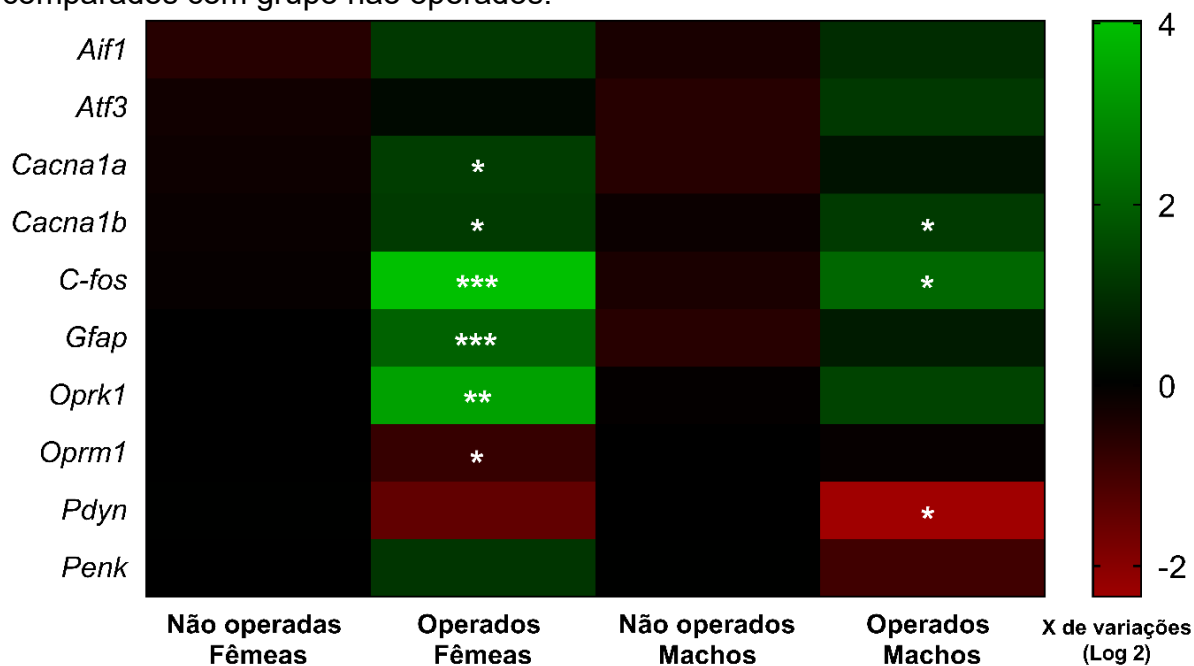
Figura 4 – Decurso temporal da nocicepção induzida pela incisão plantar em fêmeas ou machos. Caracterização do modelo de dor pós-operatória (POP) na pata traseira direita de camundongos fêmeas e machos. A – Desenho experimental do protocolo de indução de POP em camundongos fêmeas e machos. B – Decurso temporal do efeito da POP na hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). D – Nocicepção espontânea (Soma das respostas por 30 minutos). E, F e G – Concentração proteica de Cav2.3 avaliada por ensaio de Elisa na pele da pata operada (E), GRD (F) e na região lombar da medula espinhal (G) (ng/mL). H – Expressão nos níveis de RNAm para o gene que codifica o canal de cálcio do tipo R (*Cacna1e*) avaliados por qPCR na região lombar da medula espinhal 3 horas após incisão ou animais não operados (número de variações). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo B-D e n = 4-5 por grupo E-H) foram realizados de 2-3 grupos experimentais independentes e foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguidos pelos pós testes de Sidak (comparados ao grupo veículo) ou Tukey (comparados com valores basais), *p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001 comparados com grupo não operados (B) = basal. O teste de Grubbs foi usado para detecção de possíveis pontos fora da curva e nenhum foi encontrado.



Além do mais, foi verificado que há um aumento significativo nos níveis de mRNA para os genes que codificam o Cav2.1 (*Cacna1a*), Cav2.2 (*Cacna1b*), para o marcador de astrócitos (*Gfap*), para o marcador de atividade neuronal (*C-fos*) e para o receptor kappa opioide (*Oprk1*) na medula espinhal de fêmeas operadas quando comparadas ao grupo falso operado (Figura 5). Juntamente, foi observada uma diminuição nos níveis mRNA para o receptor mu-opioide (*Oprm1*). Para os machos operados foi verificado um aumento nos níveis de mRNA para o Cav2.2 (*Cacna1b*),

para o marcador de atividade neuronal (*C-fos*) e uma diminuição nos níveis do ligante endógeno do receptor kappa-opioide (*Pdyn*) (Figura 5).

Figura 5 – Expressão medular de genes relacionados a dor no modelo de dor pós-operatória. Níveis de expressão transcricional avaliados por qPCR para IBA-1 (*Aif1*), ATF3 (*Atf3*), canais de cálcio do tipo P/Q (*Cacna1a*), tipo N (*Cacna1b*), C-FOS (*C-fos*), GFAP (*Gfap*), KOR (*Oprk1*), MOR (*Oprm1*), Prodinorfina (*Pdyn*) e Encefalina (*Penk*) na medula espinhal 3 horas após a cirurgia ou em animais não operados. Dados expressos como média normalizados por log de 2, analisados por teste-t de Student não pareado (n = 3-4 por grupo), *p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001 comparados com grupo não operados.



Esses dados sugerem que a incisão na pata foi capaz de causar uma hiperalgesia mecânica e nocicepção espontânea em fêmeas e em machos operados, mas as alterações na expressão do Cav2.3 e de outros genes relacionados a dor ocorreu de uma maneira sexualmente dimórfica.

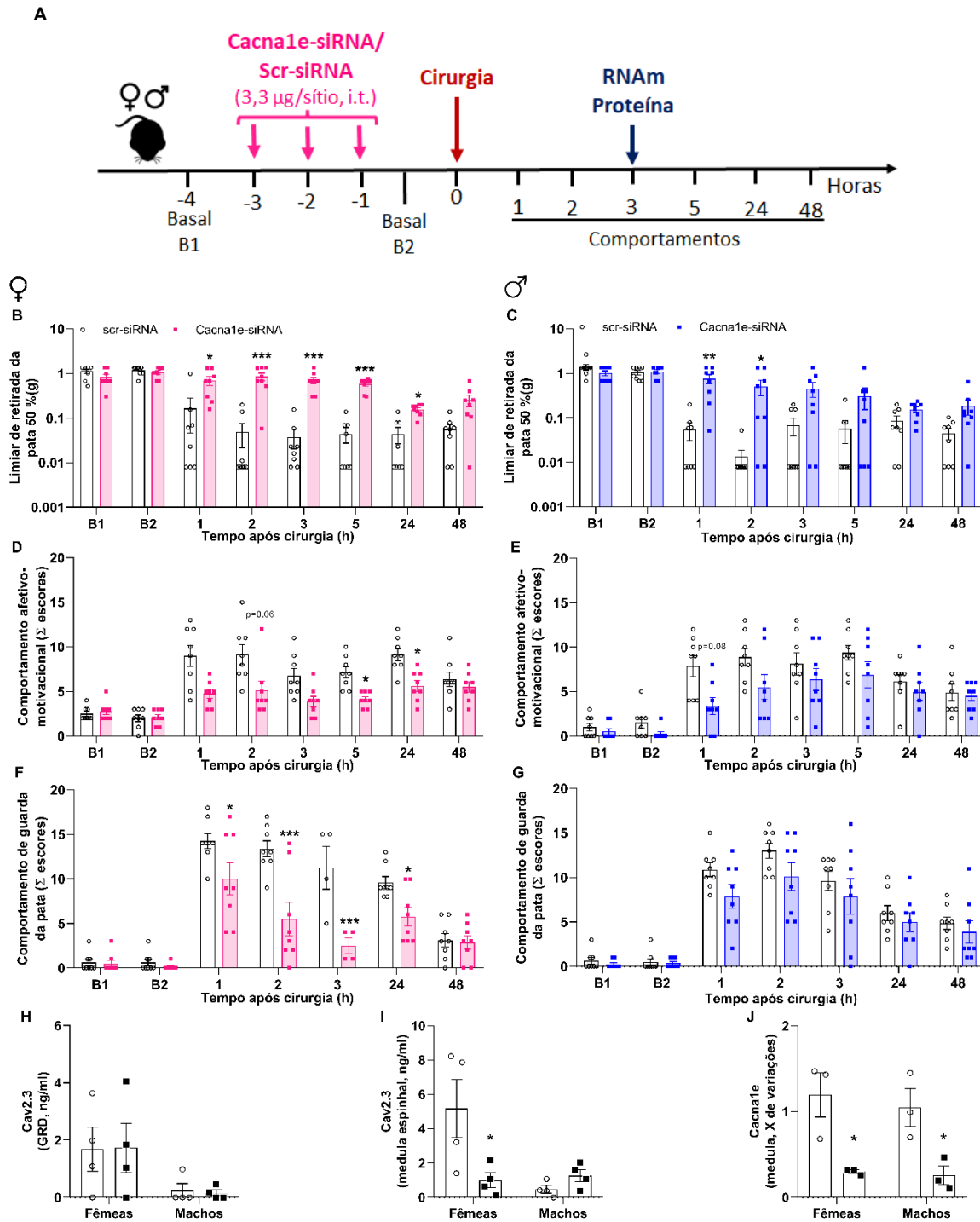
5.2. Efeito do silenciamento gênico do Cav2.3 na dor pós-operatória

Após, nós realizamos um tratamento intratecal com um RNA de interferência (siRNA) para diminuir a expressão do Cav2.3 a nível medular e averiguar sua influência na dor pós-operatória. Foram avaliados os valores basais dos animais antes de qualquer procedimento (Basal 1) e após as 3 injeções com siRNA (1 injeção intratecal a cada 24 horas) foi verificado o basal novamente (Basal 2) (antes do procedimento cirúrgico). O tratamento com siRNA contra o Cav2.3 (*Cacna1e*-siRNA)

ou seu controle (src-siRNA) foi feito por 3 dias (3,3 $\mu\text{g/sítio}$, intratecal) e antes da cirurgia não causou nenhuma alteração nos limiares de retirada de pata, no comportamento afetivo motivacional e nem no comportamento de guarda da pata quando comparados aos valores basais dos animais (Basal 1), nem nas fêmeas e nem nos machos (Figura 6B-G). Após essa avaliação, os animais foram submetidos ao modelo de dor pós-cirúrgica e os parâmetros nociceptivos foram detectados. Fêmeas e machos operados tratados com src-siRNA (controle) continuaram a desenvolver nocicepção induzida pela cirurgia quando comparados aos valores basais 1 e 2 (Figura 6B-G). O tratamento com o *Cacna1e*-siRNA preveniu o surgimento da hiperalgesia mecânica em ambos os sexos ($85 \pm 10\%$ para fêmeas e 47 ± 18 para machos 2 horas após a cirurgia), com um efeito antinociceptivo duradouro nas fêmeas, que durou até 24 horas após a cirurgia (Figura 6B). Para os machos o efeito antinociceptivo foi breve e curto, durando até duas horas após a cirurgia (Figura 6C). Houve também uma tendência a diminuição dos escores afetivos motivacionais nas fêmeas e machos tratados com *Cacna1e*-siRNA ($44 \pm 20\%$ para as fêmeas e $30 \pm 30\%$ para machos 2 horas após a cirurgia) (Figura 6D-E, respectivamente). Verificamos que o tratamento com *Cacna1e*-siRNA preveniu o desenvolvimento do comportamento de guarda da pata nas fêmeas ($78 \pm 2\%$ para as fêmeas 3 horas após a cirurgia) e efeito perdurou por até 24 horas após a cirurgia (Figura 6F). No entanto, nenhum efeito antinociceptivo foi visto nos machos tratados com *Cacna1e*-siRNA (Figura 6G).

Em outro grupo de animais, nós verificamos a expressão do Cav2.3 e de outros genes relacionados a dor 3 horas após a cirurgia em animais previamente tratados com *Cacna1e*-siRNA ou src-siRNA. O tratamento com *Cacna1e*-siRNA ou src-siRNA não foi capaz de alterar a expressão do Cav2.3 no GRD nem nas fêmeas e nem nos machos (Figura 6H). As fêmeas tratadas com *Cacna1e*-siRNA apresentaram uma diminuição na expressão do Cav2.3 (proteína) a nível medular quando comparadas com o grupo controle. No entanto, nenhuma alteração da expressão do Cav2.3 foi vista na medula espinhal dos machos tratados com *Cacna1e*-siRNA (Figura 6I). De fato, o tratamento intratecal com *Cacna1e*-siRNA foi capaz de diminuir os níveis do RNAm para o gene *Cacna1e* a nível medular tanto nas fêmeas quanto nos machos tratados com o silenciador (Figura 6J).

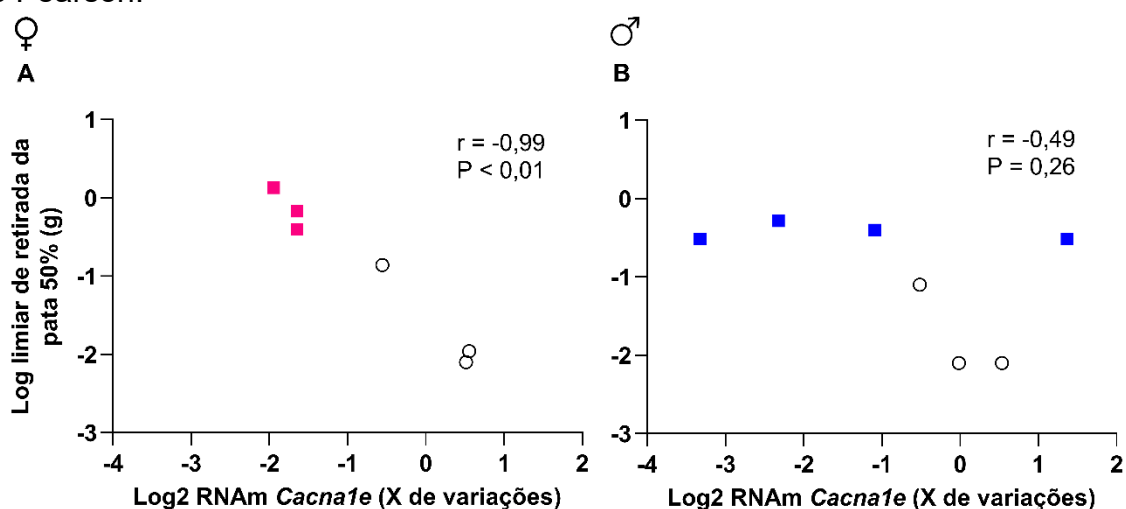
Figura 6 – Decurso temporal do tratamento com *Cacna1e*-siRNA na POP em camundongos fêmeas e machos. Efeito antinociceptivo do *Cacna1e*-siRNA i.t. (3 dias, última injeção 24 horas antes da cirurgia) na POP em camundongos fêmeas (B, D, F, H, I e J) e machos (C, E, G, H, I e J). A – Desenho experimental do protocolo de tratamento com *Cacna1e*-siRNA ou scr-siRNA com indução de POP em camundongos fêmeas e machos. B e C – Decurso temporal do efeito do *Cacna1e*-siRNA ou scr-siRNA (controle) na hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada de pata 50% (g)). D e E – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). F e G – Nocicepção espontânea (Soma das respostas por 30 minutos). H e I – Concentração proteica do Cav2.3 avaliada por Elisa no GRD (H) e na região lombar da medula espinhal (I) 3 horas após a cirurgia (ng/mL). J – Níveis de expressão transcricional avaliados por qPCR para o Cav2.3 (*Cacna1e*) 3 horas após a cirurgia (número de variações). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo B-G e n = 4/5 por grupo H-J) 2-3 blocos experimentais independentes. B-G foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparados ao grupo scr-siRNA) e Tukey (comparados com basal). H-J foram analisados pelo teste-t de Student. *p < 0,05; **p < 0,01; e ***p < 0,001 comparados com scr-siRNA. (B1) = basal antes do tratamento. (B2) = basal após o tratamento com *Cacna1e*-siRNA ou scr-siRNA e antes da cirurgia. Teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e nenhum foi detectado.



Detectamos uma correlação negativa significativa entre os limiares de retirada da pata e os níveis de RNAm para o gene *Cacna1e* em fêmeas operadas ($r = -0,99$, $P < 0,01$) (Figura 7A), mas não em camundongos machos operados ($r = -0,49$, $P = 0,26$) (Figura 7B). Fêmeas tratadas com controle possuem maiores níveis de RNAm para o *Cacna1e* e menores níveis de limiar de retirada da pata, indicando nocicepção. Já as fêmeas tratadas com o siRNA contra o Cav2.3 possuem menores níveis de

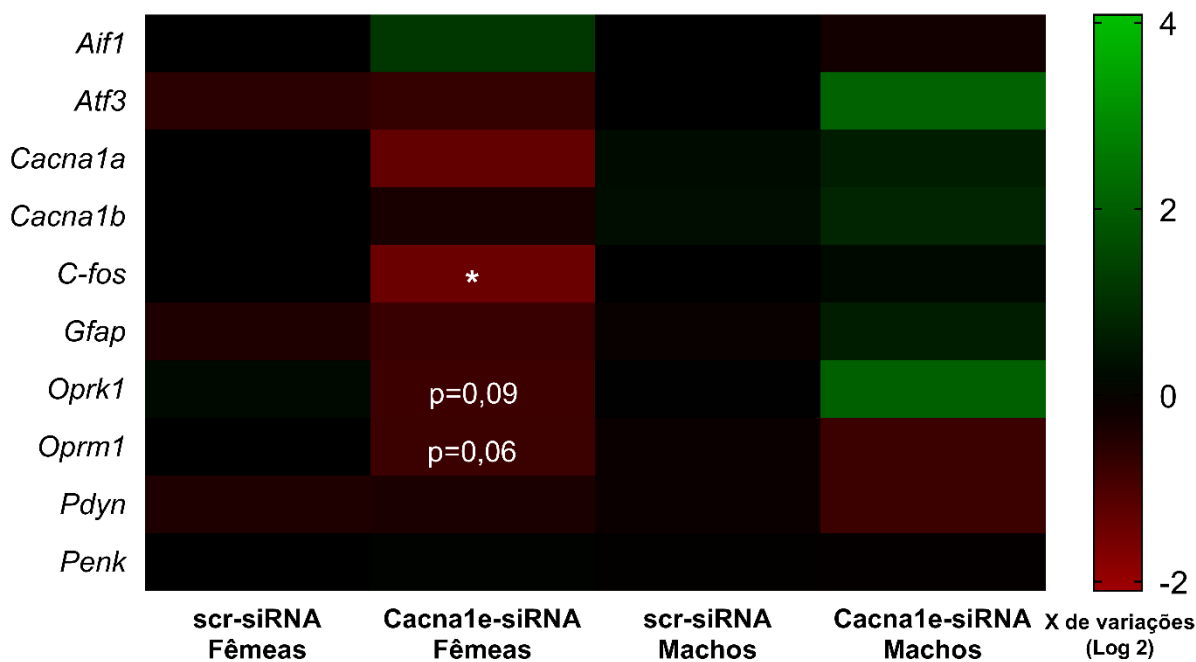
RNA*m* para o *Cacna1e* e maiores níveis de limiar de retirada de pata, indicando um efeito antinociceptivo.

Figura 7 – Correlação do tratamento com *Cacna1e*-siRNA entre os níveis de nocicepção e os níveis de RNA*m* para *Cacna1e*. Análise de correlação entre o limiar de retirada da pata (g) e os níveis de RNA*m* para o gene *Cacna1e* no tratamento com *Cacna1e*-siRNA ou scr-siRNA após cirurgia em camundongos fêmeas (A) (quadrados rosa indicam tratamento com *Cacna1e*-siRNA e círculos abertos indicam scr-siRNA) com e machos (B) (quadrados azuis indicam tratamento com *Cacna1e*-siRNA e círculos abertos indicam scr-siRNA). Dados expressos como média (Log 10 para limiar de retirada da pata e Log 2 para os níveis de RNA*m* para o gene *Cacna1e*) (n = 3 por grupo). $p < 0,01$ comparado com grupo scr-siRNA, determinado pelo teste “r” de Pearson.



O nosso tratamento com *Cacna1e*-siRNA demonstrou ser seletivo para o *Cacna1e*, visto que o tratamento com o silenciador não gerou alteração nos níveis de RNA*m* para os genes que codificam o Cav2.1 (*Cacna1a*) e Cav2.2 (*Cacna1b*), nem para as fêmeas e nem para os machos. O tratamento com o silenciador foi capaz de diminuir os níveis de RNA*m* para o marcador de atividade neuronal (C-fos) e desenvolveu uma tendência a diminuição do RNA*m* para os genes que codificam os receptores kappa e mu-opioides nas fêmeas (Figura 8). Nenhuma alteração significativa foi detectada para os níveis de RNA*m* nos machos tratados com o *Cacna1e*-siRNA para nenhum dos genes avaliados. (Figura 8).

Figura 8 – Expressão medular de genes relacionados a dor após o tratamento com *Cacna1e*-siRNA ou scr-siRNA após cirurgia. Níveis de expressão transcricional avaliados por qPCR para IBA-1 (*Aif1*), ATF3 (*Atf3*), canais de cálcio do tipo P/Q (*Cacna1a*), e tipo N (*Cacna1b*), C-FOS (*C-fos*), GFAP (*Gfap*), KOR (*Oprk1*), MOR (*Oprm1*), Prodinorfina (*Pdyn*) e Enkefalina (*Penk*) na região lombar da medula espinhal 3 horas após a cirurgia e 24 horas após o último tratamento com *Cacna1e*-siRNA ou scr-siRNA. Dados expressos como média normalizados por log de 2, analisados por teste-t de Student (n = 3-4 por grupo). *p < 0,05 comparados com grupo scr-siRNA (controle).



Esses dados sugerem que a diminuição da expressão medular do Cav2.3 preveniu o desenvolvimento da nocicepção pós-operatória, bem como diminuiu a expressão de alguns genes relacionados a dor nas fêmeas.

5.3. Efeito do pós-tratamento intratecal com morfina na dor pós-operatória

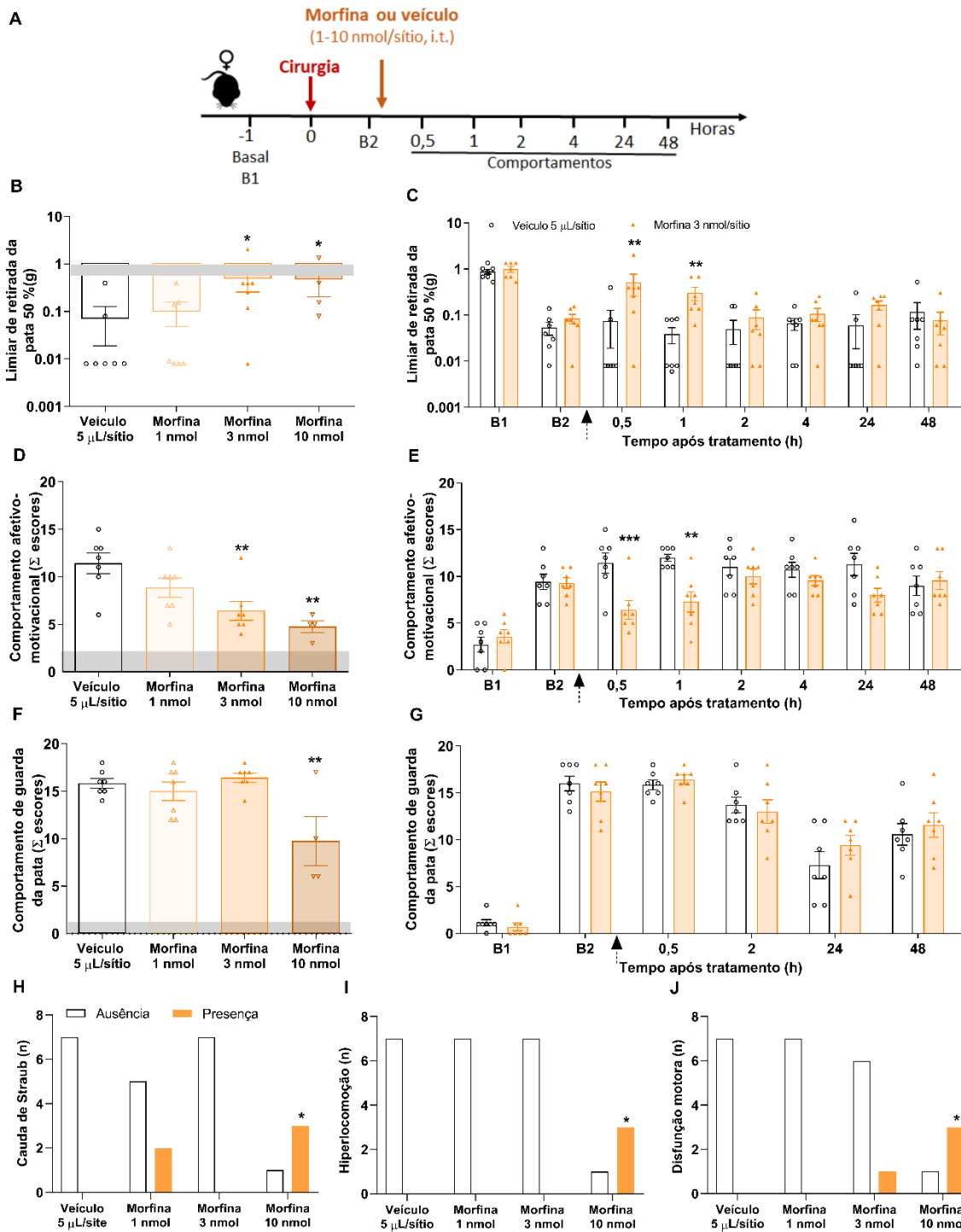
Medicamentos opioides são considerados o padrão ouro para o tratamento da dor pós-operatória, por isso o presente trabalho utiliza morfina como seu controle positivo. Para verificar a ação dos opioides em um processo doloroso já estabelecido, realizamos o tratamento com morfina 60 minutos após a cirurgia em camundongas fêmeas, imediatamente após a verificação da nocicepção induzida pela incisão na pata. Foi feita uma curva dose-resposta para a morfina (1, 3 e 10 nmol/sítio) referente aos valores de 30 minutos após o tratamento intratecal com a morfina. A cirurgia continuou a causar nocicepção (Figura 9B-G). Foi visto que a dose de 1 nmol/sítio não foi capaz de reverter a nocicepção em nenhum dos parâmetros verificados

(Figura 9B, D e F). A dose intermediária de morfina (3 nmol/sítio) reverteu a hiperalgesia mecânica, revertendo a queda no limiar de retirada da pata e o comportamento afetivo motivacional causada pela cirurgia (Figura 9B e D). A dose mais elevada de morfina (10 nmol/sítio) teve efeito antinociceptivo, pois reverteu a queda no limiar de retirada da pata ($67\% \pm 23\%$) (Figura 9B). Essa dose também reverteu o comportamento afetivo motivacional onde o tratamento com morfina 10 nmol/sítio foi capaz de diminuir os escores afetivos motivacionais ($54\% \pm 2\%$) (Figura 9D). Por fim, essa maior dose de morfina testada (10 nmol/sítio) foi a única dose capaz de diminuir o comportamento de guarda da pata ($38\% \pm 14\%$) (Figura 9F).

Apesar dos dados promissores com a maior dose de morfina (10 nmol/sítio), a mesma dose desencadeou efeitos adversos graves significativos como a presença de cauda de Straub, hiperlocomoção e disfunção motora (Figura 9H, I e J, respectivamente).

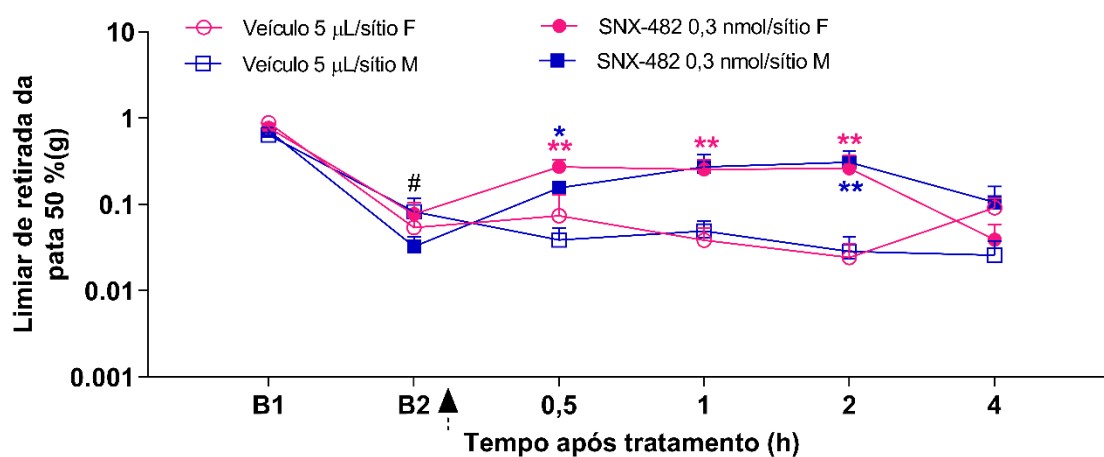
Por esses motivos, a dose de morfina de 3 nmol/sítio foi considerada a dose eficaz e segura. Assim, foi verificado o decurso temporal para o tratamento intratecal com morfina nessa dose. Foi visto que o tratamento com morfina 3 nmol/sítio foi capaz de reverter a queda no limiar de retirada da pata causada pela incisão meia hora após o tratamento com efeito até uma hora após o tratamento ($51\% \pm 20\%$) (Figura 9C). Essa dose de morfina diminuiu o comportamento afetivo motivacional de meia até uma hora após o tratamento ($44\% \pm 5\%$) (Figura 9E). Além disso, essa dose não foi capaz de diminuir no comportamento de guarda da pata (Figura 9G). Confirmando assim que essa dose possui efeito antinociceptivo capaz de reverter a nocicepção causada pela cirurgia.

Figura 9 – Efeito antinociceptivo do tratamento intratecal com morfina no modelo de POP em fêmeas. Curva dose-resposta (B, D e F) e decurso temporal (C, E e G) do efeito antinociceptivo do pós-tratamento com morfina (1, 3 e 10 nmol/sítio, i.t., 60 minutos após cirurgia) na POP em camundongos fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de pós-tratamento (60 minutos após POP) com morfina (1, 3 e 10 nmol/sítio, i.t.) em camundongos fêmeas. B e C – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). D e E – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). F e G – Nocicepção espontânea (Soma das respostas até 30 minutos). H, I e J – Verificação de efeitos adversos causados pelo pós-tratamento intratecal com morfina (H – Presença ou ausência de cauda de Straub, número de animais), (I – Presença ou ausência de hiperlocomoção, número de animais) e (J - Presença ou ausência de disfunção motora, número de animais). Dados expressos como média \pm E.P.M. (B – G) e expressos como número de animais com comportamento presente/número total de animais tratados (H – J) (n = 8 por grupo morfina 1 e 3 nmol/sítio e n = 4 para morfina 10 nmol/sítio) 2–3 blocos experimentais independentes. B, D e F foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós teste de Dunnett. C, E e G foram analisados pela ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparado ao grupo veículo) e Tukey (comparado ao basal). H – J foram analisados pelo teste de qui-quadrado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ comparados com grupo veículo. (B1) = basal antes da cirurgia. (B2) = basal 60 minutos após cirurgia. Barras cinzas na horizontal (B, D e F) indicam os valores basais e as setas indicam o momento do tratamento (C, E e G). O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e foram detectados um no grupo veículo, um no grupo morfina (1 nmol/sítio), um no grupo morfina (3 nmol/sítio) e mais um no grupo morfina (10 nmol/sítio).



Com a dose efetiva definida, fomos verificar se existe diferença sexual na resposta à morfina. Camundongos fêmeas e machos foram tratados com a dose efetiva de morfina (3 nmol/sítio) por via intratecal, 60 minutos após cirurgia. As respostas demonstraram ser similares entre os sexos, onde 30 minutos após o tratamento intratecal foi observado um efeito antinociceptivo nas fêmeas e machos tratados com morfina 3 nmol/sítio (Figura 10).

Figura 10 – Comparação sexual do feito antinociceptivo do pós-tratamento com morfina na POP. Comparação por sexo do pós-tratamento intratecal (60 minutos após POP) com morfina (3 nmol/sítio) em camundongos fêmeas (linhas rosas) e machos (linhas azuis) (Limiar de retirada de pata 50% (g)). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo). 2-3 blocos experimentais independentes, analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas seguido pelos pós testes de Sidak (comparados ao grupo veículo) e Tukey (comparado aos valores basais). #p < 0,05 comparados com valores basais; *p < 0,05; **p < 0,01; e ***p < 0,001 comparados com grupo veículo. (B1) = basal antes da cirurgia. (B2) = basal 60 minutos após cirurgia. A seta indica o momento do tratamento. O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e foram detectados no grupo veículo machos e um no grupo veículo fêmeas.



Com esse conjunto de dados conseguimos definir a dose efetiva segura de morfina (3 nmol/sítio), verificar que a morfina possui um efeito antinociceptivo similar entre machos e fêmeas e observar efeitos adversos importantes desencadeados pela dose mais alta de morfina (10 nmol/sítio).

5.4. Efeito do pós-tratamento intratecal com o bloqueador do Cav2.3 na dor pós-operatória

Após definir as melhores condições para o pós-tratamento intratecal com morfina, nós fomos definir as melhores condições para o pós-tratamento intratecal com o bloqueador do CCDV Cav2.3, SNX-482. O modelo de POP foi induzido em camundongos fêmeas, foi realizada a verificação dos comportamentos nociceptivos em uma hora após POP e imediatamente após foi feito tratamento intratecal com o SNX-482.

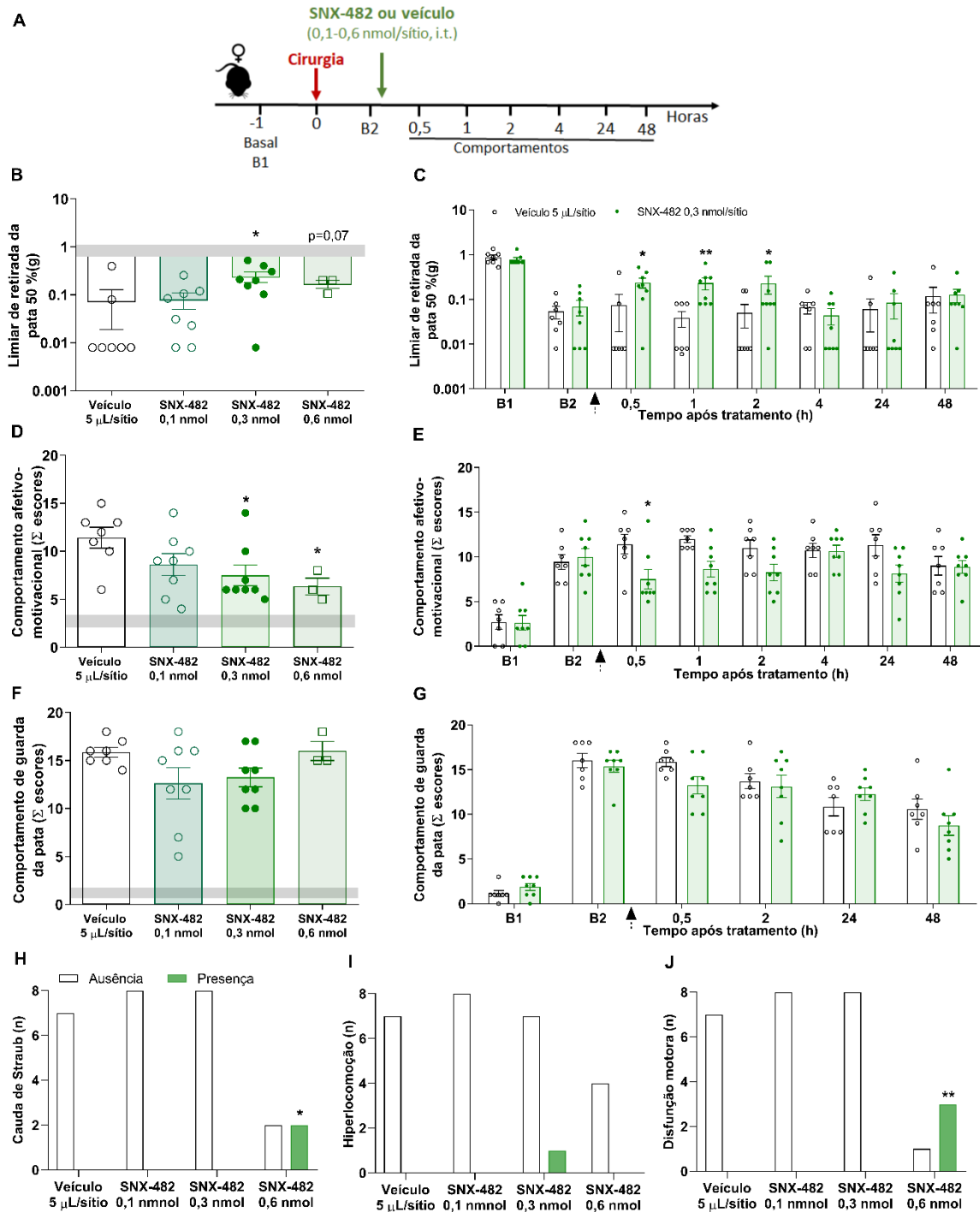
Para verificar a melhor escolha das doses de SNX-482 foi realizada uma curva dose-resposta com as doses de 0,1, 0,3 e 0,6 nmol/sítio. Os dados nos gráficos correspondem a resposta ao tratamento intratecal com as diferentes doses de SNX-

482 30 minutos após o tratamento. A dose mais baixa de SNX-482 (0,1 nmol/sítio) não foi capaz de reverter a nocicepção causada pela incisão na pata (Figura 11B, D e F). A dose intermediária de 0,3 nmol/sítio de SNX-482 foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica e o comportamento afetivo-motivacional, mas não o comportamento de guarda de pata quando comparados ao grupo veículo (Figura 11B, D e F, respectivamente). A dose mais elevada de SNX-482, 0,6 nmol/sítio demonstrou uma tendência a reverter a hiperalgesia mecânica e reverteu de forma significativa o comportamento afetivo-motivacional, mas não o comportamento de guarda de pata quando comparados ao grupo veículo (Figura 11B, D e F, respectivamente).

Após, verificamos a capacidade das diferentes doses de SNX-482 causarem efeitos adversos graves. O tratamento intratecal com SNX-482 feito 1 hora após a indução da POP não gerou efeitos adversos graves, como cauda de Straub, hiperlocomoção e disfunção motora, na menor dose (0,1 nmol/sítio) e nem na dose intermediária (0,3 nmol/sítio) (Figura 11H, I e J). A maior dose de SNX-482 testada (0,6 nmol/sítio) causou efeitos adversos significativos como cauda de Straub e disfunção motora (Figura 11H e J, respectivamente).

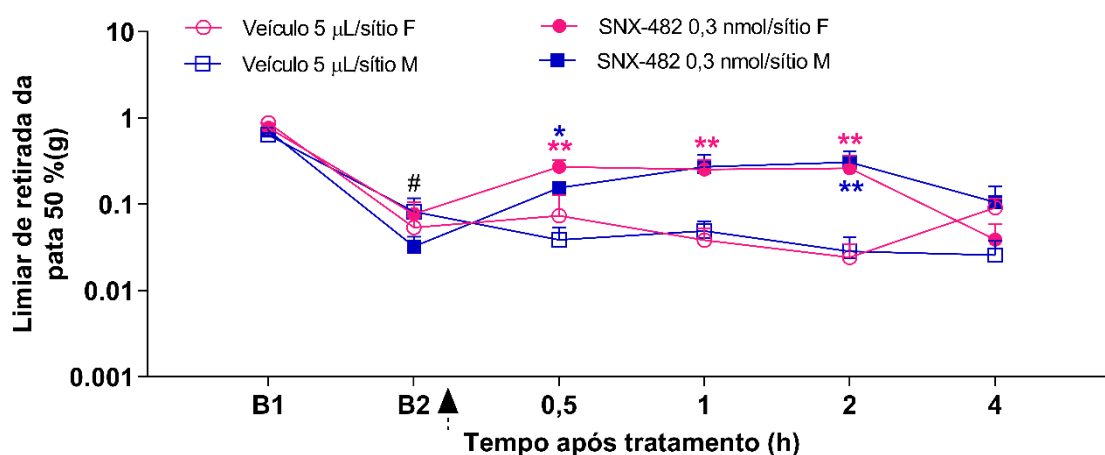
Por esses motivos, a dose de 0,3 nmol/sítio de SNX-482 foi considerada a dose segura e eficaz. Essa dose de SNX-482 foi capaz de reverter a queda do limiar de retirada da pata causada pela incisão de 30 minutos por até 2 horas após o tratamento com SNX-482 ($33\% \pm 7\%$) (Figura 11C). Houve diminuição no comportamento afetivo-motivacional 30 minutos após o tratamento com SNX-482 ($33\% \pm 3\%$) (Figura 11E). No entanto, essa dose de SNX-482 não foi capaz de diminuir o comportamento de guarda da pata dos animais quando comparados ao grupo veículo (Figura 11G).

Figura 11 – Efeito antinociceptivo do tratamento intratecal com SNX-482 no modelo de POP em fêmeas. Curva dose-resposta (B, D e F) e decurso temporal (C, E e G) do efeito antinociceptivo do pós-tratamento com SNX-482 (0,1; 0,3 e 0,6 nmol/sítio, i.t., 60 minutos após cirurgia) na POP em camundongos fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de pós-tratamento (60 minutos após POP) com SNX-482 (0,1; 0,3 e 0,6 nmol/sítio, i.t.) em camundongos fêmeas. B e C – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). D e E – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). F e G – Nocicepção espontânea (Soma das respostas até 30 minutos). H, I e J – Verificação de efeitos adversos causados pelo pós-tratamento intratecal com SNX-482 (H – Presença ou ausência de cauda de Straub, número de animais), (I – Presença ou ausência de hiperlocomoção, número de animais) e (J - Presença ou ausência de disfunção motora, número de animais). Dados expressos como média \pm E.P.M. (B – G) e expressos como número de animais com comportamento presente/número total de animais tratados (H – J) (n = 8 por grupo) 2–3 blocos experimentais independentes. B, D e F foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós teste de Dunnett. C, E e G foram analisados pela ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparado ao grupo veículo) e Tukey (comparado ao basal). H – J foram analisados pelo teste de qui-quadrado. *p < 0,05, **p < 0,01; e ***p < 0,001 comparados com grupo veículo. (B1) = basal antes da cirurgia. (B2) = basal 60 minutos após cirurgia. Barras cinzas na horizontal (B, D e F) indicam os valores basais e as setas indicam o momento do tratamento (C, E e G). O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e foi detectado um no grupo veículo.



Com a dose efetiva definida, fomos verificar a existência se uma possível diferença sexual na resposta antinociceptiva frente ao tratamento com SNX-482. Camundongos fêmeas e machos foram tratados com SNX-482 (0,3 nmol/sítio) por via intratecal, 60 minutos após a indução de POP. As respostas demonstraram serem similares entre os sexos. O efeito antinociceptivo foi visto de 30 minutos até 2 horas após o tratamento com SNX-482, com padrão de resposta similar entre os sexos (Figura 12).

Figura 12– Comparação sexual do feito antinociceptivo do pós-tratamento com SNX-482 na POP. A – Comparação por sexo do pós-tratamento intratecal (60 minutos após POP) com SNX-482 (0,3 nmol/sítio) em camundongos fêmeas (linhas rosas) e machos (linhas azuis) (Limiar de retirada de pata 50% (g)). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo). 2-3 blocos experimentais independentes, analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas seguido pelos pós testes de Sidak (comparados ao grupo veículo) e Tukey (comparado aos valores basais). #p < 0,05 comparados com valores basais; *p < 0,05 e **p < 0,01 comparados com grupo veículo. (B1) = basal antes da cirurgia. (B2) = basal 60 minutos após cirurgia. A seta indica o momento do tratamento. O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e foram detectados um no grupo veículo machos e um no grupo veículo fêmeas.



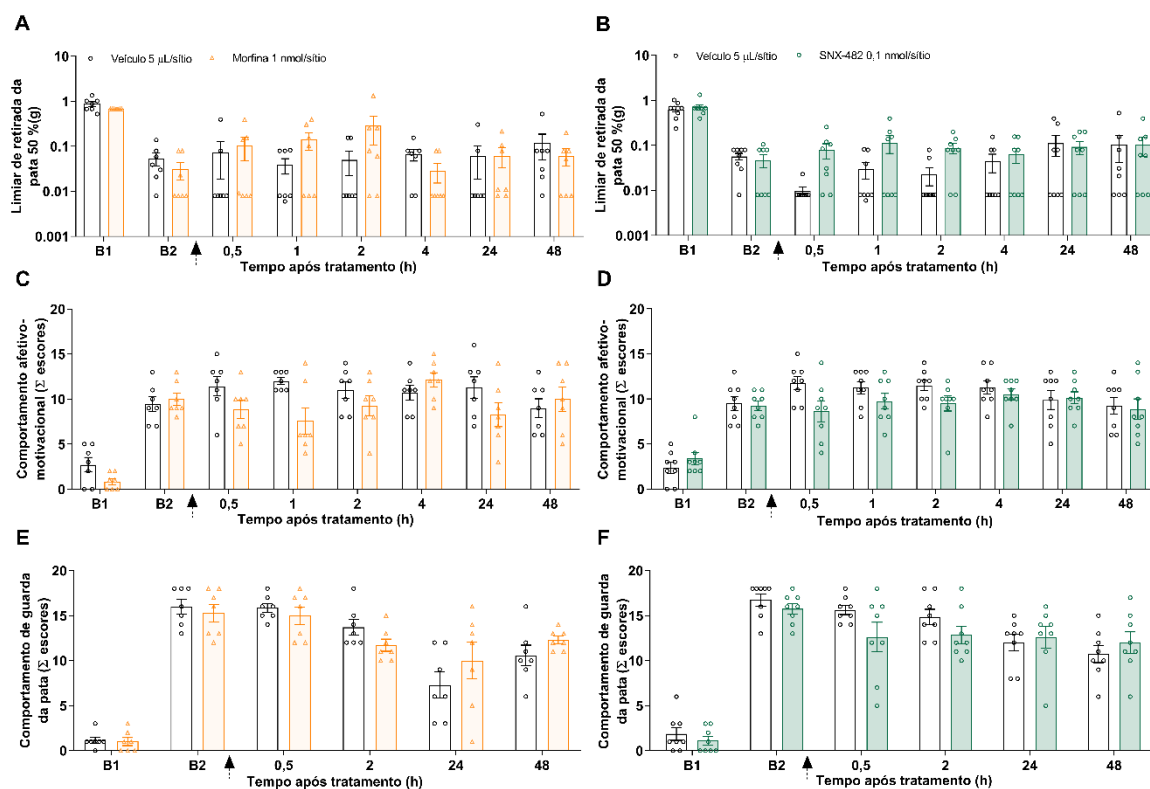
Com esse conjunto de dados conseguimos definir a dose efetiva do SNX-482 (0,3 nmol/sítio), observar o decurso temporal do efeito do SNX-482 intratecal e observar que não houve efeitos adversos importantes desencadeados pelo tratamento com a menor dose e com a dose intermediária de SNX-482 (0,1, e 0,3 nmol/sítio), mas que a dose mais elevada de SNX-482 (0,6 nmol/sítio) desencadeou efeitos adversos.

5.5. Efeito do pós-tratamento com a combinação de doses sub efetivas de morfina e SNX-482 na dor pós-operatória

Verificando o decurso temporal do pós-tratamento com as diferentes doses de morfina e SNX-482, definimos que a dose de 1 nmol/sítio de morfina e a dose de 0,1 nmol/sítio de SNX-482 são consideradas as doses sub efetivas dessas duas substâncias. Como mostrados anteriormente, as doses de 3 nmol/sítio de morfina e de 0,3 nmol/sítio de SNX-482 são consideradas as doses seguras e efetivas, pois possuem com efeito antinociceptivo sem causar efeitos adversos significantes. Foi

usado o mesmo protocolo experimental descrito anteriormente, foi feito tratamento por via intratecal 60 minutos após a cirurgia com as doses sub efetivas de morfina (1 nmol/sítio) e (SNX-482 0,1 nmol/sítio) de maneira isolada. Essas doses sub efetivas não possuem nenhum efeito antinociceptivo em nenhum dos tempos e em nenhum dos parâmetros nociceptivos avaliados (Figura 13). Como mostrado anteriormente, essas doses sub efetivas de morfina (1 nmol/sítio) e SNX-482 (0,1 nmol/sítio) não são capazes de desencadear efeitos adversos (Figura 9H – J e Figura 11H – J, respectivamente).

Figura 13 – Decurso temporal do efeito intratecal de doses sub efetivas de morfina e SNX-482 na POP em fêmeas. Decurso temporal (A – F) do efeito do pós-tratamento intratecal com doses sub efetivas de morfina (1 nmol/sítio, i.t., 60 minutos após cirurgia) (A, C e E) ou SNX-482 (0,1 nmol/sítio, i.t., 60 minutos após cirurgia) (B, D e F) na POP em camundongos fêmeas. A e B – Verificação da hiperalgisia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C e D – Escore de hiperalgisia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). E e F – Nocicepção espontânea (Soma das respostas até 30 minutos). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo) 2–3 blocos experimentais independentes. A, C e E foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparado ao grupo veículo) e Tukey (comparado ao basal). B, D e F foram analisados pela ANOVA de uma via seguida pelo pós teste de Dunnett. (B1) = basal antes da cirurgia. (B2) = basal 60 minutos após cirurgia. Setas indicam o momento do tratamento (A – F). O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e foi detectado um no grupo morfina 1 nmol/sítio.



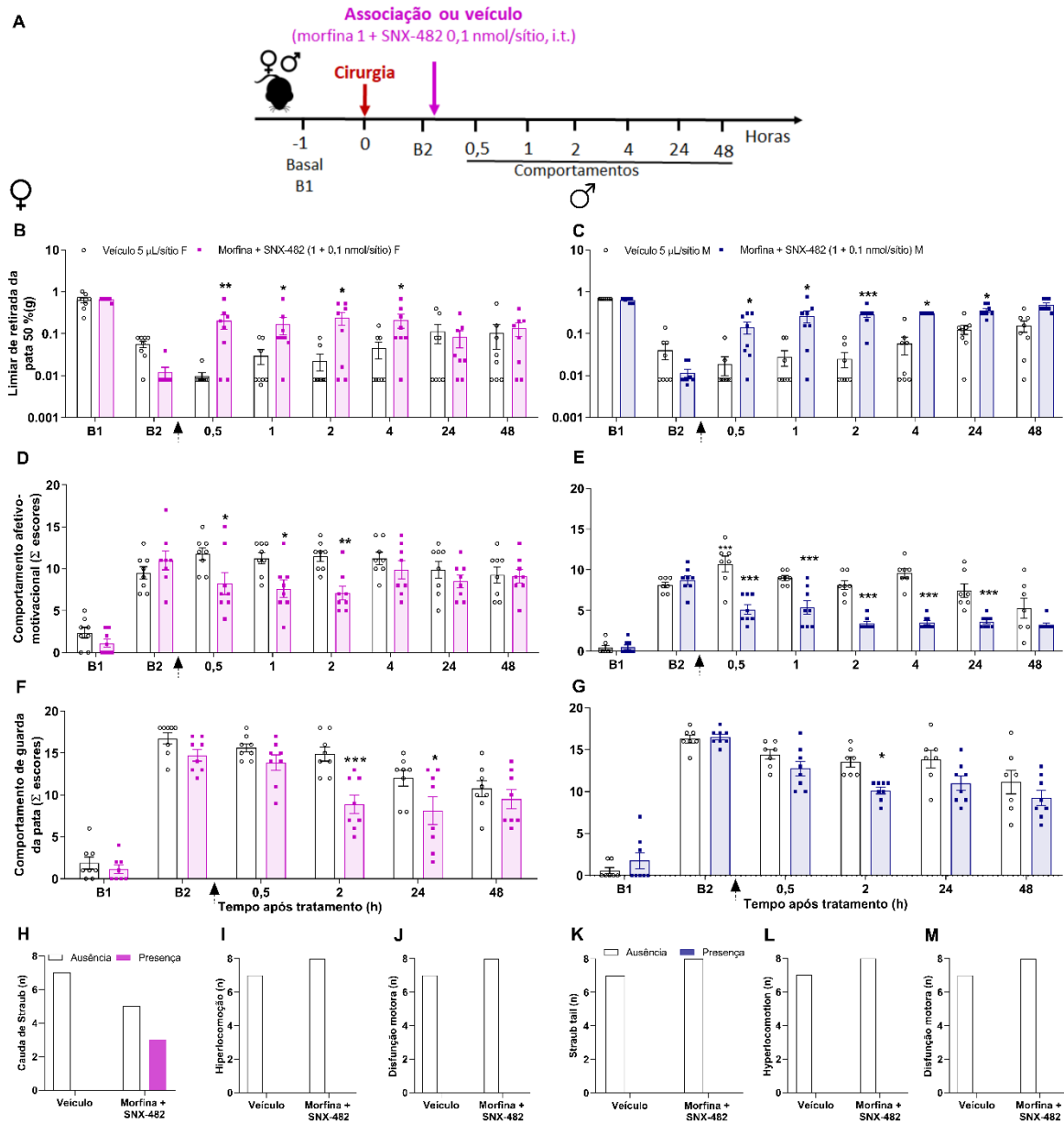
Uma estratégia utilizada para diminuir os efeitos adversos desencadeados pelo uso dos opioides é através da utilização de adjuvantes a essa terapia. Visando isso, utilizamos a combinação de doses sub efetivas de morfina (1 nmol/sítio) e SNX-482 (0,1 nmol/sítio). Foi utilizado o mesmo protocolo experimental de tratamento citado anteriormente, foi feito um pós-tratamento intratecal 60 minutos após a cirurgia. Além disso, para verificar se o tratamento intratecal com essa combinação possui alguma diferença sexual, o tratamento com a associação foi feito em fêmeas e em machos.

Nas fêmeas essa combinação de doses sub efetivas de morfina (1 nmol/sítio) e SNX-482 (0,1 nmol/sítio) foi capaz de reverter a nocicepção desencadeada pela cirurgia quando comparados ao grupo veículo. A reversão na queda do limiar de retirada de pata foi vista meia hora após o tratamento e durou por até quatro horas após o tratamento intratecal com a combinação (39% ± 14) (Figura 14B). A combinação foi capaz de diminuir o comportamento afetivo motivacional de meia hora por até duas horas após o tratamento (37% ± 4%) (Figura 14D). Em relação nocicepção espontânea, o tratamento com a combinação foi capaz de diminuir a o comportamento de guarda da pata nas fêmeas em duas horas após o tratamento e esse efeito durou por até 24 horas (40% ± 5%) (Figura 14F). Avaliamos os possíveis efeitos adversos desencadeados pelo pós-tratamento intratecal com a associação

(morfina 1 + SNX-482 0,1 nmol/sítio). Assim, foram avaliados a presença de cauda de Straub, hiperlocomoção e disfunção motora (Figura 14H, I e J, respectivamente). Não foram vistos o desenvolvimento de efeitos adversos significantes do tratamento intratecal com a associação nas fêmeas quando comparados ao grupo controle.

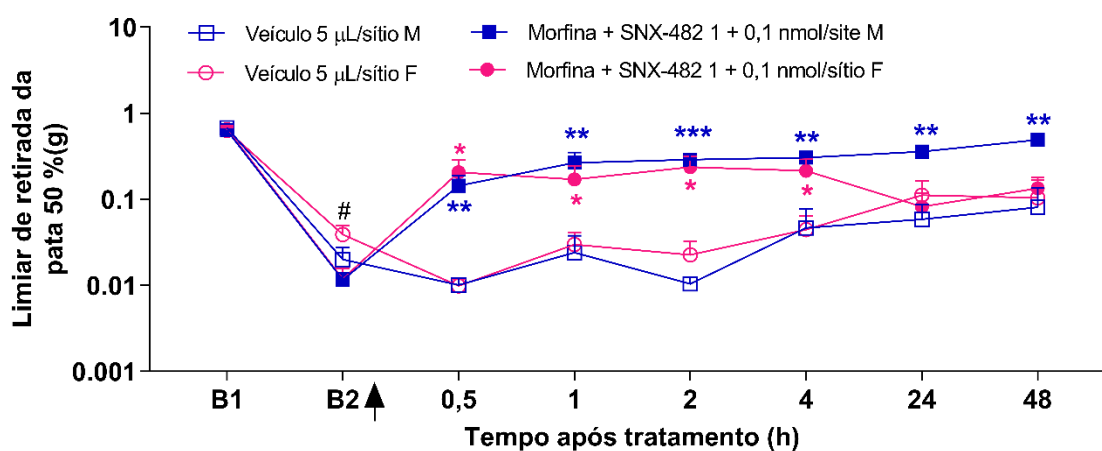
Para os machos o tratamento com a combinação (morfina 1 + SNX-482 0,1 nmol/sítio) também houve uma reversão da nocicepção. A reversão na queda do limiar de retirada da pata foi vista meia hora após o tratamento e perdurou por até 48 horas após o tratamento intratecal com a combinação (42% ± 13%) (Figura 14C). O mesmo efeito foi visto para o comportamento afetivo motivacional, onde ocorreu a diminuição deste comportamento a partir de meia hora com efeito até 48 horas após o pós-tratamento intratecal com a combinação (31% ± 11%) (Figura 14E). Por fim, foi vista uma reversão no comportamento de guarda da pata nos machos operados apenas no tempo de duas horas após o pós-tratamento intratecal com a associação (25% ± 1%) (Figura 14G). Foram avaliados a presença de cauda de Straub, hiperlocomoção e disfunção motora (Figura 14K, L e M, respectivamente). Não foram vistos o desenvolvimento de efeitos adversos significantes do tratamento intratecal com a associação nos machos quando comparados ao grupo controle.

Figura 14 – Decurso temporal do efeito antinociceptivo da combinação intratecal de doses sub efetivas de morfina e SNX-482 na POP. Decurso temporal do efeito antinociceptivo do pós-tratamento (60 minutos após POP) com associação de morfina (1 nmol/sítio) mais SNX-482 (0,1 nmol/sítio) na POP em camundongos fêmeas (B, D, F, H, I e J) e machos (C, e, G, K, L e M). A – Desenho experimental do protocolo de pós-tratamento (60 minutos após POP) com associação de morfina (1 nmol/sítio) mais SNX-482 (0,1 nmol/sítio) na POP. B e C – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). D e E – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). F e G – Nocicepção espontânea (Soma das respostas até 30 minutos). H – M – Verificação de efeitos adversos causados pelo pós-tratamento intratecal com SNX-482 (H e K – Presença ou ausência de cauda de Straub, número de animais), (I e L – Presença ou ausência de hiperlocomoção, número de animais) e (J e M – Presença ou ausência de disfunção motora, número de animais). Dados expressos como média ± E.P.M. (B – G) e expressos como número de animais com comportamento presente/número total de animais tratados (H – M) (n = 8 por grupo) 2-3 blocos experimentais independentes. B – G foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparados ao grupo controle) e Tukey (comparados com basal). H – M foram analisados pelo do qui-quadrado. *p < 0,05; **p < 0,01; e ***p < 0,001 comparados com veículo. (B1) = basal antes da cirurgia. (B2) = basal 60 minutos após cirurgia. Teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e um outlier foi detectado no grupo veículo machos.



Para verificar as diferenças sexuais no pós-tratamento com a combinação foram avaliados os valores dos limiares de retirada da pata de fêmeas e machos (Figura 15). Assim, podemos visualizar que o padrão de resposta para os dois sexos foi semelhante e obtivemos um efeito antinociceptivo da associação nos dois sexos. No entanto, o efeito antinociceptivo nos machos durou por mais tempo (por até 48 horas após o tratamento).

Figura 15 – Comparação sexual do feito antinociceptivo do pós-tratamento com a combinação de morfina e SNX-482 na POP. A – Comparação por sexo do pós-tratamento intratecal (60 minutos após POP) com a associação de morfina mais SNX-482 (morfina 1 e SNX-482 0,1 nmol/sítio) em camundongos fêmeas (linhas rosas) e machos (linhas azuis) (Limiar de retirada de pata 50% (g)). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo). 2-3 blocos experimentais independentes, analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas seguido pelos pós testes de Sidak (comparados ao grupo veículo) e Tukey (comparado aos valores basais). #p < 0,05 comparados com valores basais; *p < 0,05; **p < 0,01; e ***p < 0,001 comparados com grupo veículo. (B1) = basal antes da cirurgia. (B2) = basal 60 minutos após cirurgia. A seta indica o momento do tratamento. O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e foram detectados um no grupo veículo machos e um no grupo veículo fêmeas.



Esses dados demonstraram que a associação de morfina e SNX-482 em doses sub efetivas foi capaz de reverter a nocicepção causada pela cirurgia em ambos os sexos e que essas doses não desencadeiam efeitos adversos graves.

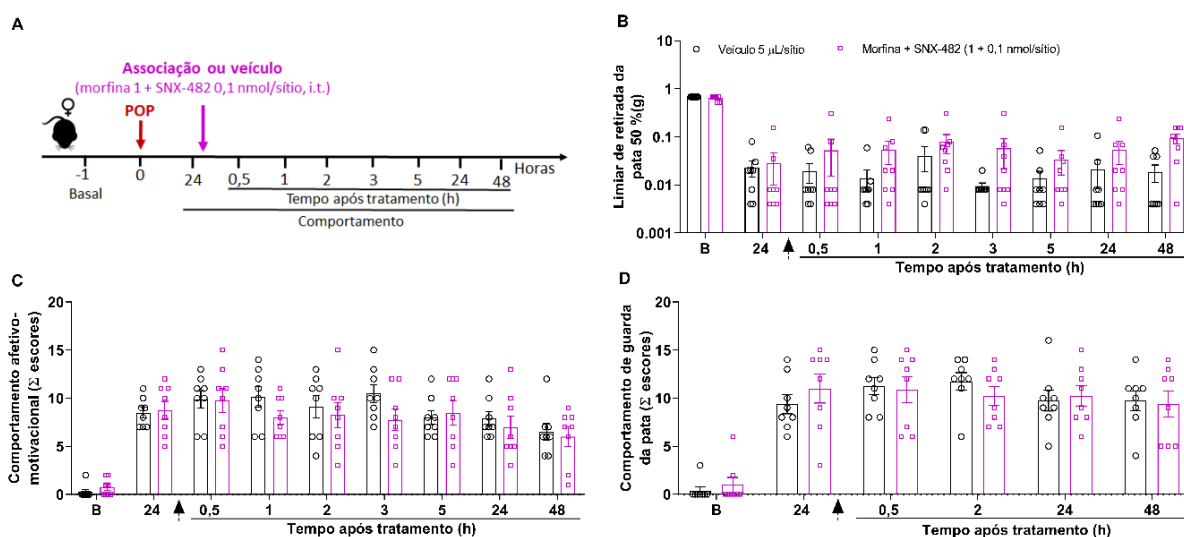
5.6. Efeito do tratamento com a combinação em diferentes tempos na dor pós-operatória

Após verificar o promissor efeito antinociceptivo da associação de doses sub efetivas de morfina e SNX-482, fomos avaliar qual seria o efeito do tratamento com a combinação dessas doses sub efetivas (morfina 1 + SNX-482 0,1 nmol/sítio) em diferentes tempos de tratamento.

Para verificar se a associação de doses sub efetivas seria capaz de reverter um processo nociceptivo completamente estabelecido, nós realizamos o tratamento intratecal com a associação das sub doses em fêmeas 24 horas após a cirurgia. O pós-tratamento com a combinação 24 horas após a cirurgia não foi capaz de reverter a queda no limiar de retirada da pata (Figura 16B) causada pela cirurgia. Esse

tratamento 24 horas após a cirurgia não foi capaz de diminuir o comportamento afetivo motivacional e nem o comportamento de guarda da pata (Figura 15C e D, respectivamente).

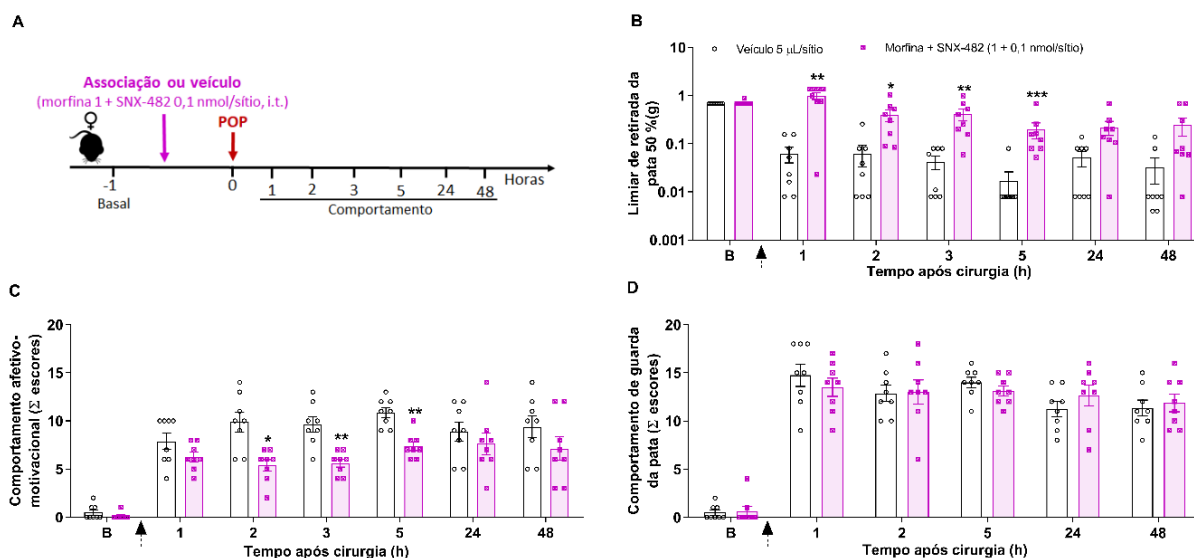
Figura 16 – Decurso temporal do tratamento com a combinação intratecal de morfina e SNX-482, 24 horas pós POP em fêmeas. Efeito do pós-tratamento com a combinação de morfina mais SNX-482 na POP em camundongos fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de pós-tratamento (24 horas após POP) com associação de morfina (1 nmol/sítio) mais SNX-482 (0,1 nmol/sítio) na POP. B – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). D – Nocicepção espontânea (Soma das respostas até 30 minutos). Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 8$ por grupo) 2-3 blocos experimentais independentes. B – D foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparados ao grupo controle) e Tukey (comparados com basal). (B) = basal. A seta indica o momento do tratamento. Teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e nenhum foi detectado.



A fim de verificar se o tratamento intratecal com a combinação doses sub efetivas de morfina (1 nmol/sítio) e SNX-482 (0,1 nmol/sítio) seria capaz de prevenir o desenvolvimento da nocicepção causada pela cirurgia realizamos um pré-tratamento com essa combinação em camundongos fêmeas. Esse tratamento com a associação foi feito por via intratecal, cinco minutos antes da cirurgia. O pré-tratamento com a combinação foi capaz de prevenir a queda no limiar de retirada da pata causada pela cirurgia (Figura 17B). Esse efeito foi visto na primeira hora e perdurou por até cinco horas após a cirurgia. No comportamento afetivo motivacional, o pré-tratamento com a associação foi capaz de diminuir esses escores quando

comparados ao grupo controle (Figura 17C). Essa diminuição foi vista de duas horas até cinco horas após a cirurgia. Por fim, o nosso pré-tratamento com a associação não foi capaz de prevenir o desenvolvimento do comportamento da guarda da pata (Figura 17D).

Figura 17 – Decurso temporal do efeito antinociceptivo do pré-tratamento com a combinação intratecal de morfina e SNX-482 na POP em fêmeas. Efeito antinociceptivo do pré-tratamento com associação de morfina mais SNX-482 na POP em camundongos fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de pré-tratamento (5 minutos antes da cirurgia) com associação de morfina (1 nmol/sítio) mais SNX-482 (0,1 nmol/sítio) na POP. B – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). D – Nocicepção espontânea (Soma das respostas até 30 minutos). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo) 2-3 blocos experimentais independentes. B – D foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparados ao grupo controle) e Tukey (comparados com basal). *p < 0,05; **p < 0,01; e ***p < 0,001 comparados com veículo. (B) = basal. A seta indica o momento do tratamento. Teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e nenhum foi detectado.

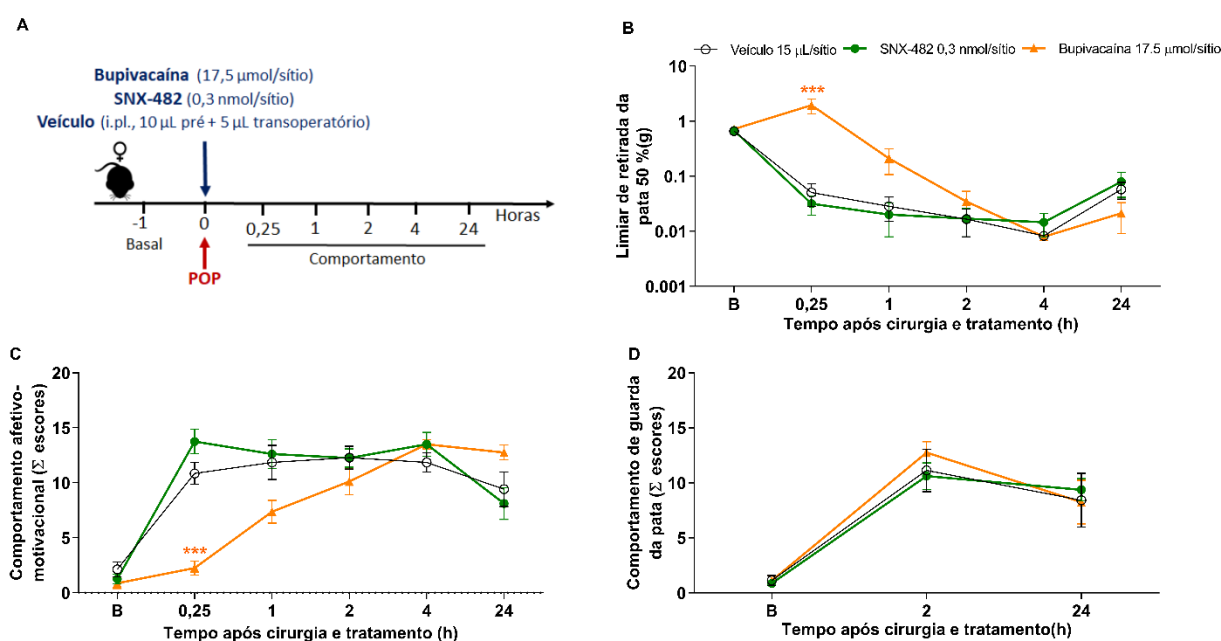


Esses dados nos sugerem que o a combinação não foi capaz de reverter um processo nociceptivo completamente estabelecido, mas que foi capaz de prevenir o desenvolvimento da nocicepção induzida pela cirurgia. Com isso, o Cav2.3 parece estar envolvido na indução e na fase inicial da nocicepção induzida pela cirurgia, mas não na fase de manutenção dessa nocicepção.

5.7. Efeito do tratamento intraplantar com o bloqueador do Cav2.3 na dor pós-operatória

Para verificar o papel do Cav2.3 no local da incisão foi realizado um tratamento intraplantar com o SNX-482 (0,3 nmol/sítio) e foi usado a bupivacaína (17,5 μ mol/sítio) como controle positivo. O tratamento intraplantar foi feito com 10 μ L, cinco minutos antes da POP e mais 5 μ L transoperatório, no momento da cirurgia. Esse protocolo experimental foi pensado para mimetizar o tratamento feito na clínica, onde a analgesia é feita pré- e intraoperatória. Visto que na clínica a bupivacaína possui um efeito relativamente curto, a primeira avaliação dos parâmetros nociceptivos foi feita 15 minutos após a POP. A bupivacaína foi capaz de prevenir a queda no limiar de retirada de pata apenas em 15 minutos após a POP (100% \pm 190% de efeito per se), uma hora após POP o efeito já não era mais estatisticamente significativo. O tratamento intraplantar com SNX-482 não preveniu a queda do limiar de retirada de pata (78% \pm 8%) (Figura 18B). Na avaliação do comportamento afetivo motivacional, a bupivacaína intraplantar foi capaz de prevenir o aumento dos escores nociceptivos 15 minutos após a cirurgia. No entanto, o SNX-482 não foi capaz de prevenir o aumento dos escores nociceptivos (Figura 18C). Em relação ao comportamento de guarda da pata, nenhum dos tratamentos intraplantares (bupivacaína e SNX-482) foram capazes de prevenir o aumento da guarda da pata dos animais operados (Figura 18D).

Figura 18– Decurso temporal do efeito do tratamento intraplantar com SNX-482 em fêmeas – Decurso temporal (B, C e D) do efeito do tratamento intraplantar com SNX-482, bupivacaína ou veículo na POP fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de tratamento intraplantar (10 μ L aplicados 5 minutos antes da cirurgia e 5 μ L aplicados no transoperatório) com SNX-482 (0,3 nmol/sítio, i.pl.) ou bupivacaína (17,5 μ mol/sítio, i.pl.). B – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de von Frey). D – Nocicepção espontânea (Soma das respostas até 30 minutos). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo). 2-3 blocos experimentais independentes, analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas seguido pelos pós testes de Sidak (comparados ao grupo veículo) e Tukey (comparado aos valores basais). ***p < 0,001 comparados com grupo veículo. (B) = basal. O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de possíveis pontos fora da curva e foi detectado um outlier no grupo veículo.



Com esses dados conseguimos concluir que o envolvimento do Cav2.3 na nocicepção pós cirúrgica parece não ser decorrente de um efeito no local da incisão, mas sim de um papel a nível medular.

6. DISCUSSÃO

O número de procedimentos cirúrgicos vem aumentando nos últimos anos, levando ao aumento da dor pós-operatória. Pacientes com dor pós-operatória apresentam dor em repouso (dor espontânea) bem como dor evocada ao toque. De maneira similar ao que ocorre em procedimentos cirúrgicos na clínica (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017), a incisão plantar em camundongos induziu nocicepção espontânea e nocicepção evocada ao toque (hiperalgesia mecânica) aguda, com um pico de nocicepção em 3 horas após a cirurgia até 2 dias após a cirurgia. Esses comportamentos de dor são condizentes com a dor em repouso e a dor evocada após cirurgia vista nos pacientes (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017).

A redução dos limiares de retirada de pata após a aplicação de filamentos de von Frey próximo ao local da incisão (hiperalgesia, aqui usada como termo guarda chuva que também incorpora a alodínia, conforme sugerido pela IASP no protocolo de Kyoto) (LOESER; TREEDE, 2008) por muitas vezes pode ser considerada apenas como um reflexo de retirada espinhal e não como um comportamento relacionado a dor no qual há o envolvimento de estruturas supra espinhais (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). Considerando isso, observamos que camundongos operados desenvolveram um aumento nos escores de comportamento afetivo-motivacional (AMB) após a aplicação de filamentos de von Frey. As respostas afetivo-motivacionais são comportamentos complexos que exigem processamento de estruturas límbicas e corticais, indicando assim motivação para a supressão das sensações aversivas (CORDER et al., 2017). Assim, a incisão na pata não somente sensibilizou o reflexo de retirada espinhal, mas também induziu a ativação de estruturas supra espinhais, indicando que tanto o componente sensorial quanto o afetivo da dor podem ser avaliados em nosso modelo.

Muitos modelos animais de dor utilizando medidas de nocicepção evocada falharam em sua translação clínica. Assim, a dor espontânea pode ser uma medida mais eficiente para se relacionar com a condição humana, o que aumenta a validade clínica dos modelos animais de dor (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). O comportamento de guarda da pata (correlacionado com a dor pós-operatória espontânea), mas não a hiperalgesia mecânica, vem sendo relacionado com a atividade espontânea dos neurônios do corno dorsal da medula de ratos operados

(XU; BRENNAN, 2009). Assim, o modelo de incisão plantar demonstra ter validade de construto e validade de face, permitindo assim o nosso estudo da participação do Cav2.3 na dor pós-operatória.

O sexo é uma variável importante a ser considerada em estudos clínicos e não clínicos de dor e analgesia (MOGIL, 2020). Nos últimos anos cresceu a preocupação com a inserção de animais machos e fêmeas nos estudos relacionados a dor (SORGE et al., 2015). 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 testes de retirada de cauda e placa quente (MEZIANE et al., 2007). Relatos anteriores também destacam que as variações detectadas em fêmeas foram as mesmas relatadas nos machos. Desta forma, o nosso estudo buscou incluir ambos os gêneros animais na avaliação dos parâmetros nociceptivos. Apesar do desenvolvimento da dor aguda ter demonstrado ser similar entre os sexos, um estudo com mais de 7 mil pacientes operados indicou uma diferença na intensidade a dor de maneira sexualmente dimórfica (homens demonstraram ter uma menor intensidade a dor). Além disso, nesse mesmo estudo foi observado um efeito dependente da localização e do tipo de cirurgia realizado, com diferentes escores de dor em cirurgias envolvendo tecidos tegumentares e musculoesqueléticos (TIGHE et al., 2015). O modelo de cirurgia plantar possui o envolvimento de tecidos tegumentares e musculoesqueléticos (incisão plantar da pele e fáscia da pata, além da tração muscular). De acordo com este dado e com achados encontrados previamente em roedores, a incisão plantar causou nocicepção espontânea e nocicepção evocada ao toque em camundongos de uma maneira sexualmente semelhante (em termos de intensidade e duração) (BANIK et al., 2006; KROIN et al., 2003).

Durante a caracterização do modelo de dor pós-operatória detectamos um aumento nos níveis de RNAm para os genes *c-Fos* e *Cacna1b* na medula espinhal de camundongos operados em ambos os sexos. A expressão proteica de Fos e o aumento nos níveis de RNAm para *c-Fos* vem sendo utilizados como marcador de excitabilidade neuronal em modelos de dor (HUNT; PINI; EVAN, 1987) e relatos na literatura demonstraram um aumento da expressão de Fos na medula espinhal de camundongos algumas horas após incisão plantar (CAMPILLO et al., 2010). É importante citar que o *Fos* é um gene regulado por cálcio, tendo sua expressão

aumentada por despolarização seguida de influxo de cálcio por CCDV em neurônios (SHENG; FIELDS; NELSON, 1993; ZHAO; LIU; RITTENHOUSE, 2007).

O aumento nos níveis de RNAm para *Cacna1b*, que codifica o Cav2.2 dos CCDV, causado pela cirurgia na medula espinhal está de acordo com a eficácia da administração intratecal do bloqueador seletivo do Cav2.2, ω -conotoxina-MVIIA, que não somente reduz a nocicepção induzida por incisão em roedores (DE SOUZA et al., 2011; WANG et al., 2000), mas também reduz a dor pós-operatória e o consumo de opioides em pacientes (ATANASSOFF et al., 2000). Em relação ao aumento do *Cacna1b* pela incisão ocorrer igualmente em machos e em fêmeas operados, este resultado está em consonância com nossos achados prévios, onde a ω -conotoxina-MVIIA intratecal reduziu a nocicepção no modelo de sensibilização central (uma característica presente na dor pós-operatória) em camundongos com efeito independente do sexo (FERREIRA et al., 2021).

Foi verificada uma diminuição dos níveis de RNAm para *Pdyn* somente nos machos operados. No entanto, o aumento nos níveis de RNAm para os genes *Cacna1e*, *Cacna1a*, *Oprk1* e *Gfap* e a diminuição nos níveis de RNAm para *Oprm1* foram detectados apenas nas fêmeas operadas. Dados na literatura indicam que a ativação de astrócitos e dos receptores opioides parecem estar envolvidos na analgesia e na dor pós-operatória de uma maneira sexualmente dimórfica. De fato, evidências demonstram que agonistas dos receptores kappa-opioides produzem analgesia pós-operatória somente em pacientes do sexo feminino (GEAR et al., 2008). Ainda, antagonistas dos receptores kappa-opioides geraram aumento nos níveis de GFAP e causaram um reestabelecimento da hiperalgesia em camundongos operados (BASU et al., 2021). Assim, nossos dados demonstram que a cirurgia intraplantar gerou o desenvolvimento de comportamentos nociceptivos pós-operatórios de uma maneira sexualmente semelhantes, mas a expressão dos genes relacionados ocorreu de uma maneira sexualmente dimórfica.

A nocicepção pós-operatória demonstrou estar associada com aumento da expressão do Cav2.3 na medula espinhal de fêmeas operadas nas fases iniciais da dor pós-operatória (3 horas pós incisão). No entanto, não houve alteração na expressão do Cav2.3 no GRD e nem na medula espinhal dos machos operados. Além do mais, a utilização do RNA de interferência para causar a diminuição da expressão do Cav2.3 seletivamente na medula espinhal preveniu o desenvolvimento da nocicepção pós-operatória, com um curto efeito antinociceptivo nos machos operados

(até 2 horas após a cirurgia). Essa discrepância no tempo de duração do efeito antinociceptivo visto em ambos os sexos pode ser explicada pela ausência da diminuição da expressão do Cav2.3 nos machos 3 horas após a cirurgia. Adicionalmente, o efeito antinociceptivo causado pela diminuição da expressão espinal do Cav2.3 nas fêmeas operadas está associado com redução da expressão do Cav2.3 e com a redução nos níveis de RNAm para Fos nas fêmeas, mas não nos machos operados. A expressão de Fos além de estar associada com atividade neuronal, também está relacionada com a cascata de transdução de sinal relacionada com o desenvolvimento da sensibilização central (CAMPILLO et al., 2010; GAO; JI, 2009). Deste modo, o efeito antinociceptivo prolongado gerado pela diminuição da expressão do Cav2.3 espinal visto nas fêmeas pode estar associado com a diminuição nos níveis de Fos. Dados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a diminuição do Cav2.3 espinal preveniu o desenvolvimento da sensibilização central em camundongos fêmeas, mas não em camundongos machos (FERREIRA et al., 2021). Assim, a expressão do Cav2.3 na medula espinal demonstra ter um papel pró-nociceptivo no desenvolvimento da nocicepção pós-operatória.

Nos últimos anos algumas estratégias diferentes para realizar alterações genéticas que nos permitam estudar determinados alvos e desenvolver possíveis terapias. Dentre elas temos técnicas que geram a diminuição da expressão de determinados genes por diferentes mecanismos, como a utilização de RNA de interferência e oligonucleotídeos antessentido (ROBERTS; LANGER; WOOD, 2020). No entanto, todas as essas técnicas possuem algumas limitações, incluindo 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 (BISHOP, 2017). Outro ponto são as vias de administração e tempo de meia vida, pois sua administração deve ser realizada direto no local, no caso do SNC deve ser realizada administração via intratecal, o que pensando a nível clínico torna-se um procedimento desagradável que leva uma baixa adesão ao tratamento (BISHOP, 2017). Um fator importante a ser considerado é a seletividade dessas estratégias pelos seus alvos. 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). No

caso do RNA de interferência usado no presente estudo, esse siRNA demonstrou ser seletivo para o Cav2.3 (*Cacna1e*), visto que os níveis de RNAm para os genes dos outros CCDV da família 2, Cav2.1 (*Cacna1a*) e Cav2.2 (*Cacna1b*), não tiveram alteração após o tratamento com o RNA de interferência contra o Cav2.3. Além disto, não detectamos efeitos adversos sensoriais e motores após a administração do siRNA usado, indicando sua segurança de uso, pelo menos após administração intratecal em camundongos. Assim, verificamos que a estratégia de siRNA para o Cav2.3 demonstrou ser uma ferramenta importante para confirmar que a expressão do Cav2.3 está relacionada com a indução da dor pós-operatória.

Os opioides são considerados a terapia padrão ouro para o tratamento de diversos tipos de dor, incluindo para dor relacionada a dor pós-operatória (ANGST; CLARK, 2006). De fato, o uso de opioides, incluindo por via intratecal, em pacientes demonstrou uma menor dor após procedimentos cirúrgicos (CHOU et al., 2016). Porém, o uso de opioides está associado ao desenvolvimento de tolerância e potenciais efeitos adversos dependentes da dose (LOW; CLARKE; HUH, 2012). Assim, inicialmente avaliamos o efeito analgésico da morfina no modelo de dor pós-operatória, bem como o desenvolvimento de efeitos adversos desencadeados pelo uso de morfina intratecal. Conseguimos identificar a dose efetiva de morfina que desencadeou efeitos antinociceptivos, sem causar efeitos adversos graves (dose intermediária de 3 nmol/sítio). Clinicamente os opioides proporcionam um alívio nos aspectos sensoriais e afetivos da dor (CORDER et al., 2017). Identificamos a dose tóxica de morfina (dose mais elevada de 10 nmol/sítio), que gerou efeito antinociceptivo, mas também gerou efeitos adversos graves como cauda de Straub, hiperlocomoção e disfunção motora. Efeitos adversos dependentes da dose são produzidos pelo uso de morfina por via intratecal em pacientes cirúrgicos, indicando que os prescritores devem pensar no custo benefício entre o efeito analgésico e os potenciais efeitos colaterais causados pelo uso de altas doses de morfina (SULTAN et al., 2016). Por fim, identificamos a dose de morfina sub-efetiva (menor dose de 1 nmol/sítio) que não desencadeou nem efeitos adversos e nem efeito antinociceptivo.

A dose efetiva de morfina (3 nmol/sítio) foi capaz de produzir reposta antinociceptiva similar entre os ambos os sexos. Este achado está de acordo com um estudo em ratos onde a eficácia do efeito analgésico induzido pela morfina intratecal não teve nenhuma diferença sexualmente dimórfica em um modelo de dor pós-

operatória (KROIN et al., 2003). A morfina causou o mesmo efeito analgésico independente do sexo em pacientes submetidos à cirurgia (SON-HING et al., 2011).

Nós confirmamos o papel pró-nociceptivo do Cav2.3 espinhal no modelo de dor pós-operatória através da utilização de um bloqueador seletivo do Cav2.3, o SNX-482. Similar com o que ocorre com o uso do RNA de interferência contra o Cav2.3, o tratamento intratecal com SNX-482 causou uma redução na nocicepção evocada ao toque. Apesar da diferença na expressão do Cav2.3 na medula espinhal de machos e fêmeas após a cirurgia, o tratamento com SNX-482 por via intratecal induziu um efeito antinociceptivo de maneira similar em machos e em fêmeas após a cirurgia, com mesma intensidade e duração. Esses achados são compatíveis com os dados de alta eficácia e afinidade encontrados para o bloqueador do Cav2.3 (NEWCOMB et al., 1998). O bloqueio de Cav2.3 produziu um efeito antinociceptivo de curta duração (até 2 horas) na hiperalgesia mecânica pós-operatória, mesmo em camundongos fêmeas. Esse efeito antinociceptivo de curta duração gerado pelo SNX-482 não foi inesperado, uma vez que dados prévios do nosso laboratório já encontraram um curto efeito antinociceptivo causado pelo tratamento intratecal com SNX-482 (FERREIRA et al., 2021). Além do mais, outros estudos destacam o curto efeito antinociceptivo exercido pelo bloqueio do CCDV tipo R (MATTHEWS et al., 2007; TERASHIMA et al., 2013). A eficácia antinociceptiva do SNX-482 na nocicepção pós-operatória foi menor do que o efeito antinociceptivo produzido pelo uso do RNA de interferência contra o Cav2.3. Esse fato pode ser explicado pela presença de corrente de cálcio mediada pelo Cav2.3 insensíveis ao SNX-482 (tipo R) em alguns neurônios (NEWCOMB et al., 1998; WILSON et al., 2000). Assim, nossas ferramentas genéticas e farmacológicas apontaram um papel pró-nociceptivo da expressão e da ativação do Cav2.3 a nível medular, especialmente no desenvolvimento da nocicepção pós-operatória.

Historicamente as toxinas bloqueadoras de CCDV são capazes de induzir efeitos adversos. Com isso, buscamos avaliar não só o efeito antinociceptivo, mas também a presença de efeitos sensoriais e motores indesejáveis desencadeados pelo bloqueio do Cav2.3 em diferentes doses do SNX-482. Conseguimos identificar a dose efetiva de SNX-482 que foi capaz de desencadear efeitos antinociceptivos sem causar efeitos adversos graves (dose intermediária de 0,3 nmol/sítio). Assim como identificamos a dose tóxica de SNX-482 (dose mais elevada de 0,6 nmol/sítio), que gerou efeito antinociceptivo, mas também gerou efeitos adversos graves. Por fim, identificamos a dose de SNX-482 sua efetiva (menor dose de 0,1 nmol/sítio) que não

desencadeou nem efeitos adversos e nem efeito antinociceptivo. Estes achados corroboram os dados da literatura que demonstram que a injeção intratecal de doses elevadas de SNX-482 causaram o surgimento de efeitos adversos (MALMBERG; YAKSH, 1994; TERASHIMA et al., 2013), estes poderiam ser explicados pela perda de seletividade de altas doses desta toxina (NEWCOMB et al., 1998). Vimos também que dose efetiva de SNX-482 foi capaz de produzir efeito antinociceptivo com padrão de resposta similar entre os sexos, apesar da falta de efeito estatisticamente significativo em alguns tempos nos machos tratados com SNX-482. A falta de efeito antinociceptivo em alguns tempos pode ser devido a variação comportamental vista entre os grupos, principalmente 30 minutos após o tratamento. Essa variação comportamental pode ter ocorrido devido a recente manipulação dos animais para o tratamento intratecal (LONG; SAEDLER, 2016).

Um outro ponto que devemos levar em consideração é que apesar das doses efetivas de morfina (3 nmol/sítio) e de SNX-482 (0,3 nmol/sítio) terem efeito antinociceptivo, as mesmas não foram capazes de reverter a nocicepção espontânea causada pela cirurgia na pata. O ambiente laboratorial pode ser considerado um ambiente estressante e que está associado a estímulos desagradáveis (como o próprio manuseio) para os animais em experimentação, sendo estes fatores que podem mascarar os resultados e gerar analgesia ou hiperalgesia induzidos por estresse (FERDOUSI; FINN, 2018; IMBE; IWAI-LIAO; SENBA, 2006). Além disso, a nocicepção espontânea é considerado um comportamento característico da dor pós-operatória, no entanto o nosso método de avaliação parece não ser sensível o suficiente para verificação do efeito tipo-analgésico na nocicepção espontânea. Um outro ponto a ser considerado é que, diferente do que consta na literatura que relacionam o Cav2.3 com dor, nosso estudo levou em conta os controles de vieses que são tidos como critério para o aumento da qualidade no estudo com animais. Fatores como cálculo prévio do n, cegamento e randomização foram incluídos nesse estudo, sendo que estes fatores normalmente contribuem para a redução do tamanho de efeito (ANDREWS et al., 2016; SENA et al., 2007). Ainda, a dor em repouso (dor espontânea) é uma dor considerada de difícil tratamento na clínica, por isso ainda é um desafio a ser considerado (WYLDE et al., 2011).

A terapia opioide está associada com o surgimento de efeitos adversos, por isso uma estratégia utilizada na clínica para aumentar a analgesia causada pelos opioides e diminuir os efeitos adversos causados pelos mesmos é a utilização de

associações entre fármacos opioides com adjuvantes terapêuticos (BUVANENDRAN; KROIN, 2007). Evidências demonstram que um polimorfismo no Cav2.3 relacionado com sua perda de função levou a um maior consumo de opioides no pós-operatório (primeiras 24 horas) e também no intraoperatório em pacientes submetidos a cirurgia estética (IDE et al., 2013). De fato, um estudo utilizou camundongos com deleção gênica e o bloqueio farmacológico para o Cav2.3 tiveram uma melhora na analgesia, bem como uma menor tolerância causada pela morfina frente a estímulos térmicos nocivos (YOKOYAMA et al., 2004). Assim, poderia ocorrer uma associação entre a analgesia causada por opioides e o papel pró-nociceptivo do Cav2.3.

Por isso, nós investigamos o potencial antinociceptivo do bloqueio do Cav2.3 como adjuvante a terapia opioide na dor pós-operatória. Nós observamos que a combinação intratecal com baixas doses de morfina e SNX-482 (doses que isoladamente não produziram nenhum efeito antinociceptivo) reduziu de forma eficaz e duradoura a nocicepção pós-operatória espontânea e evocada pelo toque. Este efeito antinociceptivo foi produzido quando a associação de subdoses foram injetadas imediatamente antes ou 1 hora após a cirurgia, mas não 24 horas após o procedimento cirúrgico. Nossos resultados indicam que o Cav2.3 espinhal não participa dos eventos tardios que mantêm a dor pós-operatória e que o efeito adjuvante produzido pelo bloqueio do Cav2.3 pode ser clinicamente relevante, uma vez que na rotina clínica, a morfina intratecal pode ser administrada imediatamente antes ou após a cirurgia para produzir analgesia duradoura em pacientes operados (SALAM OMARA; AMER, 2019). O mecanismo exato relacionado ao efeito antinociceptivo gerado pela associação do bloqueio de Cav2.3 aos opioides ainda é desconhecido, mas a analgesia mediada por opioides em grande parte está relacionada com a inibição de neurotransmissores, através da inibição dos CCDV (TRESOT et al., 2008). Um estudo demonstrou que agonistas dos receptores μ -, δ - e κ opioides inibiram as correntes mediadas pelo canal Cav2.3 *in vitro*. Inclusive, antagonistas dos receptores δ - e κ - opioides aumentaram as correntes mediadas pelo canal Cav2.3 *in vitro*, por um mecanismo dependente das subunidades $\beta\gamma$ da proteína G (BERECKI; MOTIN, 2016). Assim, os canais Cav2.3 da medula espinhal são alvos para analgésicos opioides e seu bloqueio pode exercer efeito adjuvante não apenas aumentando a potência e a duração do efeito antinociceptivo, mas também prevenindo seus efeitos adversos no pós-operatório.

Ademais, vimos que o tratamento intratecal com a associação de doses sub-efetiva de SNX-482 e morfina foi capaz de produzir efeito antinociceptivo com padrão de resposta similar entre os sexos. No entanto, o efeito antinociceptivo foi estatisticamente significativo em tempos mais prolongados (5 horas após cirurgia) somente nos machos tratados com a associação. 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). Nosso resultado mais prolongado nos machos parece ocorrer devido a variação comportamental vista entre os grupos veículos, onde as camundongas fêmeas, por serem mais agitadas, tiveram uma maior variação comportamental.

Além do efeito antinociceptivo, a associação de doses sub-efetivas de SNX-482 e morfina não desencadearam efeitos adversos em nenhum dos sexos. Como relatado anteriormente uma das preocupações do uso dos opioides é devido ao surgimento de efeitos adversos (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2017). Além disso, toxinas peptídicas que bloqueiam os CCDV são conhecidas por desenvolverem efeitos adversos graves, principalmente motores (MALMBERG; YAKSH, 1994). Nossos resultados demonstrando que apesar da potencialização do efeito antinociceptivo causado pela associação de doses sub-efetivas de SNX-482 e morfina, essa associação parece não potencializar o surgimento de efeitos adversos. Estudos prévios demonstraram que a associação de morfina com um bloqueador do CCDV Cav2.2 ($Ph\alpha 1\beta$) foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo e reverter alguns efeitos adversos causado pela morfina (TONELLO et al., 2020). Relatos demonstram que a ativação dos receptores μ -opioides causam a inibição dos canais Cav2.2 através da ligação direta das subunidades $\beta\gamma$ da proteína G inibitória que está acoplada aos receptores μ -opioide, desencadeando assim um efeito analgésico (WEISS; ZAMPONI, 2021).

Após evidenciar ao papel pró-nociceptivo do Cav2.3 a nível medular, fomos investigar o papel do Cav2.3 a nível local periférico. Para isso, realizamos uma administração plantar no local da incisão no momento trans-operatório com o bloqueador do Cav2.3, SNX-482. Como controle positivo, utilizamos o anestésico local bupivacaína, que já foi demonstrado que reduziu a atividade espontânea neuronal na medula espinhal de ratos submetidos a incisão (BANIK; BRENNAN,

2004; XU; BRENNAN, 2009). Em nossos resultados, a bupivacaína ocasionou um efeito antinociceptivo 15 minutos após tratamento, perdendo o efeito após esse tempo. A nocicepção espontânea não foi reduzida após o tratamento com a bupivacaína, entretanto, nossas avaliações foram após 2 horas onde talvez o efeito da bupivacaína já tenha sido perdido. O nosso tratamento no local da incisão com SNX-482 não alterou a nocicepção induzida pela incisão em nenhum tempo e em nenhum dos parâmetros avaliados. Em um estudo que utiliza animais com deleção gênica para o Cav2.3 há evidências de efeitos nociceptivos e antinociceptivos, demonstrando que o Cav2.3 pode agir de maneira distinta a nível espinal e nos outros tecidos envolvidos na transmissão nociceptiva (SAEGUSA et al., 2000). Assim, o Cav2.3 parece agir de diferentes maneiras em todo o sistema de transmissão da dor e seu efeito pró-nociceptivo na dor pós-operatória parece ocorrer a nível medular, mas não a nível periférico.

Além de um componente inflamatório inerente à lesão tissular durante a cirurgia, a dor pós-operatória pode ter um componente neuropático relevante (RICHEBÉ; CAPDEVILA; RIVAT, 2018). Para verificar o papel do Cav2.3 na dor neuropática, também investigamos durante a realização do doutorado um possível efeito antinociceptivo do SNX-482 em modelo de neuropatia relacionada ao HIV (NS-HIV, manuscrito submetido para publicação), já que evidências que relacionam a participação do Cav2.3 em modelos de dor neuropática ainda são muito escassas. Um estudo mostrou que o tratamento intratecal com SNX-482 reduziu as respostas nocivas neuronais no corno dorsal da medula de ratos após um modelo de dor neuropática por lesão nervosa (SNL) (MATTHEWS et al., 2007). Outro estudo usou um bloqueador dual do Cav2.1 e do Cav2.3, a Tx3-3, que reduziu a hiperalgesia e as respostas neuronais no corno dorsal da medula de roedores após modelo de dor neuropática (DALMOLIN et al., 2011; RIGO et al., 2013).

No presente estudo, a NS-HIV foi induzida pela injeção intratecal da glicoproteína do envelope viral (gp120) e pelo tratamento endovenoso com o antirretroviral estavudina (d4T) em camundongos (Figura suplementar 1, Apêndice II). Inicialmente, também verificamos um aumento do *Cacna1e* no DRG, mas não na medula espinal ou na pele da pata, 13 dias após a indução da neuropatia. O tratamento intratecal com SNX-482 induziu um efeito antinociceptivo (uma hora) após o tratamento, mas não foi capaz alterar os comportamentos afetivo motivacionais causadas pelo modelo de NS-HIV. Na verdade, evidências demonstram que os

componentes de dor sensorial e afetiva respondem de maneiras diferentes frente à intervenções farmacológicas em condições de dor neuropática (GILRON; TU; HOLDEN, 2013). Assim, parece que o Cav2.3 espinhal tem um pequeno papel na hiperalgesia induzida pelo NS-HIV, mas outros receptores e canais podem ser mais relevante nesse tipo de dor neuropática.

Após, fomos investigar o papel do Cav2.3 a nível local periférico. Para isso, realizamos uma administração intraplantar com o SNX-482. O nosso tratamento local com SNX-482 não alterou a hiperalgesia induzida pelo modelo de NS-HIV em nenhum tempo e em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura suplementar 2, Apêndice II). Assim, o Cav2.3 parece agir de diferentes maneiras em todo o sistema de transmissão da dor. Com esses dados concluímos que o Cav2.3 não possui um papel local periférico importante na nocicepção induzida pelo NS-HIV e que a sua participação a nível medular é limitada e precisa ser mais estudada.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o Cav2.3 tem um papel pró-nociceptivo na indução da dor pós-operatória. Assim, tanto a redução da expressão quanto o bloqueio farmacológico do CCDV Cav2.3 apresentaram efeito antinociceptivo no modelo de dor pós-operatória em camundongos. Além disso, a utilização do bloqueador do Cav2.3 como adjuvante a terapia opioide demonstrou ter efeitos antinociceptivos promissores no modelo de dor pós-operatória. Deste modo, o Cav2.3 é um alvo potencial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras para o tratamento da dor pós-operatória.

REFERÊNCIAS

AMANO, Kojiro et al. Opposite Associations Between the Rs3845446 Single-Nucleotide Polymorphism of the CACNA1E Gene and Postoperative Pain-Related Phenotypes in Gastrointestinal Surgery Versus Previously Reported Orthognathic Surgery. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 10, p. 1126–1134, out. 2016.

AMBROSINI, Anna et al. Possible Involvement of the CACNA1E Gene in Migraine: A Search for Single Nucleotide Polymorphism in Different Clinical Phenotypes. **Headache**, v. 57, n. 7, p. 1136–1144, 2017.

ANDREWS, Nick A et al. Ensuring Transparency and Minimization of Methodologic Bias in Preclinical Pain Research: PPRECISE Considerations. **Pain**, v. 157, n. 4, p. 901–909, abr. 2016.

ANGST, Martin S; CLARK, J David. Opioid-Induced Hyperalgesia: A Qualitative Systematic Review. **Anesthesiology**, v. 104, n. 3, p. 570–587, mar. 2006.

ARMITAGE, P; BERRY, G. The planning os statistical investigations. em: **Statistical methods in medical research**. 2.ed. Oxford, Blackwell, 1987.

ATANASSOFF, P G et al. Ziconotide, a New N-Type Calcium Channel Blocker, Administered Intrathecally for Acute Postoperative Pain. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 25, n. 3, p. 274–278, 2000.

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.

BANIK, Ratan K et al. Strain and Sex Influence on Pain Sensitivity after Plantar Incision in the Mouse. **Anesthesiology**, v. 105, n. 6, p. 1246–1253, dez. 2006.

BANIK, Ratan K; BRENNAN, Timothy J. Spontaneous Discharge and Increased Heat Sensitivity of Rat C-Fiber Nociceptors Are Present in Vitro after Plantar Incision. **Pain**, v. 112, n. 1–2, p. 204–213, nov. 2004.

BASBAUM, Allan I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.

BASU, Paramita et al. Sex Differences in Protein Kinase A Signaling of the Latent Postoperative Pain Sensitization That Is Masked by Kappa Opioid Receptors in the Spinal Cord. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 41, n. 47, p. 9827–9843, nov. 2021.

BERECKI, Geza et al. Differential Cav2.1 and Cav2.3 Channel Inhibition by Baclofen and Alpha-Conotoxin Vc1.1 via GABAB Receptor Activation. **The Journal of General Physiology**, v. 143, n. 4, p. 465–479, abr. 2014.

BERECKI, Géza; MOTIN, Leonid; ADAMS, David J. Voltage-Gated R-Type Calcium Channel Inhibition via Human μ -, δ -, and κ -Opioid Receptors Is Voltage-Independently Mediated by G $\beta\gamma$ Protein Subunits. **Molecular Pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 187–196, jan. 2016.

BIJUR, Polly E. et al. 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.

BOEZAART, Andre P et al. Visceral versus Somatic Pain: An Educational Review of Anatomy and Clinical Implications. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 46, n. 7, p. 629–636, jul. 2021.

BOURINET, E et al. Determinants of the G Protein-Dependent Opioid Modulation of Neuronal Calcium Channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 4, p. 1486–1491, fev. 1996.

BRENNAN, Timothy J; VANDERMEULEN, Erik P; GEBHART, G F. Characterization of a Rat Model of Incisional Pain. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 493–502, mar. 1996.

BUVANENDRAN, Asokumar; KROIN, Jeffrey S. Useful Adjuvants for Postoperative Pain Management. **Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology**, v. 21, n. 1, p. 31–49, mar. 2007.

CAMPILLO, Ana et al. Increased Spinal Dynorphin Levels and Phospho-Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 and c-Fos Immunoreactivity after Surgery under Remifentanyl Anesthesia in Mice. **Molecular Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 185–194, fev. 2010.

CASTRO, Joel et al. Alpha-Conotoxin Vc1.1 Inhibits Human Dorsal Root Ganglion Neuroexcitability and Mouse Colonic Nociception via GABAB Receptors. **Gut**, v. 66, n. 6, p. 1083–1094, jun. 2017.

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

CHOU, Roger et al. Management of postoperative pain: A clinical practice guideline from the American pain society, the American society of regional anesthesia and pain medicine, and the American society of anesthesiologists' committee on regional anesthesia, executive commi. **Journal of Pain**, v. 17, n. 2, p. 131–157, 2016.

CHUNG, G et al. Modulation of CaV2.3 Calcium Channel Currents by Eugenol. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 2, p. 137–141, fev. 2008.

COLVIN, Lesley A.; BULL, Fiona; HALES, Tim G. Perioperative opioid analgesia—when is enough too much? A review of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1558–1568, 2019.

CORDER, Gregory et al. Loss of μ Opioid Receptor Signaling in Nociceptors, but Not Microglia, Abrogates Morphine Tolerance without Disrupting Analgesia.

Nature Medicine, v. 23, n. 2, p. 164–173, fev. 2017.

CRUCCU, G. et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: Revised 2009. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 8, p. 1010–1018, 2010.

DALMOLIN, Gerusa D. et al. Effect of the spider toxin Tx3-3 on spinal processing of sensory information in naive and neuropathic rats. **PAIN Reports**, v. 2, n. 4, p. e610, 2017.

DALMOLIN, Gerusa Duarte; SILVA, Cássia Regina; RIGO, Flávia Karine; GOMES, Guilherme Monteiro; DO NASCIMENTO CORDEIRO, Marta; et al. Antinociceptive Effect of Brazilian Armed Spider Venom Toxin Tx3-3 in Animal Models of Neuropathic Pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2224–2232, out. 2011.

DE SOUZA, A. H. et al. Antiallodynic effect and side effects of Ph α 1 β , a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with ω -conotoxin MVIIA and morphine. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 626–633, 2011.

DEUIS, Jennifer R; DVORAKOVA, Lucie S; VETTER, Irina. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 284, 2017.

DIELEMAN, Joseph L. et al. US spending on personal health care and public health, 1996-2013. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 316, n. 24, p. 2627–2646, 2016.

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.

E. BROOKES, Morag; ELDABE, Sam; BATTERHAM, Alan. Ziconotide Monotherapy: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 2, p. 217–231, 2016.

FANG, Zhi et al. Molecular Basis of Ca(v)2.3 Calcium Channels in Rat Nociceptive Neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 7, p. 4757–4764, fev. 2007.

FANG, Zhi et al. R-Type Calcium Channel Isoform in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 14, n. 1, p. 45–49, fev. 2010.

FERDOUSI, Mehnaz; FINN, David P. Stress-Induced Modulation of Pain: Role of the Endogenous Opioid System. **Progress in Brain Research**, v. 239, p. 121–177, 2018.

FERRARI, M D et al. Triptans (Serotonin, 5-HT_{1B/1D} Agonists) in Migraine: Detailed Results and Methods of a Meta-Analysis of 53 Trials. **Cephalalgia : An International Journal of Headache**, v. 22, n. 8, p. 633–658, out. 2002.

FERREIRA, Marcella Amorim et al. Sex-Dependent Cav2.3 Channel Contribution to the Secondary Hyperalgesia in a Mice Model of Central Sensitization. **Brain Research**, v. 1764, p. 147438, ago. 2021.

FITZCHARLES, Mary-Ann et al. Nociceptive Pain: Towards an Understanding of Prevalent Pain Conditions. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10289, p. 2098–2110, maio 2021.

FUCHS, Andreas et al. Contribution of Calcium Channel Subtypes to the Intracellular Calcium Signal in Sensory Neurons: The Effect of Injury. **Anesthesiology**, v. 107, n. 1, p. 117–127, jul. 2007.

GANDLA, Jagadeesh et al. **MiR-34c-5p functions as pronociceptive microRNA in cancer pain by targeting Cav2.3 containing calcium channels.** [S.l.: s.n.], 2017. v. 158.

GAO, Yong-Jing; JI, Ru-Rong. C-Fos and PERK, Which Is a Better Marker for Neuronal Activation and Central Sensitization after Noxious Stimulation and Tissue Injury? **The Open Pain Journal**, v. 2, p. 11–17, jan. 2009.

GASKELL, Helen; DERRY, Sheena; MOORE, R Andrew. Treating Chronic Non-Cancer Pain in Older People--More Questions than Answers? **Maturitas**, v. 79, n. 1, p. 34–40, set. 2014.

GEAR, Robert W et al. A Subanalgesic Dose of Morphine Eliminates Nalbuphine Anti-Analgesia in Postoperative Pain. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 4, p. 337–341, abr. 2008.

GILRON, Ian; TU, Dongsheng; HOLDEN, Ronald R. Sensory and Affective Pain Descriptors Respond Differentially to Pharmacological Interventions in Neuropathic Conditions. **The Clinical Journal of Pain**, v. 29, n. 2, p. 124–131, fev. 2013.

GLARE, Paul; AUBREY, Karin R.; MYLES, Paul S. Transition from acute to chronic pain after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1537–1546, 2019.

HUNT, S P; PINI, A; EVAN, G. Induction of C-Fos-like Protein in Spinal Cord Neurons Following Sensory Stimulation. **Nature**, v. 328, n. 6131, p. 632–634, ago. 1987.

HYLANDS-WHITE, Nicholas; DUARTE, Rui V; RAPHAEL, Jon H. An Overview of Treatment Approaches for Chronic Pain Management. **Rheumatology International**, v. 37, n. 1, p. 29–42, jan. 2017.

HYLDEN, Janice L.K.; WILCOX, George L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **European Journal of Pharmacology**, v. 67, n. 2–3, p. 313–316, 1980.

IDE, Soichiro et al. Association between Genetic Polymorphisms in Ca(v)2.3 (R-Type) Ca²⁺ Channels and Fentanyl Sensitivity in Patients Undergoing Painful

Cosmetic Surgery. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e70694, 2013a.

IMBE, Hiroki; IWAI-LIAO, Yasutomo; SENBA, Emiko. Stress-Induced Hyperalgesia: Animal Models and Putative Mechanisms. **Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library**, v. 11, p. 2179–2192, set. 2006.

KAKUTA, Nami et al. Neurokinin-1 Receptor Antagonism, Aprepitant, Effectively Diminishes Post-Operative Nausea and Vomiting While Increasing Analgesic Tolerance in Laparoscopic Gynecological Procedures. **The Journal of Medical Investigation : JMI**, v. 58, n. 3–4, p. 246–251, ago. 2011.

KIM, Donghoon et al. A Critical Role of Toll-like Receptor 2 in Nerve Injury-Induced Spinal Cord Glial Cell Activation and Pain Hypersensitivity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 14975–14983, maio 2007.

KISSIN, Igor. Tolerance to opioid analgesia: Why do we differ from rats? **Anesthesia and Analgesia**, v. 101, n. 6, p. 1727–1729, 2005.

KROIN, Jeffrey S et al. Postoperative Pain and Analgesic Responses Are Similar in Male and Female Sprague-Dawley Rats. **Canadian Journal of Anaesthesia = Journal Canadien d'anesthésie**, v. 50, n. 9, p. 904–908, nov. 2003.

KUMAR, Rahul et al. Diverse Characters of Brennan's Paw Incision Model Regarding Certain Parameters in the Rat. **The Korean Journal of Pain**, v. 32, n. 3, p. 168–177, jul. 2019.

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

LEÃO, Ricardo M. et al. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the ω -Phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 10, p. 1756–1767, 2000.

LEE, Marion et al. A Comprehensive Review of Opioid-Induced Hyperalgesia. **Pain Physician**, v. 14, p. 145–161, 2011.

LIRK, Philipp. Modulators of Calcium Influx Regulate Membrane Excitability in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. v. 107, n. 2, p. 673–685, 2008.

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

LONG C., SAEDLER K., Kolber B. Hormonal and molecular effects of restraint stress on formalin- induced pain-like behavior in male and female mice. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.

LOW, Y; CLARKE, C F; HUH, B K. Opioid-induced hyperalgesia: a review of epidemiology, mechanisms and management. **Singapore Med J**, v. 53, n. 5, p. 357–360, 2012.

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 : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 8, p. 4882–90, 1994.

MARATHE, Anuj et al. Intrathecal Baclofen Monotherapy and Polyanalgesia for Treating Chronic Pain in Patients with Severe Spasticity. **Current Pain and Headache Reports**, v. 25, n. 12, p. 79, dez. 2021.

MARTIN, Laurent et al. Conotoxin Contulakin-G Engages a Neurotensin Receptor 2 /R-Type Calcium Channel (Cav2.3) Pathway to Mediate Spinal Antinociception. **Pain**, dez. 2021.

MATTHEWS, Elizabeth A. et al. 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.

MCCALLUM, J. Bruce. Subtype-specific reduction of Voltage-gated Calcium Current in Medium-Sized Dorsal Root Ganglion Neurons after Painful Peripheral Nerve Injury. p. 244–255, 2011.

MEHRKE, G et al. Receptor-Mediated Modulation of Recombinant Neuronal Class E Calcium Channels. **FEBS Letters**, v. 408, n. 3, p. 261–270, maio 1997.

MEZA, Ulises et al. Neurokinin 1 Receptors Trigger Overlapping Stimulation and Inhibition of Ca V 2 . 3 (R-Type) Calcium Channels. **Molecular Pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 284–293, 2007.

MEZIANE, H. et al. 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.

MICHELI, Laura et al. VEGF-A/VEGFR-1 signalling and chemotherapy-induced neuropathic pain: therapeutic potential of a novel anti-VEGFR-1 monoclonal antibody. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 40, n. 1, p. 1–19, 2021.

MOGIL, Jeffrey S et al. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. July, p. 353–365, 2020.

MOGIL, Jeffrey S. The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans. v. 100, n. 8, p. 4867–4872, 2003.

MOGIL, Jeffrey S; DAVIS, Karen D; DERBYSHIRE, Stuart W. The Necessity of Animal Models in Pain Research. **Pain**, v. 151, n. 1, p. 12–17, out. 2010.

MOHAMMADREZA, Seyed et al. L - cysteine modulates visceral nociception mediated by the - Ca V 2 . 3 R - type calcium channels. **Pflügers Archiv - European**

Journal of Physiology, p. 435–445, 2022. D

MOLLENHOLT, P et al. Intrathecal and Epidural Somatostatin for Patients with Cancer. Analgesic Effects and Postmortem Neuropathologic Investigations of Spinal Cord and Nerve Roots. **Anesthesiology**, v. 81, n. 3, p. 534–542, set. 1994.

MORIKAWA, Tomoko et al. calcium currents in a population of acutely dissociated rat trigeminal sensory neurons. v. 9, p. 1–9, 2006.

MUELLER, Alexander et al. Antiallodynic effects of the selective NaV1.7 inhibitor Pn3a in a mouse model of acute postsurgical pain: evidence for analgesic synergy with opioids and baclofen. **Pain**, v. 160, n. 8, p. 1766–1780, 2019.

MURAKAMI, M et al. Distribution of Various Calcium Channel Alpha(1) Subunits in Murine DRG Neurons and Antinociceptive Effect of Omega-Conotoxin SVIB in Mice. **Brain Research**, v. 903, n. 1–2, p. 231–236, jun. 2001.

MURAKAMI, Manabu et al. 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, out. 2004.

NAVARRO-ARTIEDA, R. et al. 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. **Neurología**, v. 33, n. 3, p. 141–153, 2018.

NEEDHAM, K et al. Identification of Subunits of Voltage-Gated Calcium Channels and Actions of Pregabalin on Intrinsic Primary Afferent Neurons in the Guinea-Pig Ileum. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 22, n. 10, p. e301-8, out. 2010.

NEWCOMB, Robert et al. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. **Biochemistry**, v. 37, n. 44, p. 15353–15362, 1998.

NEWCOMB, Robert et al. SNX-482: A Novel Class E Calcium Channel Antagonist from Tarantula Venom. v. 6, n. 2, p. 153–173, 2000.

NJOO, Christian; HEINL, Celine; KUNER, Rohini. In Vivo siRNA Transfection and Gene Knockdown in Spinal Cord via Rapid Noninvasive Lumbar Intrathecal Injections in Mice. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 85, mar. 2014.

OLIVEIRA, Sara Marchesan et al. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 672, n. 1–3, p. 88–95, 2011.

OTTOLIA, M et al. Functional Coupling between Human E-Type Ca²⁺ Channels and Mu Opioid Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes. **FEBS Letters**, v. 427, n. 1, p. 96–102, maio 1998.

PERCIE DU SERT, Nathalie; RICE, A. S.C. Improving the translation of analgesic drugs to the clinic: Animal models of neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 12, p. 2951–2963, 2014.

PHAM, Mai T et al. A Scoping Review of Scoping Reviews: Advancing the Approach and Enhancing the Consistency. **Research Synthesis Methods**, v. 5, n. 4, p. 371–385, dez. 2014.

PIEKARZ, Andrew D et al. CRMP-2 Peptide Mediated Decrease of High and Low Voltage-Activated Calcium Channels, Attenuation of Nociceptor Excitability, and Anti-Nociception in a Model of AIDS Therapy-Induced Painful Peripheral Neuropathy. **Molecular Pain**, v. 8, p. 54, jul. 2012.

POGATZKI-ZAHN, Esther M.; SEGELCKE, Daniel; SCHUG, Stephan A. Postoperative pain—from mechanisms to treatment. **PAIN Reports**, v. 2, n. 2, p. e588, 2017.

POGATZKI-ZAHN, Esther M.; ZAHN, Peter K.; BRENNAN, Timothy J. Postoperative pain-clinical implications of basic research. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 21, n. 1, p. 3–13, 2007.

POGATZKI, Esther M.; RAJA, Srinivasa N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 1023–1027, 2003.

PRICE, Theodore J. et al. Transition to chronic pain: Opportunities for novel therapeutics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 383–384, 2018.

QIAN, Aihua et al. Role of Voltage Gated Ca²⁺ Channels in Rat Visceral Hypersensitivity Change Induced by 2, 4, 6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid. **Molecular Pain**, v. 9, n. 1, p. 15, mar. 2013.

RAJA, Srinivasa N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

RICHEBÉ, Philippe; CAPDEVILA, Xavier; RIVAT, Cyril. Persistent Postsurgical Pain: Pathophysiology and Preventative Pharmacologic Considerations. **Anesthesiology**, v. 129, n. 3, p. 590–607, set. 2018.

RIGO, Flávia K. et al. 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.

ROBERTS, Thomas C.; LANGER, Robert; WOOD, Matthew J.A. Advances in oligonucleotide drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 10, p. 673–694, 2020.

ROZANSKI, Gabriela M et al. Low Voltage-Activated Calcium Channels Gate Transmitter Release at the Dorsal Root Ganglion Sandwich Synapse. **The Journal**

of Physiology, v. 591, n. 22, p. 5575–5583, nov. 2013.

SAEGUSA, H. et al. 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.

SALAM OMARA, Amany Faheem Abd El; AMER, Asmaa Fawzy. Effect of Intrathecal Morphine before and after Laminectomy on Intra-Operative Surgical Stress Response and Post-Operative Pain: A Prospective Randomized Study. **Journal of Opioid Management**, v. 16, n. 1, p. 15–22, 2019.

SANG, Christine N; BARNABE, Kate J; KERN, Steven E. Phase IA Clinical Trial Evaluating the Tolerability, Pharmacokinetics, and Analgesic Efficacy of an Intrathecally Administered Neurotensin A Analogue in Central Neuropathic Pain Following Spinal Cord Injury. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 5, n. 4, p. 250–258, jul. 2016.

SENA, Emily et al. How Can We Improve the Pre-Clinical Development of Drugs for Stroke? **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 9, p. 433–439, set. 2007.

SHAN, Zhiming et al. Reversal of Peripheral Neuropathic Pain by the Small-Molecule Natural Product Physalin F via Block of CaV2.3 (R-Type) and CaV2.2 (N-Type) Voltage-Gated Calcium Channels. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 2939–2955, jun. 2019.

SHENG, H Z; FIELDS, R D; NELSON, P G. Specific Regulation of Immediate Early Genes by Patterned Neuronal Activity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 35, n. 5, p. 459–467, ago. 1993.

SIMMS, B A; ZAMPONI, G W. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. **Neuron**, cited By 353, v. 82, n. 1, p. 24–45, 2014.

SNG, B. L. et al. Incidence and risk factors for chronic pain after caesarean section under spinal anaesthesia. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 37, n. 5, p. 748–752, 2009.

SON-HING, Jochen P et al. Intrathecal Morphine Analgesia in Idiopathic Scoliosis Surgery: Does Sex or Racial Group Affect Optimal Dosing? **Journal of Pediatric Orthopedics**, v. 31, n. 5, p. 489–495, 2011.

SORGE, Robert E et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081–1083, 2015.

STAATS, Peter S et al. Intrathecal Ziconotide in the Treatment of Refractory Pain in Patients with Cancer or AIDS: A Randomized Controlled Trial. **JAMA**, v. 291, n. 1, p. 63–70, jan. 2004.

STAFF, Nathan P. et al. Post-surgical inflammatory neuropathy. **Brain**, v. 133, n. 10, p. 2866–2880, 2010.

SULTAN, Pervez et al. The Effect of Intrathecal Morphine Dose on Outcomes After Elective Cesarean Delivery: A Meta-Analysis. **Anesthesia and Analgesia**, v. 123, n. 1, p. 154–164, jul. 2016.

TERASHIMA, Tetsuji et al. Intrathecal P/Q- and R-Type Calcium Channel Blockade of Spinal Substance P Release and c-Fos Expression. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 1–8, dez. 2013.

TIGHE, Patrick J et al. Clinically Derived Early Postoperative Pain Trajectories Differ by Age, Sex, and Type of Surgery. **Pain**, v. 156, n. 4, p. 609–617, abr. 2015.

TONELLO, Raquel et al. Local Sympathectomy Promotes Anti-inflammatory Responses and Relief of Paclitaxel-induced Mechanical and Cold Allodynia in Mice. **Anesthesiology**, n. Xxx, p. 1540–1553, 2020.

TONELLO, Raquel; TREVISAN, Gabriela; CASTRO-JUNIOR, Celio J. Toxicon Ph α 1 β , a dual blocker of TRPA1 and Cav2 . 2, as an adjuvant drug in opioid therapy for postoperative pain. v. 188, n. July, p. 80–88, 2020.

TRESCOT, Andrea M et al. Opioid Pharmacology. **Pain Physician**, v. 11, n. 2 Suppl, p. S133-53, mar. 2008.

WALLACE, Mark S. et al. 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.

WALLACE, Victoria C J et al. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral- associated neuropathic pain. **Brain**, v. 130, n. 10, p. 2688–2702, 2007.

WANG, Y X et al. Effects of Intrathecal Administration of Ziconotide, a Selective Neuronal N-Type Calcium Channel Blocker, on Mechanical Allodynia and Heat Hyperalgesia in a Rat Model of Postoperative Pain. **Pain**, v. 84, n. 2–3, p. 151–158, fev. 2000.

WEIERGRÄBER, Marco et al. 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.

WEISER, Thomas G et al. Estimate of the global volume of surgery in 2012: an assessment supporting improved health outcomes. **The Lancet**, v. 385, p. S11, 2015.

WEISS, Norbert; ZAMPONI, Gerald W. Opioid Receptor Regulation of Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 5, p. 839–847, 2021.

WESTENBROEK, R E; HOSKINS, L; CATTERALL, W A. Localization of Ca²⁺

Channel Subtypes on Rat Spinal Motor Neurons, Interneurons, and Nerve Terminals. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 16, p. 6319–6330, ago. 1998.

WILSON, S. M. et al. The status of voltage-dependent calcium channels in $\alpha(1E)$ knock-out mice. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8566–8571, 2000.

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

WOOLF, Clifford J. What Is This Thing Called Pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742–3744, nov. 2010.

WORMUTH, C. et al. Review: Ca^{2+} R-type voltage-gated Ca^{2+} channels - Functional implications in convulsive and non-convulsive seizure activity. **Open Neurology Journal**, v. 10, p. 99–126, 2016.

WYLDE, V et al. Acute Postoperative Pain at Rest after Hip and Knee Arthroplasty: Severity, Sensory Qualities and Impact on Sleep. **Orthopaedics & Traumatology, Surgery & Research : OTSR**, v. 97, n. 2, p. 139–144, abr. 2011.

XU, Jun; BRENNAN, Timothy J. Comparison of Skin Incision vs. Skin plus Deep Tissue Incision on Ongoing Pain and Spontaneous Activity in Dorsal Horn Neurons. **Pain**, v. 144, n. 3, p. 329–339, ago. 2009.

YANG, Li et al. Phorbol Ester Modulation of Ca^{2+} Channels Mediates Nociceptive Transmission in Dorsal Horn Neurones. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 6, p. 777–787, maio 2013.

YANG, Li; STEPHENS, Gary J. Effects of neuropathy on high-voltage-activated Ca^{2+} current in sensory neurones. **Cell Calcium**, v. 46, n. 4, p. 248–256, 2009.

YANG, Liang et al. Peripheral Nerve Injury Induces Trans-Synaptic Modification of Channels, Receptors and Signal Pathways in Rat Dorsal Spinal Cord. **The European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 871–883, fev. 2004.

YOKOYAMA, Kazuaki et al. Blocking the R-Type ($Cav2.3$) Ca^{2+} Channel Enhanced Morphine Analgesia and Reduced Morphine Tolerance. **The European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 3516–3519, dez. 2004.

YOKOYAMA, T et al. Biochemical Properties and Subcellular Distribution Neuronal Class E Calcium Channel (α_1 , Subunit of the α_1). v. 75, n. October, p. 6419–6432, 1995.

ZAMPONI, G W et al. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacological Reviews**, Cited By :462Export Date: 28 July 2021.

ZHAO, Rubing; LIU, Liwang; RITTENHOUSE, Ann R. Ca^{2+} Influx through

Both L- and N-Type Ca²⁺ Channels Increases c-Fos Expression by Electrical Stimulation of Sympathetic Neurons. **The European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 1127–1135, fev. 2007.

APÊNDICE I

ESTRATÉGIA DE BUSCA USADA NA REVISÃO

Construímos nossa estratégia de busca usando o PRISMA para revisão de escopo (PRISMA-ScR). Alguns critérios de inclusão foram utilizados em nossa busca como: todos os anos de publicação e artigos escritos em inglês foram incluídos, em relação a população foram incluídos artigos que utilizaram humanos, animais de laboratório e que utilizaram cultura de células. Estudos que tiveram qualquer desfecho relacionado a dor ou usaram qualquer composto com efeito analgésico/antinociceptivo foram excluídos, artigos com qualquer outro desfecho que não está relacionado a dor foram excluídos (PHAM et al., 2014).

Para identificar os estudos utilizamos as bases de dados Medline (PubMed) e SCOPUS. A estratégia de busca foi desenhada utilizando os descritores bibliográficos. A busca foi realizada até maio de 2022. Os resultados finais da busca foram exportados para o Mendeley e a estratégia de busca pode ser encontrada abaixo:

Tabela suplementar 1 – Estratégia de busca final utilizada.

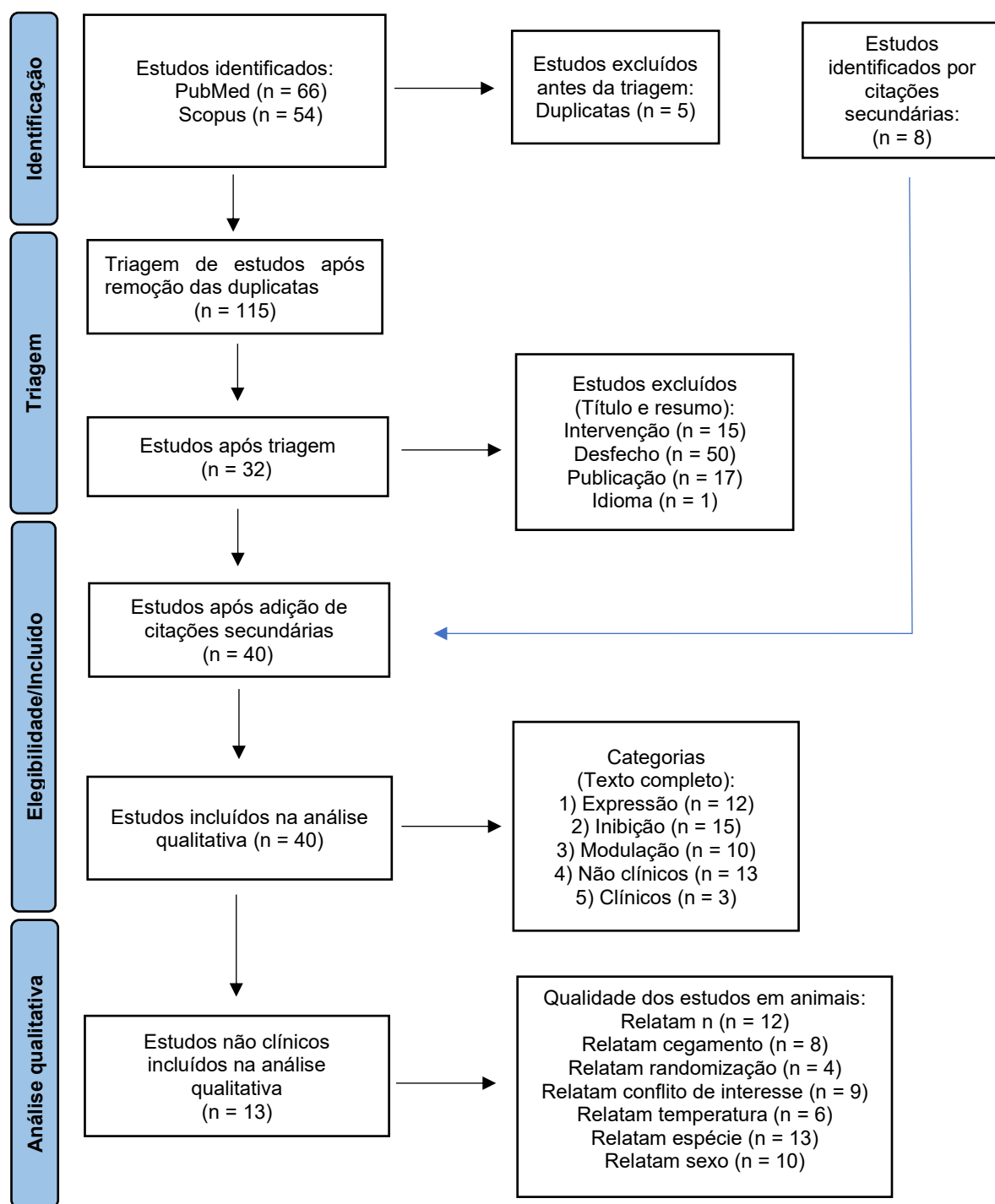
Estratégia de busca usada no PubMed	Descritores utilizados
Intervenção Cav2.3:	("Calcium Channels, R-Type"[Mesh] OR "cav2.3" OR "CACNA1E" OR "α1e" OR "r-type channels" OR "R-type calcium channel" OR "class E calcium channel" OR "α1e" OR "alpha1e" OR "R-type Ca2+ channels" OR "R-type channel" OR "R-channel" OR "R-type calcium channels" OR "CaV2.3" OR "CaV2.3 calcium channels" OR "Cav2.3 calcium channels" OR "Cav2.3" OR "calcium channel alpha 1e" OR "R-type calcium channel"))
Desfecho dor:	("pain" [MeSH Terms] OR analgesic OR analgesia OR nociception OR nociceptive OR antinociceptive OR antinociception OR antihyperalgesic OR hyperalgesia OR hypersensitivity OR hyposensitivity OR allodynia OR "neuropathic pain" OR "neuropathic" OR "Von-Frey filament" OR "vonFrey" OR "von frey")
Estratégia de busca usada no SCOPUS	Descritores utilizados
Intervenção Cav2.3:	cav2.3 OR voltage gated calcium channel r-type OR voltage dependent calcium channel r-type OR voltage gated calcium channel Cav2.3 OR voltage dependent calcium channel Cav2.3 OR VGCC r-type OR calcium channel r-type OR VGCC Cav2.3 OR voltage sensitive calcium channel r-type OR VSCC r-type OR CACNA1E OR α1e OR r-type channels OR R-type calcium channel OR class E calcium channel OR R-type channel OR R-type calcium channels OR CaV2.3 calcium channels OR Cav2.3 calcium channels OR Cav2.3 R-type Ca2+ channel OR calcium channel alpha 1e OR R-type calcium channel
Desfecho dor:	pain OR analgesic OR analgesia OR nociception OR nociceptive OR antinociceptive OR antinociception OR antihyperalgesic OR hyperalgesia OR hypersensitivity OR hyposensitivity OR allodynia

Critérios de inclusão e exclusão:

- 1- Artigos clínicos e não clínicos originais foram incluídos;
- 2- Todas as populações foram incluídas;
- 3- Estudos utilizando qualquer intervenção no Cav2.3 com desfechos relacionados a dor foram incluídos;
- 4- Artigos de revisão foram excluídos;
- 5- Artigos que não estavam em inglês foram excluídos;
- 6- Estudos que não avaliaram o Cav2.3, mas outros canais foram excluídos;
- 7- Estudos que não avaliam nenhum desfecho relacionado a dor foram excluídos, como artigos que avaliaram epilepsia, secreção de insulina, problemas cardíacos etc.

Para organizar melhor os estudos nós os agrupamos em cinco categorias: 1) estudos que verificaram a expressão do Cav2.3 em vias relacionadas a transmissão da dor; 2) estudos que utilizaram cultura de células de neurônios que expressam o Cav2.3 que verificaram a inibição das correntes tipo R por moléculas que possuem algum efeito tipo-analgésico; 3) estudos que utilizaram bloqueadores do canal Cav2.3 e verificaram sua modulação na transmissão nociceptiva; 4) estudos que utilizaram ferramentas que modulam o Cav2.3 e verificaram o surgimento de efeito tipo analgésico em modelos animais de dor e 5) estudos que verificaram a participação do Cav2.3 em condições dolorosas na clínica (SENA et al., 2007). O fluxograma com os estudos encontrados na revisão pode ser encontrado abaixo:

Figura Suplementar 1 – Fluxograma da revisão.



Fonte: Autora 2022.

APÊNDICE II

Neuropatia sensorial relacionada ao HIV (NS-HIV)

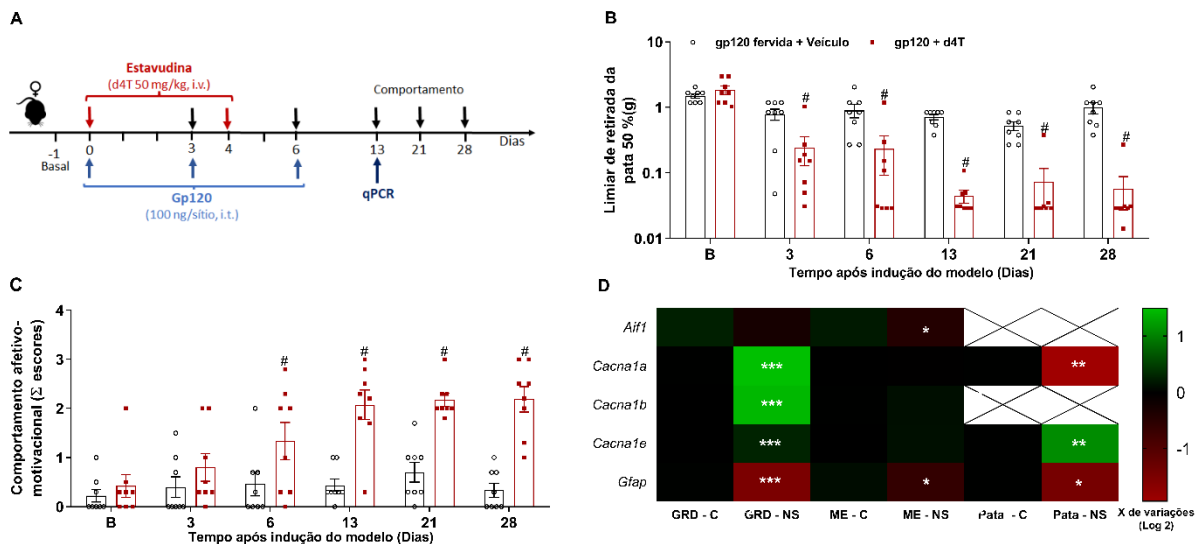
O modelo experimental de NS-HIV foi induzido pela administração sistêmica do agente inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa estavudina (d4T) (WALLACE *et al.*, 2007) (dia 0 e 4), de forma concomitante ou não com a administração intratecal da proteína HIV-gp120 (MILLIGAN, *et al.* 2000) (dia 0, 3 e 6). Foram realizados os tratamentos para bloqueio e inibição do Cav2.3 por volta do 13º dia, com posteriores avaliações dos comportamentos nociceptivos.

Caracterização do modelo NS-HIV em camundongos

A indução do modelo de NS-HIV foi induzida com injeções endovenosas com o antiretroviral estavudina (d4T) e com injeções intratecais com a proteína do envelope viral gp120 em camundongos fêmeas de acordo com o protocolo experimental (Figura suplementar 1A). O modelo foi capaz de diminuir os limiares de retirada da pata dos animais a partir do terceiro dia após o início da indução do modelo e o pico de hiperalgesia mecânica foi visto no 13º dia. Essa queda do limiar foi vista até o 28º dia após o início da indução do modelo (Figura suplementar 1B). A modelo de NS-HIV foi capaz de induzir o aumento do comportamento afetivo motivacional a partir do 6º dia após o início da indução do modelo e esse aumento nos escores nociceptivos perdurou por 28 dias após o início da indução do modelo (Figura suplementar 1C).

Foi verificado que há um aumento significativo nos níveis de mRNA para os genes que codificam o Cav2.1 (*Cacna1a*), Cav2.2 (*Cacna1b*) e Cav2.3 (*Cacna1e*) no GRD de camundongos fêmeas neuropáticas. Verificamos também um aumento significativo nos níveis de mRNA para o Cav2.3 (*Cacna1e*) na pele da pata de fêmeas neuropáticas. Além disso, foi observada uma diminuição nos níveis mRNA para o marcador de astrócitos (*Gfap*) no GRD, medula espinhal e pele da pata de camundongos fêmeas neuropáticas. Além do mais, foi visto uma diminuição nos níveis mRNA para o marcador de micróglia (*Aif1*) na medula espinhal e uma diminuição para o Cav2.1 (*Cacna1a*) na pele da pata de camundongas fêmeas neuropáticas (Figura suplementar 1D).

Figura suplementar 2 – Decurso temporal da nocicepção induzida pelo modelo NS-HIV em fêmeas C57BL/6. Caracterização do modelo de NS-HIV em camundongos fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de indução de NS-HIV em camundongos fêmeas. B - Decurso temporal do efeito do NS-HIV na hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de vonFrey). D – Níveis de expressão transcricional avaliados por qPCR para IBA-1 (*Aif1*), canais de cálcio do tipo-P/Q (*Cacna1a*), e tipo-N (*Cacna1b*), GFAP (*Gfap*), no GRD, na medula espinhal e na pele da pata, no 13º dia após indução do modelo de NS-HIV ou em animais que receberam veículo (fold-change log 2). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo e D n = 4-5 por grupo) foram realizados de 2-3 grupos experimentais independentes, B-C foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguidos pelo pós teste de Sidak. (D) Dados expressos como média normalizados por log de 2, analisados por teste-t de Student não pareado (n = 3-4 por grupo), *p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001 comparados com grupo veículo. (B) = basal. O teste de Grubb foi usado para detecção de possíveis outliers e nenhum outlier foi encontrado.



O modelo de NS-HIV foi capaz de induzir hiperalgesia nos animais e de acordo com os dados obtidos nessa caracterização o 13º dia foi escolhido como tempo ideal para a realização dos tratamentos, visto que nesse dia ocorre o pico da hiperalgesia. Os experimentos realizados com esse modelo foram realizados todos em fêmeas, pois a prevalência da neuropatia relacionada ao HIV é maior em mulheres do que nos homens.

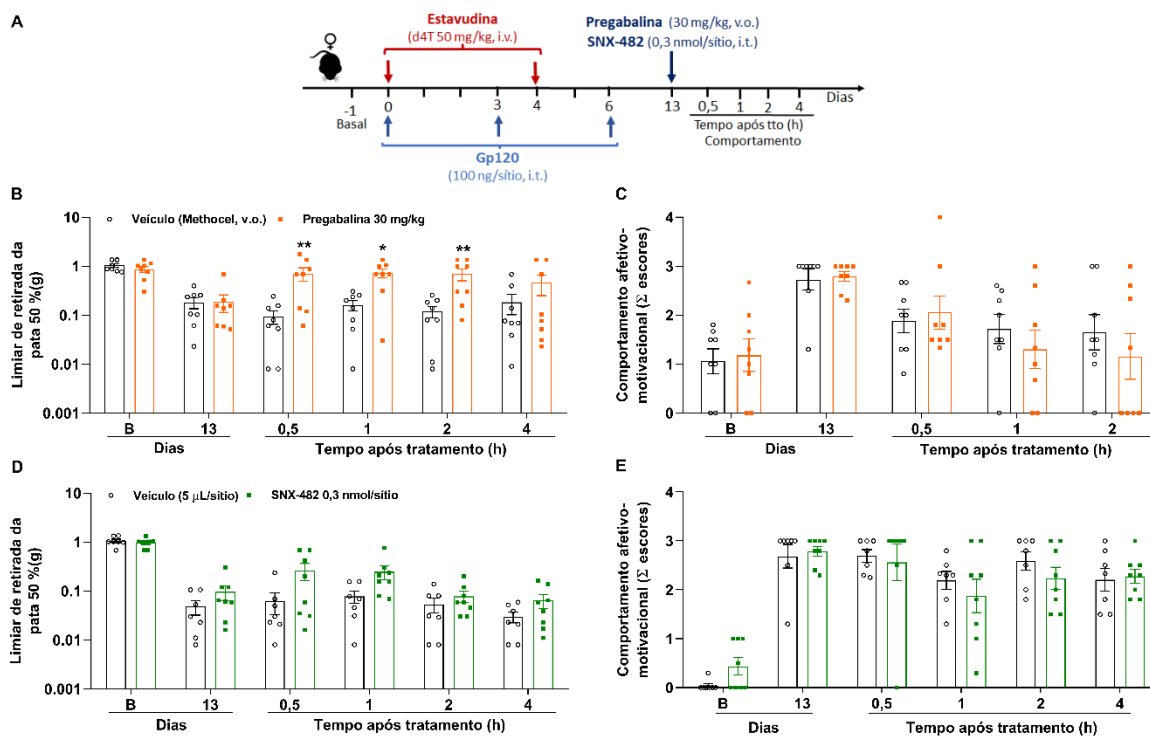
Efeito do tratamento com pregabalina e SNX-482 no modelo de NS-HIV

A pregabalina é usada clinicamente para o tratamento de neuropatias e é um fármaco cujo mecanismo de ação é bloquear a subunidade $\alpha 2\delta$ dos CCDV.

Considerando isso, foi utilizado o tratamento oral com a pregabalina (30 mg/kg) no 13º dia como controle positivo. O tratamento com a pregabalina foi capaz de reverter a queda no limiar de retirada da pata dos animais a partir de 30 minutos após o tratamento oral e o efeito antinociceptivo foi visto por até duas horas após o tratamento (Figura suplementar 2B). Infelizmente o tratamento com a pregabalina não foi capaz de reverter o comportamento afetivo motivacional em nenhum dos tempos avaliados (Figura suplementar 2C).

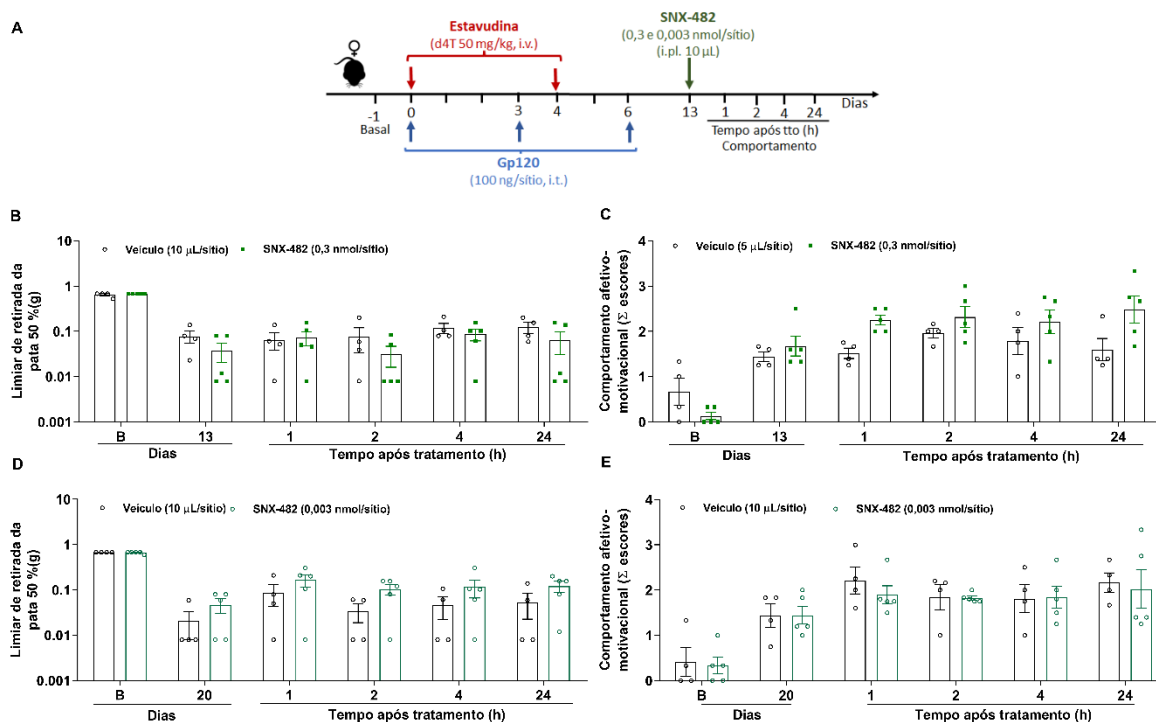
O mesmo protocolo experimental foi utilizado para realizar o tratamento intratecal com o SNX-482 (0,3 nmol/sítio) no 13º dia após o início da indução do modelo. O tratamento com o bloqueador do Cav2.3 foi capaz de reverter a queda no limiar de retirada da pata dos animais apenas uma hora após o tratamento intratecal (Figura suplementar 2D). Não foi vista uma redução no comportamento afetivo motivacional em nenhum dos tempos avaliados (Figura suplementar 2E).

Figura suplementar 3 – Decurso temporal do efeito antinociceptivo do tratamento com pregabalina ou SNX-482 no NS-HIV em fêmeas C57BL/6. Efeito antinociceptivo do tratamento (13º dia após indução da NS-HIV) com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) (B e C) ou SNX-482 (0,3 nmol/sítio, i.t.) (D e E) na NS-HIV em camundongos fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de tratamento (no 13º dia após indução do NS-HIV) com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) ou SNX-482 (0,3 nmol/sítio, i.t.) na NS-HIV. B e D – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C e E – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de vonFrey). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 8 por grupo) 2-3 blocos experimentais independentes, analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparados ao grupo controle) e Tukey (comparados com basal). *p < 0,05; **p < 0,01; e ***p < 0,001 comparados com veículo. (B) = basal. Teste de Grubb foi aplicado para detecção de possíveis outliers e nenhum outlier foi detectado.



Para verificar se o Cav2.3 estaria participando da nociceção induzida pelo NS-HIV de uma maneira mais local foi realizado o tratamento intraplantar com o SNX-482. O tratamento intraplantar com o SNX-482 também foi realizado no 13º dia após o início da indução do modelo. Primeiramente foi testado SNX-482 com a dose de 0,3 nmol/sítio, está é a mesma dose utilizada no modelo de POP. No entanto, está dose não foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica (Figura suplementar 3A) e nem o comportamento afetivo motivacional (Figura suplementar 3B) induzida no modelo de NS-HIV. Considerando que o tratamento intraplantar é um tratamento que permanece contido no local do tratamento hipotetizamos que a nossa dose de 0,3 nmol/sítio pode ser considerada uma dose muito elevada para esse tratamento local e com isso nosso bloqueador poderia estar agindo em outros alvos e causando o efeito nociceptivo. Além disso, o tempo de 13 dias para o tratamento pode não ter aumentado os níveis de mRNA para o bloqueio do Cav2.3 pelo SNX-482. Visando isso, realizamos um novo tratamento intraplantar com uma dose menor de SNX-482 (0,003 nmol/sítio) no 20º dia após o início da indução do modelo. Infelizmente essa dose também não foi capaz de reverter a hiperalgesia e o comportamento afetivo motivacional induzido pelo NS-HIV (Figura suplementar 3C e D, respectivamente).

Figura Suplementar 4 – Tratamento com SNX-482 local no NS-HIV em fêmeas C57BL/6. Efeito do tratamento local (13º dia após indução da NS-HIV) com SNX-482 (0,3 nmol/sítio, i.pl.) (B e C) ou SNX-482 (0,003 nmol/sítio, i.pl.) na NS-HIV em camundongos fêmeas. A – Desenho experimental do protocolo de tratamento local (no 13º dia após indução do NS-HIV) com SNX-482 (0,3 ou 0,003 nmol/sítio, i.pl.) na NS-HIV. B e D – Verificação da hiperalgesia mecânica (Limiar de retirada da pata 50% (g)). C e E – Escore de hiperalgesia mecânica (Soma dos escores após aplicação dos filamentos de vonFrey). Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 4$ por grupo) 2-3 blocos experimentais independentes, analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido pelos pós-testes de Sidak (comparados ao grupo controle) e Tukey (comparados com basal). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ comparados com veículo. (B) = basal. Teste de Grubb foi aplicado para detecção de possíveis outliers e nenhum outlier foi detectado.



Com esses dados concluímos que o Cav2.3 parece não possuir um papel local importante na nocicepção induzida pelo NS-HIV e que a sua participação a nível medular é limitada e precisa ser mais estudada.