

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA
P1G10, DE *Vasconcellea cundinamarcensis*, SOBRE A DOR NEUROPÁTICA
PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO**

Cecília Assunção Moreira

Belo Horizonte

2020

Cecília Assunção Moreira

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA P1G10, DE *Vasconcellea cundinamarcensis*, SOBRE A DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Miriam Teresa Paz Lopes
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero

Belo Horizonte

2020

043 Moreira, Cecília Assunção.
Avaliação do efeito antinociceptivo da fração proteolítica P1G10, de *Vasconcellea cundinamarcensis*, sobre a dor neuropática periférica induzida por quimioterápico [manuscrito] / Cecília Assunção Moreira. - 2020.

94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes. Coorientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Doenças do Sistema Nervoso Periférico. 2. Paclitaxel. 3. Inflamação. 4. Carica. I. Lopes, Miriam Teresa Paz. II. Romero, Thiago Roberto Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, N° 533

"AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA P1G10, DE *Vasconcellea cumdinae* *marcensis*, SOBRE A DOR NEURÓPÁTICA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO"

CECÍLIA ASSUNÇÃO MOREIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 18 de dezembro de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira, ICB/UFMG

Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte, ICB/UFMG

Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes, ICB/UFMG - Orientadora

Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero, ICB/UFMG - Coorientador

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Thiago Roberto Lima Romero, Professor do Magistério Superior, em 18/12/2020, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Luciene Bruno Vieira, Professora do Magistério Superior, em 21/12/2020, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Miriam Teresa Paz Lopes, Professora do Magistério Superior, em 11/01/2021, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por Igor Dimitri Gama Duarte, Membro de comitê, em 26/01/2021, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[http://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo_ehnr?](http://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo_ehnr?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](http://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo_ehnr?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0465420** e o código CRC **CB79E67F**.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Miriam Teresa Paz Lopes, pelo exemplo de profissionalismo, pelo compromisso com a ética e com a ciência e pela imensa paciência e dedicação durante a orientação deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero, por ter acreditado no projeto, pela contribuição científica e pelo aprendizado.

Ao Prof. Dr. Ênio Ferreira, pela colaboração e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos amigos do LSAT pela acolhida, pelos ensinamentos, pelas contribuições e pela ótima convivência no laboratório. Agradeço, em especial, à minha amiga de laboratório Madaline Souza, por todos os momentos partilhados, momentos de dedicação, de esforço, de frustrações, de descontração e de alegria.

Aos meus amigos do LDA, que tornaram este trabalho possível. Agradeço em especial aos meus amigos Douglas, Daniel e Renata, que tanto me ensinaram e auxiliaram, sempre com muita paciência e empenho.

Aos meus amigos da Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia, que tornaram o meu percurso durante esses anos mais leve e prazeroso.

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela oportunidade de realização desta pesquisa e pela enorme contribuição à minha formação intelectual.

À Universidade Federal de Minas Gerais e seus grandes professores e mestres, pela formação profissional e pessoal que me proporcionaram.

À Maura Vilela pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

Aos animais que foram submetidos a todos os experimentos, pois por meio deles grandes avanços na ciência são alcançados.

Às Agências de Fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À minha família e amigos pelo amor e carinho incondicionais e por todo o suporte a mim dado durante essa caminhada.

COLABORADORES

Prof. Dr. Carlos E. Salas Bravo

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG.

Prof. Dr. Ênio Ferreira

Departamento de Patologia, ICB/UFMG.

Prof. Dr. Thiago R. Lima Romero

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB/UFMG

RESUMO

Estudos prévios mostram que a fração proteolítica P1G10, advinda do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, possui atividade antitumoral/antimetastática, bem como, atividade anti-inflamatória em diferentes modelos murinos. Na quimioterapia do câncer, alguns agentes citotóxicos, dentre estes paclitaxel (PTX), apresentam como um dos efeitos tóxicos, a dor neuropática periférica (DNP), produto de processo inflamatório em gânglios da raiz dorsal (GRD) da medula e nervos periféricos. Neste trabalho temos por objetivo avaliar o efeito protetor e/ou modulador de P1G10 sobre a DNP induzida pelo PTX em modelo experimental de alodinia ao frio (placa fria), em camundongos BALB/c fêmeas. Nesse modelo, a fração P1G10 não apresentou efeito antinociceptivo nas maiores doses (3 e 5 mg/kg) avaliadas. No entanto, o efeito foi observado, na dose de 1 mg/kg, ao impedir o desenvolvimento da alodinia fria pelo uso de PTX (PTX (8 mg/kg) vs P1G10 (1 mg/kg) + PTX (8 mg/kg), $p < 0,001$; ANOVA fatorial, pós-teste Tukey). O tratamento com PTX não promoveu alterações histopatológicas em estruturas nervosas envolvidas na nocicepção, como os GRD e os nervos ciáticos. Entretanto, observou-se uma tendência à diminuição da população celular no GRD, principalmente, no 18º dia após o início do tratamento com PTX (valores medianos: neurônios 74,5 - PTX vs 99,0 - controle, células periféricas 305,0 - PTX vs 407,0 - controle), sugerindo uma neurotoxicidade tardia do fármaco. Essa diminuição no número de células foi revertida com o tratamento concomitante de PTX e P1G10 (valores medianos: neurônios 113,0 e células periféricas 377,0; ANOVA de um fator de Kruskal-Wallis por postos). Assim, P1G10 mostrou possuir atividade antinociceptiva na DNP induzida por PTX, caracterizada pela reversão da alodinia ao frio, possivelmente, atuando como protetor celular, uma vez que impede o dano causado por PTX.

Palavras-chave: dor neuropática periférica, paclitaxel, inflamação, *Vasconcellea cundinamarcensis*

ABSTRACT

Previous studies reveal that the proteolytic fraction P1G10, derived from the latex of *Vasconcellea cundinamarzensis*, has antitumor/antimetastatic and anti-inflammatory activity in different murine models. In chemotherapy, some cytotoxic agents, such as paclitaxel (PTX), induce peripheral neuropathic pain, the product of an inflammatory process in dorsal root ganglion (DRG) of spinal cord and peripheral nerves. The aim of this study was to evaluate the protective and/or modulating effect of P1G10 on peripheral neuropathic pain induced by PTX in an experimental model of cold allodynia (cold plate) in female BALB/c mice. In this model, P1G10 fraction had no antinociceptive effect at the highest evaluated doses (3 and 5 mg/kg). However, antinociceptive effect was achieved at a dose of 1 mg/kg, by preventing the development of cold allodynia due to the administration of PTX (PTX (8 mg / kg) vs P1G10 (1 mg / kg) + PTX (8 mg/kg), $p < 0.001$; factorial ANOVA, Tukey post-test). Histopathological changes in nervous structures related to nociception, such as the DRG and sciatic nerves, were not observed after PTX treatment. However, there was a tendency towards a decrease in cell population, mainly on the 18th day after the start of PTX treatment (median values for neurons: 74.5 - PTX vs 99.0 - control; peripheral cells: 305.0 - PTX vs 407.0 - control), which may indicate late neurotoxicity of the drug. This decrease in the number of cells was reversed by the concomitant treatment of PTX and P1G10 (median values: neurons 113.0 and peripheral cells 377.0; Kruskal–Wallis ANOVA). Thus, P1G10 was shown to have antinociceptive activity in neuropathic pain induced by PTX, characterized by the reversion of cold allodynia, possibly acting as a cellular protector, since it prevents the damage generated by PTX.

Keywords: peripheral neuropathic pain, paclitaxel, inflammation, *Vasconcellea cundinamarzensis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> , Caricaceae.....	15
Figura 2. Estrutura química do paclitaxel.....	22
Figura 3. Local de ligação do paclitaxel no microtúbulo.....	23
Figura 4. Moléculas/substâncias envolvidas na patogênese da DNPIQ.....	29
Figura 5. Esquema do protocolo para definição do modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico (DNPIQ).....	39
Figura 6. Esquema do protocolo para indução da alodinia fria por PTX.....	40
Figura 7. Esquema do protocolo para avaliação do efeito antinociceptivo da fração P1G10 sobre a alodinia fria induzida por PTX.....	41
Figura 8. Efeito nociceptivo do paclitaxel (alodinia fria) na pata de camundongo.....	45
Figura 9. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 (5 mg/kg) na alodinia fria induzida por paclitaxel.....	46
Figura 10. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 (3 mg/kg) na alodinia fria induzida por paclitaxel.....	47
Figura 11. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 (1 mg/kg) na alodinia fria induzida por paclitaxel.....	49
Figura 12. Avaliação histológica de gânglios da raiz dorsal da medula espinal após 12 dias do início dos diferentes tratamentos.....	51
Figura 13. Avaliação histológica de gânglios da raiz dorsal da medula espinal após 18 dias do início dos diferentes tratamentos.....	52
Figura 14. Avaliação histológica de nervos ciáticos após 12 dias do início dos diferentes tratamentos.....	54

Figura 15. Avaliação histológica de nervos ciáticos após 18 dias do início dos diferentes tratamentos.....	56
Figura 16. Distribuição dos dados para área total dos nervos ciáticos nos 12º e 18º dias do início dos diferentes tratamentos.....	57
Figura 17. Representação esquemática dos efeitos de P1G10 sobre a DNP induzida por paclitaxel.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de células periféricas totais – nervo ciático (12 dias)	54
Tabela 2. Frequência dos neurônios totais – nervo ciático (12 dias)	54
Tabela 3. Frequência de células periféricas totais – nervo ciático (18 dias)	56
Tabela 4. Frequência de neurônios totais – nervo ciático (18 dias)	56
Tabela 5. Frequência da área do nervo ciático (12 dias)	58
Tabela 6. Frequência da área do nervo ciático (18 dias)	58

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	micrômetro (10 ⁻⁶ m)
et al.	e outros (do latim <i>Et ali</i>)
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenosa
mg	miligramas
kg	kilogramas
<i>s.c.</i>	subcutâneo
Veic	veículo
<i>v.o.</i>	via oral
vs	versus

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
BCL2	família Bcl-2 de proteínas reguladoras, que regulam a morte celular (apoptose), do inglês <i>B-cell lymphoma-2</i>
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de ética em Experimentação Animal
COX	ciclo-oxigenase
CXCL	quimiocina que apresenta na porção N- terminal dois resíduos de cisteína adjacentes
DN	dor neuropática
DNP	dor neuropática periférica
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNPIQ	dor neuropática induzida por quimioterápico
GRD	gânglio da raiz dorsal
HE	Hematoxilina-Eosina
IL	interleucina
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor, do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MCP-1	citocina quimiotática envolvida no recrutamento de monócitos para o local de inflamação, do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> .
MPO	enzima mieloperoxidase
NC	nervo ciático

NP	neuropatia periférica
NPIQ	neuropatia periférica induzida por quimioterápico
PTX	Paclitaxel
ROS	espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNBS	ácido trinitrobenzeno sulfônico
TGF	fator de crescimento transformante, do inglês <i>tumor-associated neutrophil</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	fator de crescimento para endotélio vascular, do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Atividades farmacológicas da fração P1G10, derivada do látex de <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	15
1.2. Câncer: aspectos gerais e bases do tratamento quimioterápico.....	18
1.2.1. Taxanos: efeitos farmacológicos, mecanismos de ação e toxicidade.....	21
1.3. Dor, definição e sua transmissão.....	24
1.3.1. Dor neuropática periférica induzida por quimioterapia (DNPIQ).....	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Material.....	33
4.1.1. Biológicos.....	33
4.1.2. Fármacos utilizados.....	33
4.1.3. Reagentes.....	34
4.1.4. Soluções.....	34
4.1.5. Equipamentos.....	36
4.1.6. Softwares.....	36
4.1.7. Diversos.....	37
4.2. Métodos.....	37
4.2.1. Obtenção da fração P1G10 do látex de <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	37
4.2.2. Ensaio biológico comportamental.....	38
4.2.2.1 Definição do modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico (DNPIQ) – testes Hot Plate e Cold Plate.....	38
4.2.2.2 Indução da nocicepção por PTX - alodinia fria.....	39
4.2.2.3 Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 sobre a alodinia fria induzida por PTX.....	40
4.2.3. Avaliações morfológicas.....	41

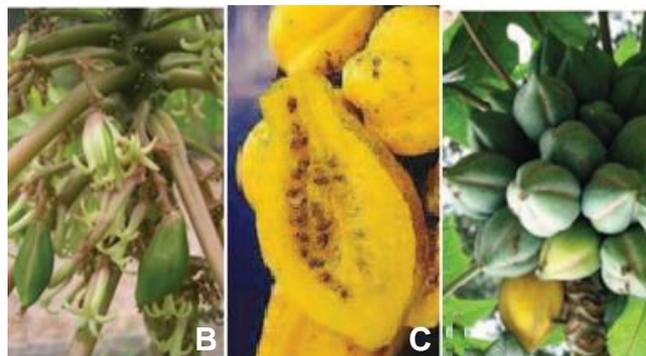
4.2.3.1 Dissecção do gânglio da raiz dorsal (GRD) da medula espinhal.....	41
4.2.3.2. Dissecção do nervo ciático (NC).....	41
4.2.3.3. Preparo e análise dos cortes em lâminas.....	42
4.2.4 Análises Estatísticas.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Indução da nocicepção por paclitaxel (PTX).....	44
5.2. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 frente à alodinia fria induzida por PTX.....	45
5.3. Avaliação histológica dos gânglios da raiz dorsal (GRD) da medula espinhal.....	49
5.4. Avaliação histológica dos nervos ciáticos (NC).....	52
5.5. Avaliação da área total dos NC.....	57
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
APÊNDICES.....	83
APÊNDICE A.....	83
APÊNDICE B.....	84
APÊNDICE C.....	87
APÊNDICE D.....	88
APÊNDICE E.....	93
APÊNDICE F.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Atividades farmacológicas da fração P1G10, derivada do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*

Vasconcellea cundinamarcensis, também conhecida como *Carica candamarcensis*, é uma espécie da família Caricaceae, comumente encontrada na costa oeste da América do Sul, se estendendo da Colômbia até a Bolívia em forma natural, e como planta cultivada no Chile, em cidades costeiras. Essa é reconhecida por conter tronco grosso, ramificado e uma coroa de folhas compacta na sua parte terminal. O fruto tem formato ovoide, apresenta coloração amarelada quando maduro e mede entre 5 e 15 cm de comprimento (Figura 1). Seus frutos tem como finalidade principal a produção de conservas (fruto maduro) e de papaína, cisteíno protease presente em seu látex, usada em preparações farmacêuticas com diversas finalidades (LEON, 1987, VIDAL et al., 2009).

Figura 1. *Vasconcellea cundinamarcensis*, Caricaceae.



A – Inflorescências; **B** – Fruto maduro; **C** – Frutos imaturos da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*, pertencentes à família Caricaceae. Fontes: ecocrop.fao.org e fruitipedia.com - acesso em: 24/03/2020.

O látex proveniente de *V. cundinamarcensis* é rico em uma mistura de proteases que apresentam alta atividade proteolítica (BRAVO; HERMOSILLA; SALAS, 1994). Esse é obtido através de incisões feitas nas camadas mais externas do fruto imaturo que, em seguida, passa pelo processo de liofilização. Por meio da

técnica de separação cromatográfica do látex em coluna Sephadex G10, são obtidos dois picos, denominados P1G10 e P2G10, sendo a maior parte da quantidade de proteína e da atividade proteolítica concentrada em P1G10 (TEIXEIRA et al., 2008).

A fração P1G10 apresenta uma diversidade de efeitos mostrados em roedores, dentre estes a atividade cicatrizante de lesões de pele, de diferentes etiologias, assim como de úlceras gástricas e de cólon (FREITAS et al., 2017; LEMOS et al., 2011; MELLO et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2020, respectivamente). A atividade cicatrizante de P1G10 em modelo murino de lesão de pele, induzida por queimaduras por calor, foi confirmada pelo aumento da epitelização do tecido ferido nos animais tratados com a fração (entre 0,01% e 0,1%). Nas análises histológicas observou-se menor granulação e infiltração inflamatória e maior organização de feixes de colágeno, alinhados paralelamente à epiderme (GOMES et al., 2010). Em modelo de feridas excisionais, P1G10 (0,05%) eliciou uma taxa de cicatrização duas vezes mais rápida que a do grupo controle. A melhora na qualidade do reparo de feridas foi mostrada pela análise histológica do tecido em cicatrização. No geral, P1G10 (0,05%) induziu uma lesão mais limpa e com menos resíduos de células ou tecido necrótico no período examinado e promoveu aumento da deposição de colágeno organizado (FREITAS et al., 2017).

Em modelo murino de úlcera gástrica, P1G10 mostrou, também, considerável melhora no estado geral dos animais, com a recuperação total do peso perdido com a indução da lesão por ácido acético 10% (ARAÚJO-SILVA, 2009). Ainda em estudos com animais tratados com a fração, nosso grupo de pesquisa mostrou melhora dos sinais clínicos, como aumento da sobrevivência em animais com melanoma B16F1 (DITZ et al., 2015) e ganho de peso de 30%, em animais com colite induzida por TNBS (ALBUQUERQUE et al., 2020).

A farmacocinética e a toxicidade da fração P1G10 da *V. cundinamarcensis* foram avaliadas pela utilização de P1G10 marcada com tecnécio (^{99m}Tc), na dose de 1 mg/kg, em camundongos Swiss, por via intravenosa (*i.v.*), subcutânea (*s.c.*) ou oral (*v.o.*). A biodisponibilidade para via *s. c.* foi de aproximadamente 100%, caindo para 8% por via *v.o.* As doses letais de 50% foram maiores que 5 mg/kg para *i.v.* e *i.p.* e maiores que 300 mg/kg para *v.o.* A fração P1G10 não apresentou efeito mutagênico ou genotóxico evidentes, em medidas *in vitro* e *in vivo* (teste de Ames e formação de micronúcleos, respectivamente) (VILLALBA, 2010). Resultados de toxicologia tópica mostraram que a aplicação tópica contínua de P1G10 (0,1% dispersas em Polawax®),

por 3 ou 6 meses, não induziu danos nos tecidos examinados. Não foram observadas mudanças nas massas e na histologia de órgãos como baço, estômago, fígado, pulmão e rim dos animais submetidos a esses tratamentos (LEMOS et.al, 2011). Esses resultados motivaram a realização do estudo clínico de P1G10 como cicatrizante cutâneo. O ensaio clínico de fase I, em pele íntegra, confirmou a segurança em humanos nessa condição. Em ensaio clínico de fase II, englobando cinquenta pacientes neuropatas com diabetes tipo 2 e úlceras crônicas nos pés, a aplicação tópica de 0,1% P1G10 formulada em Polawax, revelou aumento significativo ($p < 0,05$) da cicatrização das úlceras em comparação com o tratamento padrão (hidrogel) (TONACO et al., 2018). No momento, está em desenvolvimento essa atividade farmacológica sobre úlceras venosas.

Paralelamente às atividades farmacológicas descritas acima, P1G10 mostrou notável efeito antitumoral e antimetastático em diferentes modelos animais. Em modelo de melanoma murino B16F1, na dose de 5 mg/kg, P1G10 promoveu diminuição do tamanho do tumor e aumento da taxa de sobrevivência dos animais. Essa atividade antitumoral de P1G10 foi fundamentada pelo seu efeito pró-apoptótico e pela sua capacidade de reduzir a adesão celular à matriz extracelular. Além disso, a redução da angiogênese tumoral foi observada, sendo revelada pela diminuição da hemoglobina e dos níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (DITZ et al., 2015). Também foi relatada ação antitumoral de P1G10 em modelo de carcinoma de Erlich, sendo capaz de inibir o crescimento tumoral acompanhado de modulação de parâmetros inflamatórios/imunológicos. Redução nos níveis de TNF- α foi observada nos animais tratados nas doses de 3 mg/kg (35%) e 5 mg/kg (52%) e um aumento significativo de leucócitos totais nos animais tratados quando comparados ao grupo controle. Na contagem diferencial de leucócitos foi observado que o aumento de leucócitos ocorreu em função do aumento significativo de neutrófilos nos animais tratados com P1G10. Concomitantemente ao aumento do número de leucócitos circulantes observou-se diminuição significativa no número de células da medula óssea, o que sugere uma atividade moduladora de P1G10, por meio do aumento da liberação das células pela medula para a circulação (VIANA, 2010).

Dados não publicados em artigo científico do nosso grupo de pesquisa indicam que a fração proteolítica apresenta, também, capacidade anti-inflamatória em tumores ditos inflamatórios. Em modelo de carcinoma de mama murino 4T1, P1G10 (1 - 5

mg/kg) reduziu a massa dos tumores em 50%. Além disso, a fração reduziu os níveis intratumorais de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas como MCP-1 (48%), IL-6 (63%), VEGF (47%) e KC/CXCL1 (53%). Acredita-se, então, que a atividade antitumoral de P1G10 sobre esse modelo esteja relacionada à redução da angiogênese e da inflamação, por ser capaz de reduzir níveis intratumorais de citocinas com tais propriedades (BRAGA, 2013).

Atividade antimetastática da subfração CMS2, de P1G10, foi evidenciada em modelo murino de melanoma B16F-10, tido como altamente metastático. O tratamento com CMS2, nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg reduziu, em aproximadamente 50%, o número de pontos metastáticos pulmonares em comparação ao grupo em controle ($p < 0,001$). Por análise proteômica, observa-se que a subfração modula a expressão de proteínas superexpressas em células tumorais, associadas ao desenvolvimento metastático, uma vez que o tratamento com CMS2 foi capaz de normalizar a expressão dessas (LEMOS et al., 2018).

1.2. Câncer: aspectos gerais e bases do tratamento quimioterápico

Câncer é a denominação dada para um grupo de mais de 100 doenças que tem como característica principal o crescimento e a multiplicação anormal e desordenada das células (INCA, 2020). Os diversos tipos de tumores estão entre as principais causas de morte, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. No mundo, aproximadamente, 18 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por câncer foram reportados no ano de 2018 (GLOBOCAN, 2018). Os tipos mais incidentes são os cânceres de próstata e de pulmão na população masculina e os cânceres de mama e de colo do útero na população feminina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública, com elevadas taxas de mortalidade devido, principalmente, à metástase em órgãos vitais, como pulmões, fígado e cérebro. A literatura indica que essa neoplasia exhibe heterogeneidade metastática, com preferência metastática distinta para vários órgãos, dando origem a diferenças no prognóstico e nas respostas à terapia (LIANG et al., 2020). O câncer de mama inflamatório por exemplo, apresenta maior agressividade, por se desenvolver rapidamente, apresentar disseminação sistêmica precoce, alta

taxa de recorrência e má resposta ao tratamento e, portanto, mulheres que apresentam esse tipo de neoplasia, geralmente, manifestam pior prognóstico em relação às aquelas diagnosticadas com outros tipos de câncer de mama (TOLEDO et al., 2018).

Em linhas gerais, o tratamento dos diferentes tipos de câncer pode ser feito por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea e, muitas vezes, a combinação de mais de uma destas modalidades (INCA, 2019). Além disso, a hormonioterapia e a imunoterapia vêm sendo empregadas no tratamento dessa condição de saúde (ALVARENGA et al., 2014). A utilização de agentes hormonais se faz, em geral, para tumores que expressam receptores hormonais, como é o caso dos carcinomas de mama, próstata ou endométrio (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG'S, 2015). A imunoterapia, por sua vez, objetiva a destruição das células tumorais, a partir da mobilização do sistema imune do hospedeiro e vem sendo amplamente utilizada na prática clínica como recurso terapêutico, especialmente, para tumores sólidos (ZHOU e ZHANG, 2019). Por último, temos os anticorpos monoclonais, que têm sido considerados como tecnologia inovadora para o tratamento de alguns tipos de câncer. Esses anticorpos se ligam em proteínas específicas que são super expressas em tumores e expressas em baixos níveis em células normais, os "antígenos tumorais". Essa terapia, apesar de inovadora, apresenta custos elevados, o que limita consideravelmente seu acesso (VIDAL; FIGUEIREDO; PEPE, 2018; KAVANAUGH, 2019).

A escolha da modalidade terapêutica é feita de acordo com tipo e com o estadiamento do tumor. Considerando-se o câncer de mama, 60% dos casos são diagnosticados em estágio localizado. Para esses casos a cirurgia é indicada como forma de tratamento inicial, incluindo a cirurgia conservadora da mama ou a mastectomia. A maioria das mulheres em estágio inicial do câncer, que realizam cirurgia conservadora da mama, recebem tratamento adjuvante. Dessas, metade recebem apenas radioterapia, enquanto, um terço recebe radioterapia e quimioterapia. Em contrapartida, mulheres diagnosticadas em estágio avançado recebem como tratamento de primeira escolha a quimioterapia somada à cirurgia ou a outras terapias (SIEGEL et al., 2012).

Em relação à quimioterapia, os fármacos mais utilizados são classificados como quimioterápicos citotóxicos e podem ser divididos, basicamente, em: agentes alquilantes (mostardas nitrogenadas, ciclofosfamida e cisplatina), que atuam

impedindo a replicação do DNA, por meio da formação de ligações cruzadas entre estes; antimetabólitos, como o metotrexato e 5-fluoruracil, que interferem em vias bioquímicas relacionadas à síntese de DNA; antibióticos citotóxicos, como as antraciclinas (doxorubicina e epirrubicina), bleomicina e mitomicina, que são substâncias microbianas que impedem a divisão celular; e derivados de plantas, como os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e taxanos (paclitaxel - PTX e docetaxel), que interferem na formação e estabilização do fuso mitótico, respectivamente. Uma vez que os agentes citotóxicos têm como alvo principal a divisão celular, tecidos normais em divisão rápida, também, estarão sujeitos à sua ação, podendo causar efeitos tóxicos às células gastrintestinais, do sistema imunológico e capilares (ALMEIDA et al., 2005; DE VITA; HELLMAN; ROSENBERG'S, 2018).

Tratamentos que utilizam doxorubicina e epirrubicina podem levar a cardiomiopatia e danos permanentes ao coração, que são dependentes do tempo e da dose utilizados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Para tratamentos com ciclofosfamida são relatados efeitos adversos importantes como leucoma e trombocitopenia, anemia, toxicidade cardiovascular e da bexiga, além de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (AHLMANN e HEMPEL, 2016). Os quimioterápicos como vincristina e, principalmente, os taxanos, são relatados na literatura como causadores de dor neuropática periférica, por provocarem danos sensoriais às células nervosas. O dano causado é dose dependente e pode perdurar por meses (SIEGEL et al., 2012).

Além dos mecanismos citotóxicos dos agentes quimioterápicos, se torna importante o conhecimento da biologia do tumor para que seja alcançado sucesso terapêutico com a quimioterapia. Considerando os tumores sólidos, observa-se que estes são constituídos por diferentes populações celulares e que tal heterogeneidade é influenciada, tanto por fatores intrínsecos, quanto por fatores extrínsecos (MARJANOVIC; WEINBERG; CHAFFER, 2013; JANUSKEVICIENE e PETRIKAITE, 2019). Essa biologia celular heterotípica reflete a complexidade do tecido tumoral e, conseqüentemente, a abordagem terapêutica. As células tumorais que estão em rápida divisão são altamente quimiossensíveis, enquanto as que estão em repouso (G₀), se multiplicam lentamente no ciclo celular e não são sensíveis, em sua maioria, ao tratamento quimioterápico. Objetiva-se com a quimioterapia alcançar o maior nível de morte celular possível, e, para tanto, doses mais altas são utilizadas. Haja vista

que um único ciclo de terapia não é capaz de eliminar 100% das células tumorais, se torna imprescindível a realização de múltiplos ciclos de tratamento, para que o sucesso terapêutico seja alcançado (ALMEIDA et al., 2005; LUNDQVIST; FUJIWARA; SEOUD, 2015).

Dessa forma, considerando os efeitos citotóxicos e a biologia do tumor, adota-se a estratégia de realização da quimioterapia em ciclos e com a associação de diferentes fármacos. A combinação de diferentes agentes anticâncer, aumenta a citotoxicidade contra as células tumorais sem, necessariamente, aumentar a toxicidade do fármaco, uma vez que, cada um destes é utilizado em doses menores que na monoterapia. Assim, essa terapia visa a recuperação do organismo nos intervalos entre os ciclos, uma menor toxicidade promovida pelos fármacos, em função de menores doses de cada um deles, e a possibilidade de maior exposição de células tumorais em proliferação (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG'S, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

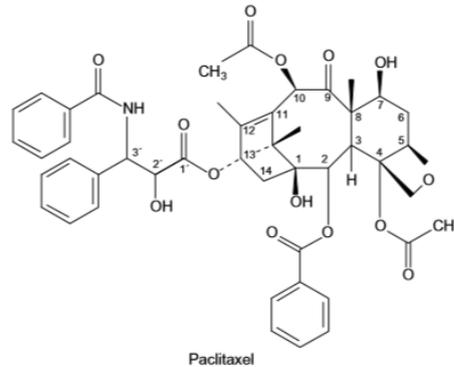
1.2.1. Taxanos: efeitos farmacológicos, mecanismos de ação e toxicidade

Paclitaxel (PTX) e Docetaxel, pertencem a classe dos taxanos ou taxois e são alguns dos agentes mais eficazes utilizados na atualidade no tratamento de câncer, principalmente, de mama (GHERSI et al., 2015). Dados de uma meta-análise com 44.000 mulheres em 33 estudos com taxanos administrados em combinação ou em sequência a regimes com antraciclinas, comparados a um regime somente a base de antraciclina, revelaram uma maior e significativa redução da mortalidade por câncer. Essa redução ocorreu independentemente da idade, status nodal, diâmetro do tumor, diferenciação tumoral (insuficiente ou moderadamente diferenciado), ou até mesmo pelo *status* de receptor de estrógeno (PETO et al., 2012). Esses regimes mais modernos quando comparados a nenhuma quimioterapia, podem reduzir a mortalidade por câncer de mama em cerca de um terço, em um período de 10 anos (PALMIERI e JONES, 2012).

Ambos os principais taxanos - PTX e docetaxel - são muito semelhantes quanto à atividade em experimentação pré-clínica e ao mecanismo de ação, apresentando pequenas diferenças na retenção intracelular de docetaxel, o que pode estar relacionado a sua maior potência (EISENHAUER e VERMORKEN, 1998). O PTX foi o primeiro agente dessa classe a ser descoberto, proveniente da casca do teixo

ocidental *Taxus brevifolia*. Sua estrutura química única e complexa foi descrita primeiramente por Wani et al. (1971) (Figura 2).

Figura 2. Estrutura química do paclitaxel

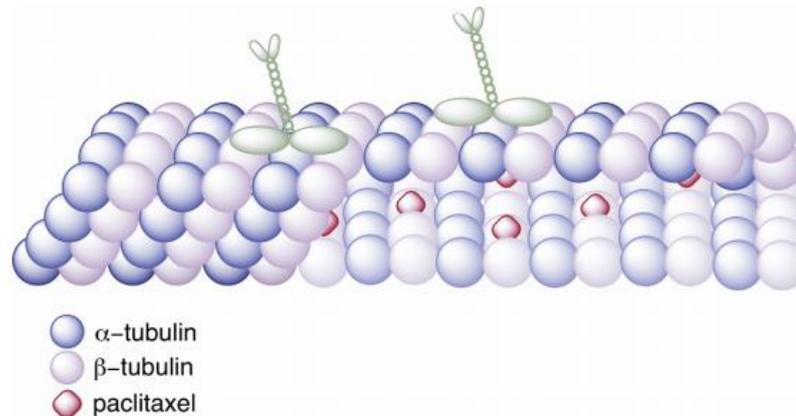


O paclitaxel, produto natural derivado da casca do teixo ocidental *Taxus brevifolia*, foi o primeiro taxano a ser identificado. Sua complexa estrutura química foi descrita por Wani, em 1971. Fonte: EISENHAUER e VERMORKEN, 1998.

Essa classe de agentes antineoplásicos tem como principal alvo celular a tubulina. De maneira geral, existe um equilíbrio dinâmico entre os dímeros de tubulina e a formação de microtúbulos, sendo esses essenciais em vários processos celulares, como na formação de fibras do fuso mitótico necessárias para a divisão celular (BARBUTI e CHEN, 2015). Os taxanos interferem nesse equilíbrio, uma vez que, ao se ligarem à subunidade β da tubulina, interrompem a rotatividade normal dos microtúbulos e, como consequência, tem-se a parada do ciclo celular na fase M, com formação de mitose aberrante e ativação das vias de morte celular (Figura 3) (JORDAN et al., 1993, EISENHAUER; VERMORKEN, 1998, GORNSTEIN e SCHWARZ, 2013). Embora o mecanismo de ação citotóxico do PTX ocorra pela ligação à tubulina, é sabido que este, também, tem como alvo a mitocôndria e impede a função da proteína inibidora da apoptose, Bcl-2. O agente Bcl-2 é capaz de prolongar a sobrevivência celular ao inibir a morte celular apoptótica e está expresso em níveis elevados em vários tipos de câncer. Estudos mostram que os taxanos são capazes de interagir com Bcl-2 nas mitocôndrias, em doses clinicamente alcançáveis e, que a

regulação negativa deste está envolvida na resistência a esse fármaco (FERLINI et al., 2003, ARETI et al., 2014).

Figura 3. Local de ligação do paclitaxel no microtúbulo



Os microtúbulos são formados a partir de dímeros das tubulinas α e β . O paclitaxel se liga à β -tubulina ao longo do interior dos microtúbulos. Fonte: GORNSTEIN e SCHWARZ, 2013.

A via clássica de administração do fármaco é a intravenosa, geralmente administrada a cada 3 semanas. Entretanto, essa via pode levar ao aparecimento de reações de hipersensibilidade e neurotoxicidade (ARGYRIOU et al., 2008). O PTX é fortemente hidrofóbico, o que demanda o uso de veículo de entrega adequado, para que possa ser distribuído nos tecidos tumorais. Esse é, então, usualmente, formulado e administrado aos pacientes por meio de óleo de rícino polietoxilado (Cremophor EL, CrEL) ou ligado à albumina (nab-paclitaxel, Abraxane®) (FRANSSON et al., 2011). Devido à sua elevada toxicidade sistêmica e baixa hidrossolubilidade, o uso de sistemas nanocarreadores tem sido bastante estudado e assumido um papel primordial, como opção alternativa para entrega do fármaco (OERLENMANS et al., 2010; OOSTENDORP et al., 2010; ZHANG; MEI; FENG, 2013; PILLAI, 2014).

Embora a eficácia dos taxanos esteja bem estabelecida na literatura, esses agentes, também, são reconhecidos por apresentar diversos efeitos adversos, consideráveis e únicos, que impõem grandes desafios à prática clínica oncológica. Assim como todos os agentes antineoplásicos, a eficácia desses fármacos precisa ser equilibrada contra a toxicidade, em curto e longo prazos, levando-se em conta o efeito da toxicidade na sobrevivência e na qualidade de vida dos pacientes (PALMIERI e

JONES, 2012). Dentre as toxicidades que podem ocorrer com maior frequência com o uso do docetaxel em relação ao PTX estão inclusas, trombocitopenia, anemia, mucosite, amenorreia relacionada a quimioterapia, astenia, edema e infecções por diferentes patógenos. Regimes de tratamento contendo PTX, revelam como toxicidade de maior gravidade a mielossupressão, além da neuropatia periférica e reações de hipersensibilidade (KIM et al., 2011).

A mielossupressão é definida como uma condição na qual há diminuição da atividade da medula óssea, levando à queda na produção de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas. Quando a mielossupressão é grave, é referida como mieloablação. Essa toxicidade pode ocasionar desde pequenas complicações a problemas fatais (SCHWENKGLINKS et al., 2006; BRIGLE et al., 2017; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019). Observa-se, com a introdução dos taxanos e com o aumento nas doses de antracíclicos, uma maior incidência de mielotoxicidade, levando à neutropenia febril e maiores riscos de infecção (DEBLED et al., 2007). Essa condição clínica traz impactos negativos na qualidade de vida do paciente oncológico, podendo influenciar nos resultados do tratamento (NASCIMENTO, 2012).

Outra importante manifestação de toxicidade induzida pelo PTX é a dor neuropática periférica (DNP), que pode influenciar na resolução da patologia (câncer) e na sobrevivência do paciente, uma vez que os sintomas de dor podem se tornar intoleráveis e exigir assim, redução de dose, atrasos no tratamento ou até mesmo seu abandono (MO et al., 2012; ARGYRIOU et al., 2014; KIM; DOUGHERTY; ABDI, 2015). Trabalhos mostram que pacientes tratados com PTX, apresentam em torno de 70% de desenvolvimento DNP, sendo essa condição clínica bastante prevalente (SERETNY et al., 2014).

1.3. Dor, definição e sua transmissão

Tendo em vista o impacto que a dor provoca no indivíduo, a Associação Internacional para o Estudo da Dor - IASP (2017) conceitua a dor como “experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido”. A dor pode ser, de forma abrangente, classificada em aguda ou crônica. Enquanto a dor aguda tem caráter fisiológico, sendo importante ferramenta de defesa, uma vez que constitui alerta da presença de lesão tecidual, a dor crônica apresenta caráter patológico, haja vista que gera repercussões

biopsicossociais desfavoráveis e incapacitantes, como depressão, ansiedade e perda do condicionamento físico (TEIXEIRA et al., 2009; DALE e STACEY, 2016). Suas principais diferenças evidenciam que a dor não é gerada por um sistema conectado e imutável, mas sim, pelo resultado da plasticidade de moléculas e circuitos, cujas bases bioquímicas, moleculares e neuroanatômicas são foco dos estudos sobre o tema (BASBAUM et al., 2009).

Os principais tipos de dor englobam, a dor nociceptiva, a inflamatória, a nociplástica e a neuropática (central ou periférica). A dor nociceptiva se manifesta quando ocorre a ativação de terminações nervosas livres presentes na periferia, chamadas de nociceptores, por meio de um estímulo nocivo. A dor inflamatória decorre de lesão tecidual, que por sua vez, leva a um processo inflamatório pela ativação celular e liberação de mediadores inflamatórios, que sensibilizam os nociceptores periféricos. A dor nociplástica surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara de dano tissular real, que cause a ativação de nociceptores periféricos, ou evidência de lesão do sistema somatossensorial causando a dor. Já a dor neuropática ocorre como resultado de lesões que afetam o sistema nervoso periférico ou central (BENNETT et al., 2006; WOOLF, 2010; OSSIPOV, 2012; IASP, 2017).

A sinalização sensorial nociceptiva se dá pela ativação dos nociceptores, receptores sensoriais nociceptivos do sistema nervoso somatossensorial periférico, de alto limiar, capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos. Esses estímulos podem ser mecânicos, térmicos ou químicos. Os corpos celulares desses neurônios sensitivos encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (GRD) dos nervos espinhais ou no gânglio trigeminal. Uma vez ativados, os nociceptores geram e transmitem potenciais de ação ao sistema nervoso central (SNC), onde estes sinais são processados e interpretados (CESARE e MCNAUGHTON, 1997; FEIN, 2014; IASP, 2017). Dessa forma, a geração da dor envolve quatro elementos básicos: *i.* transdução – transformação de um estímulo nocivo para um sinal nociceptivo pelos nociceptores; *ii.* transmissão – propagação do sinal nociceptivo pelas fibras nervosas do local da lesão ao SNC; *iii.* transformação - modulação do sinal nociceptivo nos sinais sinápticos e em nível de SNC, por facilitação e inibição ascendente, descendente ou regional; e *iv.* percepção – componente fundamental na experiência a dor, que integra respostas cognitivas e emocionais (COHEN e MAO, 2014).

Os nociceptores podem ser classificados em fibras A δ , A β and A α , que são fibras mielinizadas, de condução mais rápida, e fibras C, fibras amielínicas e de condução lenta. Apenas as fibras A δ e C são reconhecidas por transportar informação nociceptiva, que é percebida como dor, enquanto as fibras A β e A α estão envolvidas na percepção de estímulos não nocivos, como o tato. Em relação à resposta aos diferentes tipos de estímulos nocivos, fibras A δ respondem a estímulos térmicos e ou mecânicos, ao serem ativadas, enquanto que as fibras do tipo C, são também reconhecidas como nociceptores polimodais, por responderem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos nocivos. Existem, ainda, os nociceptores silenciosos, um subconjunto de fibras C, que são ativados por estímulos químicos (mediadores inflamatórios) e respondem a estímulos mecânicos e térmicos, somente após terem sido ativados (FEIN, 2014). Enquanto a ativação das fibras A δ elicitava uma sensação de dor intensa, cortante e de formigamento, a ativação de fibras do tipo C resulta em sensação de queimação maçante e prolongada (LEE e NEUMEISTER, 2020).

A informação nociceptiva gerada é transmitida, então, do neurônio de primeira ordem até o corno dorsal da medula espinhal, onde ocorre a sinapse com o neurônio de segunda ordem. O neurônio secundário envia projeções aferentes aos centros superiores, através do tálamo, onde ocorrerão sinapses entre os neurônios de segunda e terceira ordem, fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo e, por fim, essa informação é transmitida ao córtex cerebral, onde o estímulo doloroso é percebido e interpretado. A modulação da dor ocorre em nível espinhal (neurônios excitatórios e inibitórios presentes na medula) e em nível supraespinhal. A substância cinzenta periaqueductal e o núcleo magno da rafe são regiões no tronco cerebral que trabalham em conjunto para bloquear a transmissão da dor (tratos inibitórios descendentes) (BASBAUM et al., 2009; LEE e NEUMEISTER, 2020).

Em relação à fisiopatologia da dor neuropática, seu desenvolvimento requer uma variedade de mecanismos distintos, da periferia ao sistema nervoso central, que envolvem a medula espinhal, o cérebro e sistemas de modulação descendente (COHEN e MAO, 2014). Exemplos de dor neuropática incluem a polineuropatia dolorosa, a neuralgia pós-herpética, a neuralgia trigeminal, a dor pós-traumática e a dor induzida por quimioterapia. Clinicamente os principais sintomas se dividem em dores espontâneas (que ocorrem sem a indução de um estímulo) e dores evocadas (induzidas por estímulo e hipersensibilidade). Os pacientes, usualmente, referem

hipersensibilidade aos estímulos mecânico e térmico. As dores evocadas, resultantes de hipersensibilidade, podem ser diferenciadas entre alodinia (dor ao estímulo inicialmente não nociceptivo) e hiperalgesia (sensibilidade aumentada à dor frente a um estímulo nociceptivo) (BARON; BINDER; WASNER, 2010).

1.3.1 Dor neuropática periférica induzida por quimioterapia (DNPIQ)

A dor neuropática periférica induzida por quimioterapia (DNPIQ), geralmente, é desencadeada pelo frio, acometendo as porções distais dos membros, boca (dor ou parestesia) e dor mandibular ao morder. Podem ocorrer, ainda, espasmos musculares, fasciculações e câimbras (CAPONERO; MONTARROYOS; TAHAMTANI, 2016). A sensação de resfriamento é tida como fator essencial para a sobrevivência. A exemplo temos a reação de proteção, percebida como dor, em resposta ao estímulo nocivo provocado por frio extremo. No entanto, pacientes com dor crônica, que sofrem de alodinia fria, experimentam paradoxalmente o resfriamento inócuo como dor lancinante (MACDONALD; WOOD; EMERY, 2020). A alodinia fria é, então, caracterizada como uma resposta inadequada do sistema sensorial ao resfriamento leve e que apresenta mecanismos moleculares, ainda, não muito claros (LOLIGNIER et al., 2016).

O papel de canais iônicos e de neurônios sensoriais, como os canais TRPM8, TRPA1 e fibras do tipo A δ e C, no controle da detecção de frio no estado saudável está bem documentado na literatura. Entretanto, a atuação dessas células e moléculas na alodinia fria precisa ser melhor estudada e elucidada. Assim, modelos animais de dor neuropática, exibindo hipersensibilidade ao resfriamento, são ferramentas úteis para a investigação mecanicista dessa alodinia ao frio, sendo a maior parte dos estudos focados na neuropatia induzida por quimioterapia (JAGGI et al., 2011).

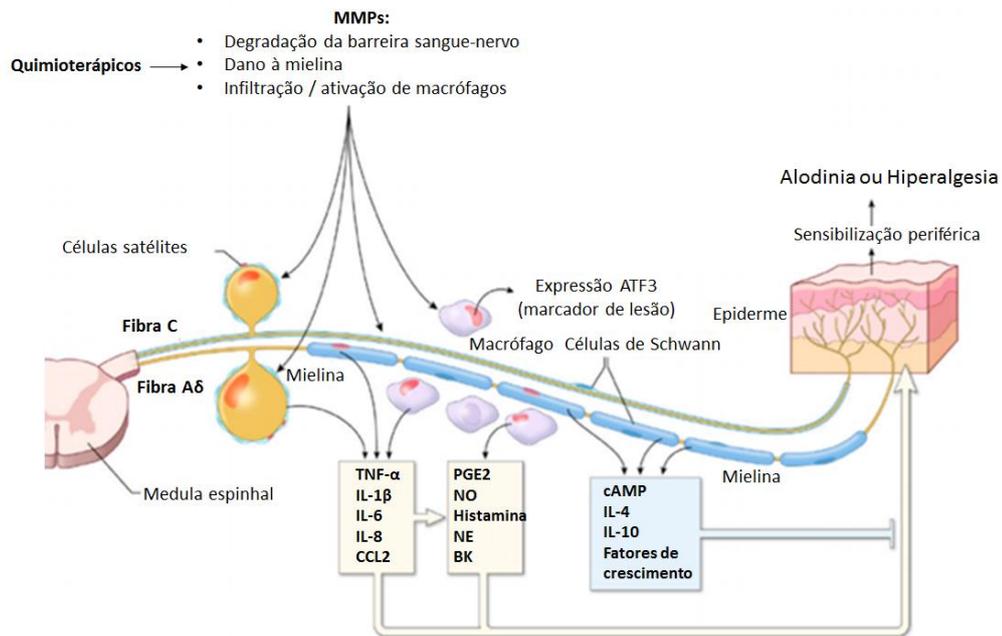
O envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, mais notavelmente Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), interleucinas 1 beta (IL-1 β) e 6 (IL-6), além de CCL2, na iniciação e progressão da DNPIQ, está bem descrito na literatura (WANG e LEHKY, 2012; Figura 4). O SNP apresenta maior vulnerabilidade à ação tóxica de vários fármacos, uma vez que não é protegido com a mesma eficácia que o SNC de agentes exógenos nocivos, o que leva ao acúmulo destes agentes nos GRD e nos nervos periféricos (CAPONERO; MONTARROYOS; TAHAMTANI, 2016). Tal acúmulo leva a

mudanças patológicas, seguidas de infiltração macrofágica, o que acarreta a produção e liberação de citocinas e quimiocinas, assim como, de fatores de crescimento e de outros mediadores inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, serotonina e ácido nítrico. Essas moléculas são conhecidas como potenciais mediadoras para o desenvolvimento e progressão da DNP por estarem envolvidas no processo de ativação dos nociceptores, com conseqüente aumento da excitabilidade da fibra nervosa e da sensibilidade à temperatura ou ao toque, na neuroinflamação e na degeneração axonal (SOMMER e KRESS, 2004; COHEN e MAO, 2014; ZHANG et al., 2016; SALAT, 2020).

O aumento da expressão do marcador de lesão nervosa, fator de transcrição de ativação 3 (ATF3) nos GRD, também foi relatado em modelo de dor neuropática por PTX (2 infusões de 18 mg/kg, dose cumulativa de 36 mg/kg). Essa resposta ocorreu logo após o primeiro dia de infusão do fármaco, o que corrobora o relato de dor pelos pacientes (síndrome da dor aguda induzida por PTX) (PETERS et al., 2007; LOPRINZI et al., 2007). Metaloproteinases de matriz (MMPs), também, desempenham papel importante no processo inflamatório e degenerativo após lesão nervosa. Em modelo de dor neuropática por constrição do nervo espinhal, observou-se aumento da atividade de MMP-9 nos neurônios sensoriais dos GRD dos animais operados. A MMP-9, por sua vez, induziu dor neuropática por meio do aumento dos níveis de IL-1 β , que leva à sensibilização de neurônios sensoriais primários (hipersensibilidade dolorosa) (KAWASAKI et al., 2008).

Em modelo murino de DNP induzida por PTX, Zhang e colaboradores (2013) mostraram que o fármaco induz a expressão de proteína quimiotática de monócito 1 (CCL2/MCP-1) e de seu receptor CCR2 nos GRD dos animais tratados, com conseqüente aumento de cálcio intracelular nos neurônios sensitivos, o que leva ao aumento da excitabilidade da fibra nervosa e ao desenvolvimento da DNP. Em outro estudo, foi demonstrada a contribuição da sinalização de MAP quinases por ativação do receptor do tipo Toll 4 (TLR4), nos GRD dos animais tratados, na manifestação da neuropatia por PTX (LI et al., 2015). Diante disso, o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor se faz importante e torna essas citocinas potenciais alvos terapêuticos nessa condição (WANG e LEHKY, 2012).

Figura 4. Moléculas/substâncias envolvidas na patogênese da DNPIQ.



Representação esquemática da rede de moléculas/substâncias envolvidas na patogênese da dor neuropática periférica induzida por quimioterapia. Fonte: WANG e LEHKY, 2012 - adaptado.

Atualmente, há escassez de fármacos para prevenir ou tratar a DNPIQ, tornando, assim, o estudo sobre a fisiopatologia da dor neuropática e o desenvolvimento de novas opções de tratamento essenciais. Vários estudos realizados em animais, investigando a ocorrência de DNP por PTX e a busca de novas alternativas terapêuticas para esta condição têm sido encontrados na literatura, como a gabapentina, inibidores do transportador de ácido gama-aminobutírico-1, dentre outros, com alguma medida de sucesso para reduzir a nocicepção induzida pela quimioterapia (HUEHNCHEN; BOEHMERLE; ENDRES, 2013; MASOCHA e PARVATHY, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos clínicos utilizando misturas enzimáticas contendo papaína, tripsina e quimiotripsina revelaram melhora da tolerância à quimioterapia e aos efeitos adversos do tratamento oncológico, resultando em melhora da condição clínica do indivíduo e da qualidade de vida (LEIPNER e SALLER, 2000; WALD et al., 2001; BEUTH et al., 2016). Conforme revisto por Chobotova e colaboradores (2010), os efeitos antitumorais da bromelina englobam a supressão direta das células cancerosas, bem como a modulação da função dos sistemas inflamatório, imunológico e hemostático, evidenciados pela redução da expressão de ciclo-oxigenase-2 (Cox-2), assim como de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, na presença de inflamação, com o uso desta mistura de cisteíno proteases.

Nesse sentido, frações e sub-frações proteolíticas, contendo proteínas do tipo cisteíno proteases derivadas do látex da planta *Vasconcellea cundinamarcensis*, vem sendo estudadas pelas suas atividades farmacológicas. Dentre essas, destacam-se as capacidades cicatrizante (MELLO et al., 2008; LEMOS et al., 2011; FREITAS et al., 2017), antitumoral (DITZ et al., 2015), antimetastática (LEMO et al., 2018) e anti-inflamatória (FREITAS et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2020). No modelo experimental de tumor inflamatório de mama murino – 4T1, puderam ser mostradas, conjuntamente, as atividades antitumoral e anti-inflamatória da fração (BRAGA, 2013 e 2017).

Em relação à atividade anti-inflamatória, em animais tratados com P1G10, houve diminuição dos níveis intratumorais de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas (BRAGA, 2013). Já em modelo de colite aguda induzida por TNBS, P1G10 reduziu o perfil inflamatório no tecido intestinal, acompanhado da diminuição dos níveis de MCP-1, TNF α e de COX-2 e aumento dos níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (ALBUQUERQUE et al., 2020). Em modelo de carcinoma de Erlich, P1G10 mostrou ação sobre a imunidade celular (VIANA, 2010).

Ainda em estudos com animais tratados com a fração P1G10, nosso grupo de pesquisa mostrou que os efeitos farmacológicos vêm acompanhados de melhora dos sinais clínicos, como aumento da sobrevivência em animais com melanoma B16F1 (DITZ et al., 2015) e pelo ganho de peso tanto em modelo murino de úlcera gástrica, quanto

em modelo de colite induzida por TNBS, (ARAÚJO-SILVA, 2009; ALBUQUERQUE et al., 2020).

Citocinas, quimiocinas e seus receptores, bem como suas vias de sinalização, têm sido apontadas como de fundamental importância no desenvolvimento da dor neuropática periférica induzida por quimioterapia (DNPIQ), condição de vasta prevalência e que impõe grandes desafios à prática clínica oncológica (WANG e LEHKY, 2012). Portanto, o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e/ou tratamento desta condição clínica se tornam cada vez mais importantes.

Nesse contexto, considerando o efeito antitumoral e anti-inflamatório da fração P1G10, propomos que em modelo de tumor mamário murino 4T1, a fração possa modular a nocicepção neuropática induzida pelo quimioterápico citotóxico PTX. Assim sendo, a associação dos dois agentes (PTX e P1G10) poderia potencializar o efeito antitumoral, que não é objetivo deste estudo, prevenir e/ou modular efeitos adversos do PTX, como a dor neuropática periférica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antinociceptivo da fração proteolítica P1G10 do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre a dor neuropática periférica induzida pelo quimioterápico paclitaxel (PTX).

3.2. Objetivos específicos

Em camundongos BALB/c fêmeas:

- Definir o modelo de dor neuropática periférica induzida pelo quimioterápico PTX
- Avaliar os efeitos de P1G10 sobre:
 - a nocicepção induzida pelo PTX;
 - a possível neurotoxicidade induzida pelo PTX nos gânglios da raiz dorsal da medula;
 - a possível axonopatia induzida pelo PTX nos nervos ciáticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material:

4.1.1 Biológicos

Fração proteolítica P1G10, obtida do látex exsudado de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinamarcensis* originários do Chile (Exsicata n°15063, depositada na Universidad de La Serena, Chile), fornecido pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c de 8-12 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 g, adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO), ICB, UFMG. O protocolo experimental utilizando animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA) da UFMG, protocolo n° 106/2019. Os animais foram alojados em gaiolas e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da UFMG, sob um ciclo de 12 horas claro/escuro (luzes acesas às 7 horas da manhã) e temperatura controlada ($28 \pm 1^\circ\text{C}$). Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*, exceto durante a avaliação comportamental.

4.1.2 Fármacos utilizados

Paclitaxel (Taxol®, Ontax®) – Libbs Farmacêutica Ltda., Embu das Artes, São Paulo, Brasil.

Quetamina (Cetamin®) - Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, São Paulo, Brasil.

Xilasina (Dopaser®) - Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Catalunha, Espanha.

4.1.3 Reagentes

Ácido acético glacial (P.A.), cloreto de sódio (NaCl P.A.) – **Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil.**

Álcool etílico absoluto – **EMFAL Especialidades Químicas – Betim, Minas Gerais, Brasil.**

Fosfato monobásico e bibásico de sódio (P.A.), aldeído fórmico – **Merk, Darmstadt, Alemanha.**

Hematoxilina, alúmen de potássio, óxido vermelho de mercúrio, eosina Y, bicromato de potássio, solução de ácido pícrico – **Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA.**

Parafina e xilol para histologia - **Sciavicco Comércio e Indústria Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil.**

4.1.4 Soluções

Solução NaCl a 0,9%

NaCl	0,90 g
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

A solução é esterilizada por autoclavação a 120° C durante 40 minutos.

Álcool 70%

Álcool absoluto (99,3° INPM)	705,00 mL
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

Formol tamponado neutro a 10 %

Aldeído fórmico.....	100,00 mL
Fosfato de Sódio Monobásico.....	4,00 g

Fosfato de Sódio Bibásico.....	6,50 g
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

Solução corante - Hematoxilina de Harris

Hematoxilina cristalizada.....	25,00 g
Álcool 95%.....	250,00 mL
Alúmen de potássio.....	500,00 g
Ácido Acético Glacial	200,00 mL
Óxido vermelho de mercúrio.....	12,50 g
Água destilada q.s.p.....	5,00 L

A solução é filtrada em papel filtro quantitativo com porosidade de 8 µm

Solução corante - Eosina de Putt (amarela)

Eosina	20,00 g
Bicromato de potássio.....	10,00 g
Solução aquosa saturada de ácido pícrico.....	200,00 g
Álcool absoluto.....	200,00 mL
Ácido acético.....	1,00 mL
Água destilada q.s.p.....	1,60 L

A solução é filtrada em papel filtro quantitativo com porosidade de 8 µm

Solução aquosa saturada de ácido pícrico

Ácido Pícrico.....	1,50 g
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

4.1.5 Equipamentos

Hot/Cold plate 35100 – **UGO BASILE S.R.L. Biological Research Apparatus, Varese, Itália.**

Refrigerador ajustado à temperatura de + 4°C; freezer à temperatura de – 20°C - **Consul-Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.**

Balança analítica Toledo – **Gehaka Eletro-Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, Brasil.**

Capela com fluxo laminar de ar ultra-filtrado - **Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil.**

Lupa binocular, lente de 1,6x e aumentos de 10x e 20x – **Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.**

Criostato, modelo Leica, CM1520 – **Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois, EUA.**

Microscópio óptico, modelo BX41, com sistema de captura de imagens (Programa de captura de images Q-capture), acoplado ao computador - **Olympus Corporation, New York, EUA.**

4.1.6 Softwares

Software ImageJ versão 1.5i – **National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA.**

Software GraphPad Prism versão 7 – **GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA.**

Softwares R - **R Core Team, 2016.**

4.1.7 Diversos

Agulhas e seringas descartáveis – **Labor Import Ltda., Osasco, São Paulo, Brasil**

Lâminas 26,0 x 76,0mm - **Precision® Glass Line, China.**

Lamínulas – **Sigma- Aldrich, Steiheim, Alemanha**

Material cirúrgico (seringas, pinças, tesouras e porta-agulhas) – **Procare – Cirúrgica, Belo Horizonte, MG.**

Papel filtro quantitativo em círculos de 90 mm de diâmetro, de porosidade de 8 µm - **Whatman®, Merk, Darmstadt, Alemanha.**

Pipetas graduadas – **Pyrex®, Cidade do México, México.**

Tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 ml de capacidade e dotados de tampas rosqueável – **Quimex Corning Incorporated, New York, NY, EUA.**

4.2. Métodos:

4.2.1. Obtenção da fração P1G10 do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*

Para a obtenção da fração proteolítica foram realizadas incisões na superfície do fruto imaturo e coletou-se o látex que foi, em seguida liofilizado. Por meio da técnica de separação cromatográfica em coluna Sephadex G10, foram obtidos dois picos, denominados P1G10 e P2G10, conforme descrito por Teixeira et al., (2008) (Apêndice A). A fração proteolítica P1G10 utilizada neste projeto, se encontrava armazenada à -20°C (6,05 g). No momento do uso, foi diluída em solução fisiológica 0,9% na concentração de interesse.

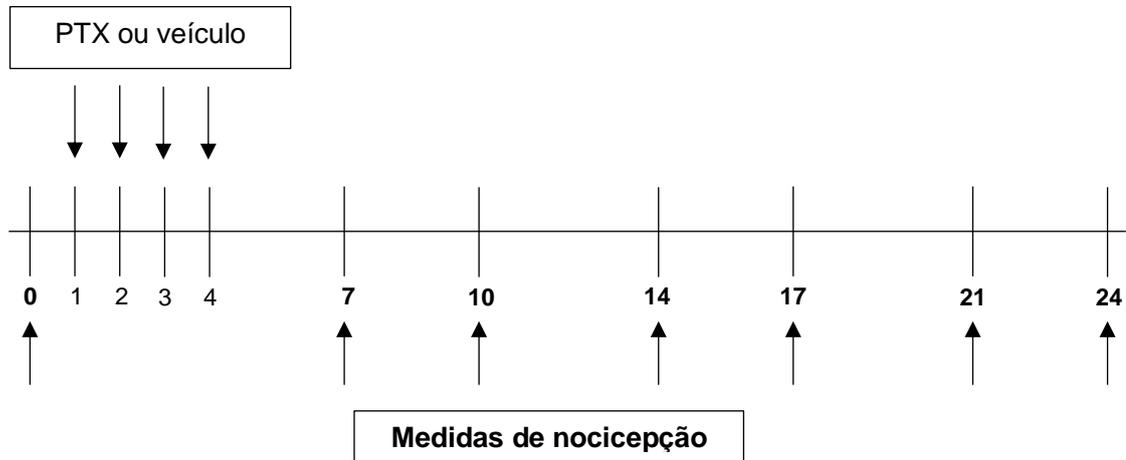
4.2.2. Ensaio biológicos comportamentais

4.2.2.1 Definição do modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico (DNPIQ) – testes Hot Plate e Cold Plate

Os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais: controle-veículo (solução salina) e paclitaxel (PTX) na dose de 8 mg/kg. As injeções de PTX ou de seu veículo (solução salina) foram realizadas por via intraperitoneal (*i.p.*), por 4 dias consecutivos (TOMA et al., 2017 – adaptado, Figura 5) e a avaliação da nocicepção foi realizada por meio dos testes Hot Plate (PARVATHY e MASOCHA, 2013) e Cold Plate (MASOCHA e PARVATHY, 2016 - adaptado).

Os testes foram realizados de forma cega, no período entre 7am - 12pm, sendo os animais ambientados sobre a superfície da placa, à temperatura ambiente, por 2 dias antes do início dos tratamentos. No momento dos testes, os animais foram colocados individualmente sobre a placa e contidos por um aparato de vidro. A temperatura da placa foi ajustada em $55 \pm 1^\circ\text{C}$, para a avaliação pelo Hot Plate e em $2 \pm 1^\circ\text{C}$, para a avaliação pelo Cold Plate. A latência de retirada, estabelecida como agitação, tremor ou lambida da pata, foi considerada indicativo de nocicepção e um *cut off* de 20 e 60 segundos para o Hot Plate e o Cold Plate, respectivamente, foi estabelecido, no intuito de evitar danos teciduais à pata do animal. A hipersensibilidade térmica foi avaliada antes da primeira injeção de veículo ou de PTX, para caracterização da resposta basal, e nos 7°, 10°, 14°, 17°, 21°, e 24° dias após o primeiro tratamento. O resultado considerado foi a média das três medidas realizadas no animal, intervaladas por um período de 60 minutos.

Figura 5: Esquema do protocolo para definição do modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico (DNPIQ).

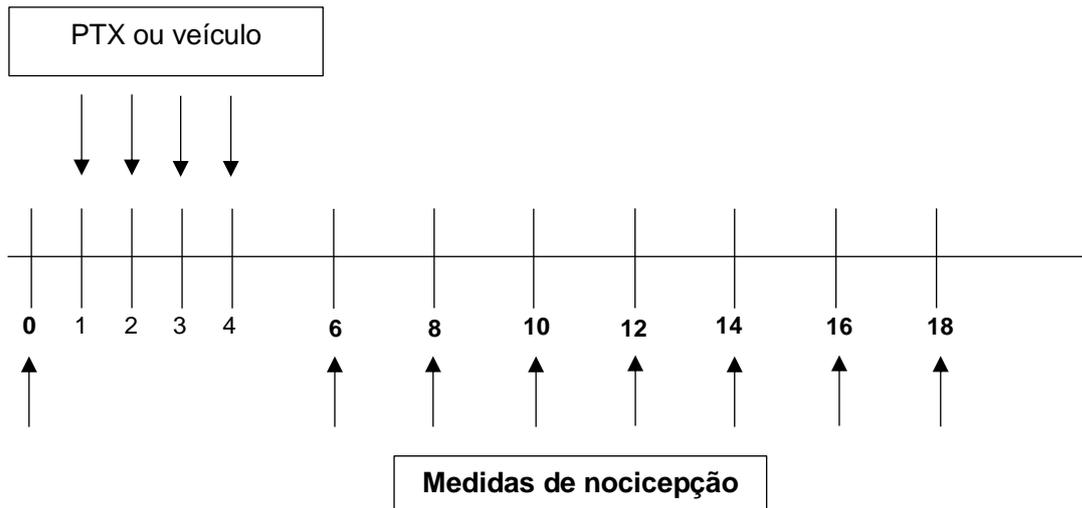


Representação esquemática do protocolo para definição do modelo de DNPIQ. As setas superiores representam a administração intraperitoneal (*i.p.*) do quimioterápico PTX ou de seu veículo (solução salina), enquanto as setas inferiores representam as medidas de nocicepção pelos métodos Hot Plate e Cold Plate.

4.2.2.2 Indução da nocicepção por PTX - alodinia fria

A avaliação da nocicepção ao estímulo térmico, nos experimentos subsequentes, foi realizada por meio do método Cold Plate (MASOCHA e PARVATHY, 2016 - adaptado). Os animais foram distribuídos nos grupos: controle-veículo (solução salina) e paclitaxel (PTX) na dose de 8 mg/kg. As injeções de PTX ou de seu veículo (solução salina) foram realizadas por via intraperitoneal (*i.p.*), por 4 dias consecutivos (TOMA et al., 2017 – adaptado, Figura 6) e a hipersensibilidade térmica foi avaliada antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal e nos 6°, 8°, 10°, 12°, 14°, 16° e 18° dias após o primeiro tratamento.

Figura 6: Esquema do protocolo para indução da alodinia fria por PTX.

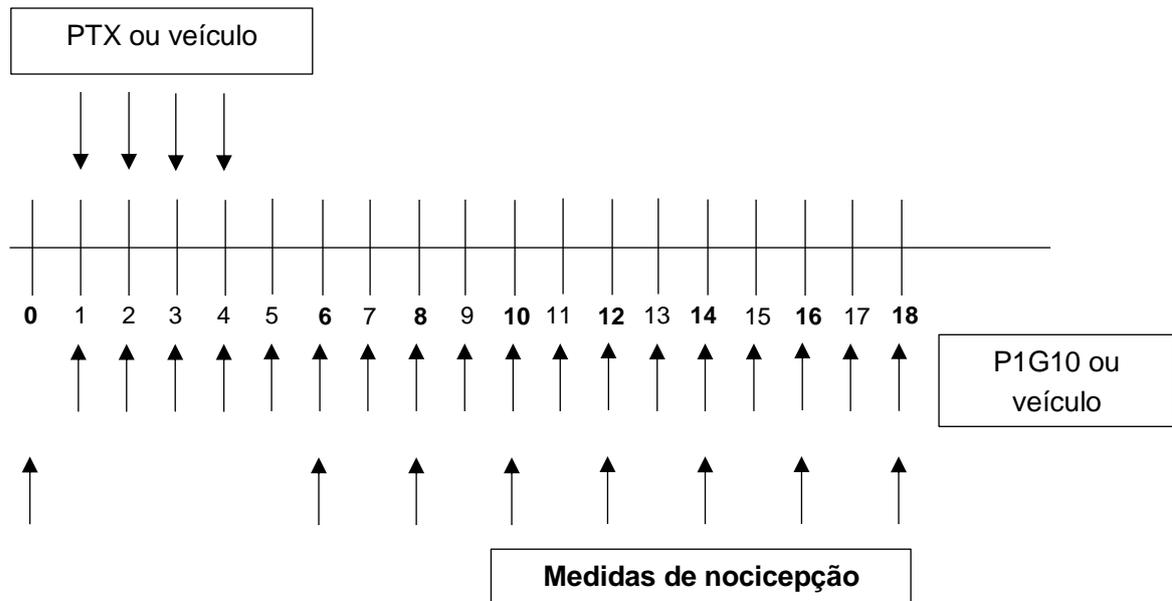


Representação esquemática do protocolo para indução da alodinia fria por PTX. As setas superiores representam a administração intraperitoneal (*i.p.*) do quimioterápico PTX ou de seu veículo (solução salina), enquanto as setas inferiores representam as medidas de nocicepção pelo método Cold Plate.

4.2.2.3 Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 sobre a alodinia fria induzida por PTX

A avaliação do efeito antinociceptivo da fração proteolítica P1G10 do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* foi realizada com a divisão dos animais nos seguintes grupos: controle-veículo; paclitaxel (PTX) na dose 8,0 mg/kg; P1G10 nas doses de 5 mg/kg, 3 mg/kg ou 1 mg/kg, na presença ou ausência da indução por PTX. A administração de P1G10 ou de seu veículo (solução salina), por via subcutânea (*s.c*) foi diária, teve início juntamente à administração de PTX (*i.p.*) e foi continuada por um período de 18 dias (Figura 7).

Figura 7: Esquema do protocolo para avaliação do efeito antinociceptivo da fração P1G10 sobre a alodinia fria induzida por PTX.



Representação esquemática do protocolo para avaliação do efeito antinociceptivo da fração P1G10 sobre a alodinia fria induzida por PTX. As setas superiores representam a administração intraperitoneal (*i.p.*) do quimioterápico PTX ou de seu veículo (solução salina), enquanto a primeira fileira de setas inferiores representa a administração subcutânea (*s.c.*) de P1G10 ou de seu veículo (solução salina). A segunda fileira de setas inferiores representa as medidas de nocicepção, pelo método Cold Plate.

4.2.3. Avaliações morfológicas

4.2.3.1 Dissecção do gânglio da raiz dorsal (GRD) da medula espinal

Após a eutanásia (dias 12 e 18), os animais foram posicionados em decúbito ventral e tiveram a pele rebatida na região dorsal, sobre a coluna, para remoção das vértebras de L2 a L5. Em seguida, a medula espinal foi ejetada, por meio de injeção de solução fisiológica 0,9%, estéril, com o auxílio de uma seringa. O tecido foi, então, dissecado sob visualização em lupa binocular. Em seguida, os gânglios da raiz dorsal foram obtidos dos segmentos de L2 a L5 e imersos em formol tamponado a 10%.

4.2.3.2. Dissecção do nervo ciático (NC)

Após a eutanásia (dias 12 e 18), os animais foram posicionados em decúbito lateral. O acesso caudo-lateral à coxa foi realizado por incisão abrangendo a pele, o tecido subcutâneo e o plano muscular, entre o músculo vasto lateral e o músculo bíceps femoral, com exposição do nervo ciático. Uma vez exposto, esse foi dissecado, extraído com secções nas extremidades proximal e distal e imerso em formol tamponado a 10 %.

4.2.3.3. Preparo e análise dos cortes em lâminas

Os GRD e NC dos animais, após fixação em formol tamponado a 10% por 24 horas, foram imersos em álcool a 70%. Em seguida, esses foram incluídos em parafina, cortados a 4 µm e montados sobre lâminas de vidro. Os cortes histológicos foram processados e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), conforme descrito por Wissowzky (1876).

As análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional (Olympus – BX41) e as imagens foram capturadas em objetivas de 10x, 40x ou 60x. Os códigos das seções foram mascarados antes do exame, de modo que o examinador, patologista experiente e independente, não tivesse conhecimento do tratamento administrado ao animal examinado. Ao microscópio óptico observou-se a estrutura das células neuronais e possíveis sinais de lesão, como pontos de degeneração hidrópica (edema intracelular). Os neurônios e as células periféricas que formam os tecidos, foram contados um a um, por meio do software Image J, nas imagens capturadas em objetivas de 40 e 60x. Além disso, foi realizada a medida da área total do nervo ciático, por meio do mesmo software, nas imagens capturadas em objetiva de 10x.

4.2.4 Análises Estatísticas

Análise descritiva foi utilizada com a finalidade de compreender as características da amostra, expressa por meio de medidas de tendência central e de dispersão. Dados com distribuição normal foram expressos em valores médios seguidos do desvio padrão e os dados que não seguiram a distribuição Gaussiana foram expressos em valores medianos seguidos dos primeiro e terceiro quartis.

A técnica ANOVA no modelo fatorial foi utilizada para comparar a diferença entre as médias das latências de resposta ao longo do tempo. As comparações múltiplas foram realizadas pelo *post-hoc* Tukey. A qualidade da técnica foi determinada pela avaliação da normalidade dos resíduos (Teste Anderson Darling) e pela análise da homocedasticidade (Teste de Levene). Em todas as situações experimentais, o tamanho da amostra garantiu graus de liberdades suficientes à análise residual envolvendo planejamento experimental no modelo fatorial.

A ANOVA fatorial foi utilizada na comparação das latências de resposta dos animais submetidos ao teste Cold Plate, nos protocolos envolvendo P1G10 (5 mg/kg), P1G10 (3 mg/kg) e P1G10 (1 mg/kg), ao longo de 18 dias. Para atender aos requisitos da ANOVA, no protocolo P1G10 (5 mg/kg) a análise dos resíduos padronizados foi utilizada para investigar possíveis “outliers” e a transformação logaritmo natural foi necessária para estabilizar a variância.

O teste de Friedman foi utilizado para comparar as medianas das latências dos animais submetidos à técnica Hot Plate, seguido do *post-hoc* LSD.

Em função da perda de tecidos do nervo ciático, a extensão do teste da mediana foi utilizada, para avaliar os valores medianos do número de neurônios e de células periféricas e da área total do nervo, nos dias 12 e 18. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste exato de Fisher.

O nível de significância de 5% foi utilizado em todos os testes para a rejeição da hipótese nula. Os *softwares* R (R Core Team, 2016) e o Graph Pad Prism 7 foram utilizados para a realização das análises.

5. RESULTADOS

Para avaliar o efeito da fração proteolítica P1G10 sobre a dor neuropática periférica induzida por quimioterápico (DNPIQ), inicialmente, foi definido o modelo de estudo para a nocicepção induzida por paclitaxel (PTX), para, na sequência, determinar a atividade antinociceptiva. Com o intuito de avaliar possíveis alterações morfológicas decorrentes dos tratamentos, foram realizadas análises histológicas de estruturas nervosas envolvidas na nocicepção, como o gânglio da raiz dorsal (GDR) da medula espinhal e o nervo ciático (NC).

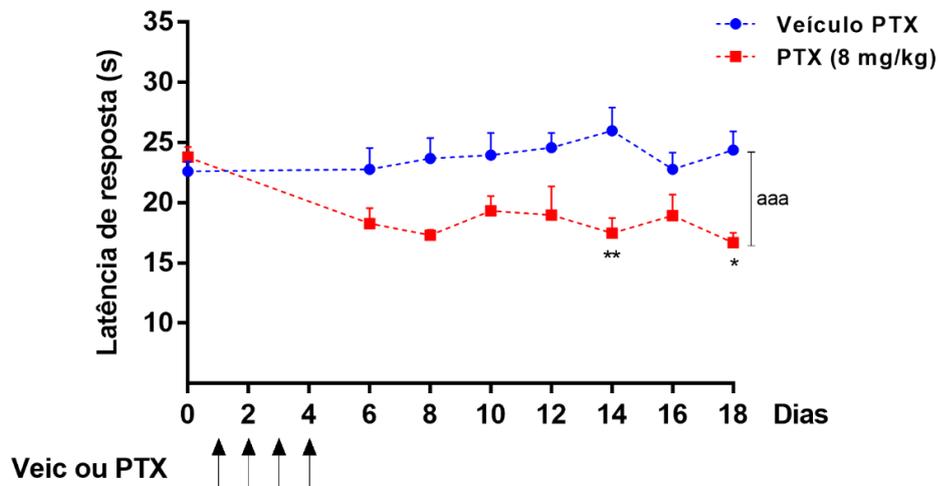
5.1. Indução da nocicepção por paclitaxel (PTX)

Com o intuito de reproduzir modelos de nocicepção induzida por quimioterápico, os animais receberam 4 injeções diárias consecutivas de PTX, na dose de 8 mg/kg, por via intraperitoneal (*i.p.*), resultando em uma dose cumulativa de 32 mg/kg. Foram realizados experimentos comportamentais piloto tanto para a nocicepção induzida pelo estímulo térmico quente (Hot Plate), quanto para o estímulo térmico frio (Cold Plate). No teste Hot Plate, os animais que receberam PTX apresentaram queda na latência de resposta a partir do 7º dia de tratamento, que se manteve até o 14º dia, seguido de aumento da latência após esse período. Entretanto, os dados obtidos por meio desse método não seguiram a distribuição Gaussiana (normal), o que exigiu a utilização de um teste não paramétrico para as análises estatísticas - Teste de Friedman, *post-hoc* LSD (resultados - Apêndice B). Já com o teste comportamental Cold Plate obtivemos dados que seguem a distribuição normal e mostramos diferenças significativas nas latências de resposta entre os tratamentos - controle vs PTX ($p < 0,05$; ANOVA fatorial, pós-teste Tukey) (resultados - Apêndice B). Assim, esse método foi o escolhido para dar sequência ao estudo, com algumas adequações, como o período de tratamento e de medidas. Os resultados, descritos a seguir, foram realizados, então, com protocolos que incluem um menor intervalo entre as medidas (dias alternados) e por um período total de 18 dias.

Assim, em novo teste de Cold Plate, por todo o período de avaliação, as médias das latências de resposta dos animais tratados com PTX foram menores quando comparadas às do grupo controle ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença

significativa entre os dias ou interação entre o tratamento e o dia, assim como, entre as médias, ao longo do tempo, dentro do grupo controle ou do tratado com PTX. Comparações ponto a ponto, mostram que o decréscimo no limiar nociceptivo com a administração do PTX (alodinia fria) foi mais evidente no 14° ($p < 0,01$) e no 18° dias de tratamento ($p < 0,05$), em comparação ao grupo controle (ANOVA fatorial, pós-teste Tukey; Figura 8). As figuras representativas da distribuição dos dados dos animais submetidos ao teste Cold Plate tratados com veículo de PTX (salina) e PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias), ao longo do tempo encontram-se no Apêndice C.

Figura 8. Efeito nociceptivo do paclitaxel (alodinia fria) na pata de camundongo.



Animais BALB/c fêmeas (n= 14 animais) foram divididos entre os grupos veículo de PTX (salina) e PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias, *i.p.*). Foram realizadas medidas de nocicepção antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal e nos 6°, 8°, 10°, 12°, 14°, 16° e 18° dias após o primeiro tratamento. Diferenças estatisticamente significativas entre Veículo PTX (salina) vs PTX ^{aaa} $p < 0,001$. Comparação ponto a ponto: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA fatorial, pós- teste Tukey).

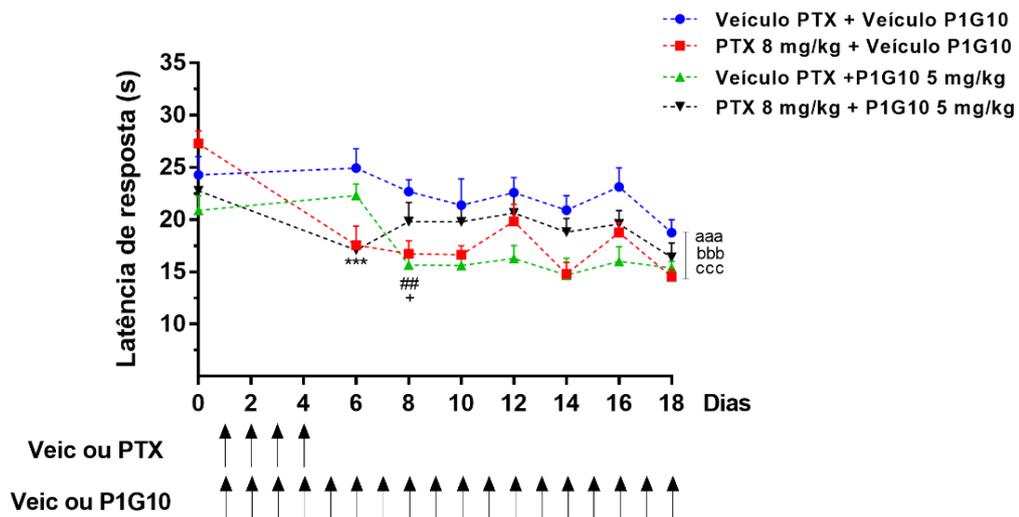
5.2. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 frente à alodinia fria induzida por PTX

Utilizando o modelo acima definido, a partir do 1° dia da administração do quimioterápico PTX os animais foram tratados diariamente, por 18 dias, com P1G10, em três diferentes doses (*s.c.*), com a indução nociceptiva por PTX ou solução salina (controle negativo, *s.c.*). No estudo com a maior dose (5 mg/kg), a média das latências de resposta dos animais tratados com veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10

(salina) foi maior quando comparada à média dos animais tratados com: (1) PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10, (2) veículo de PTX + P1G10 (5 mg/kg) e (3) PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (5 mg/kg) ($p < 0,001$). A média das latências de resposta dos animais tratados com veículo de PTX (salina) + P1G10 (5 mg/kg) foi menor quando comparada à média dos animais tratados com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (5 mg/kg) (ANOVA fatorial, pós-teste Tukey; Figura 9).

Diante desses resultados, optamos por avaliar o efeito antinociceptivo de doses menores de P1G10 (3 ou 1 mg/kg), com o intuito de minimizar o efeito indutor de alodinia observado pelo tratamento com a fração. As figuras representativas da distribuição dos dados mostrados na Figura 9 encontram-se no Apêndice D.

Figura 9. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 (5 mg/kg) na alodinia fria induzida por paclitaxel.

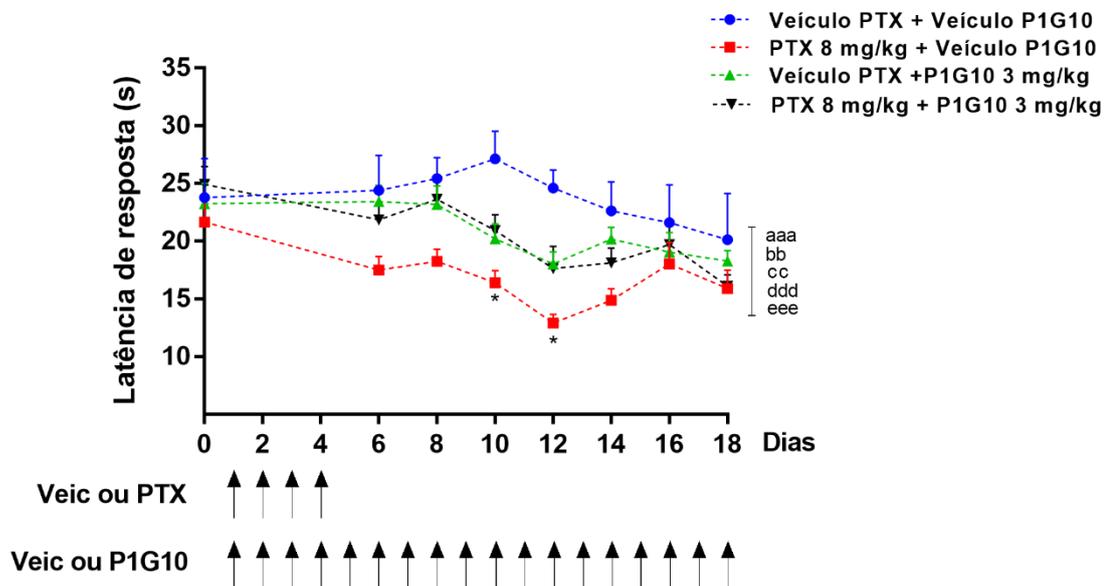


Animais BALB/c fêmeas ($n = 29$ animais) foram divididos em 4 grupos. Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (18 dias) tiveram início no 1º dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º e 18º dias após o 1º dia de tratamento. Diferenças estatisticamente significativas: Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina) ^{aaa} $p < 0,001$; Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + P1G10 (5 mg/kg) ^{bbb} $p < 0,001$; Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs Veículo PTX (salina) + P1G10 (5 mg/kg) ^{ccc} $p < 0,001$. Comparação ponto a ponto: Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina), ^{***} $p < 0,001$; Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs Veículo PTX (salina) + P1G10 (5 mg/kg), ^{##} $p < 0,01$; veículo PTX (salina) + P1G10 (5 mg/kg) vs PTX (8 mg/kg) + P1G10 (5 mg/kg), ⁺ $p < 0,05$ (ANOVA fatorial, pós-teste Tukey).

De modo geral, animais que receberam P1G10 (s.c.) na dose de 3 mg/kg apresentaram uma menor média nas latências de resposta quando comparados ao

grupo veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina) (controle), ($p < 0,01$). A queda no limiar apresentada não foi tão evidente quanto a queda estatisticamente significativa, evidenciada pelo uso do PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 ($p < 0,001$), que teve seu pico entre o 10° e 12° dias da sua primeira administração (comparação ponto a ponto, $p < 0,05$). Animais que receberam P1G10 juntamente ao PTX apresentaram maior média nas latências de resposta, de maneira geral, quando comparados ao grupo de animais que recebeu apenas PTX ($p < 0,001$), (Figura 10). As figuras representativas da distribuição dos dados apresentados na Figura 10 encontram-se no Apêndice D.

Figura 10. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 (3 mg/kg) na alodinia fria induzida por paclitaxel.

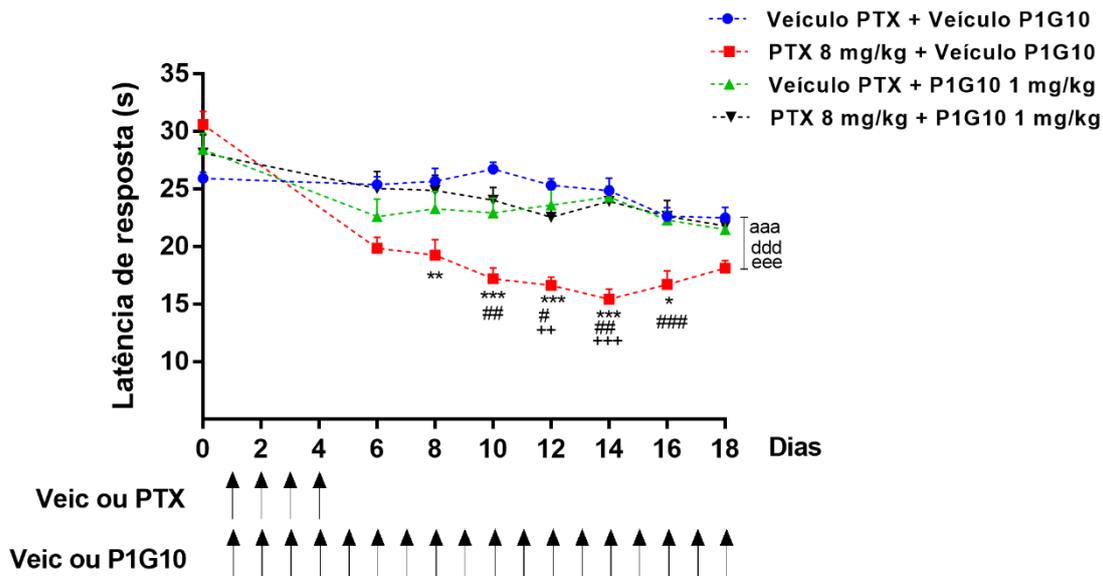


Animais BALB/c fêmeas ($n = 20$ animais) foram divididos em 4 grupos. Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (18 dias) tiveram início no 1° dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6°, 8°, 10°, 12°, 14°, 16° e 18° dias após o primeiro dia de tratamento. Diferenças estatisticamente significativas: Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina) ^{aaa} $p < 0,001$; Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + P1G10 (3 mg/kg) ^{bb} $p < 0,01$; Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs Veículo PTX (salina) + P1G10 (3 mg/kg) ^{cc} $p < 0,01$; PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 vs veículo PTX (salina) + P1G10 (3 mg/kg) ^{ddd} $p < 0,001$; PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 vs PTX (8 mg/kg) + P1G10 (3 mg/kg) ^{eee} $p < 0,001$. Comparação ponto a ponto: Veículo PTX (salina) + veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 (salina), * $p < 0,05$ (ANOVA fatorial, pós-teste Tukey).

Animais que receberam P1G10 (s.c.) na dose de 1 mg/kg apresentaram latências de resposta semelhantes às dos animais do grupo veículo de PTX (salina) +

veículo de P1G10 (salina) (controle). De modo geral, a média das latências de resposta dos animais tratados com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina) foi menor do que a média dos animais tratados com: (1) veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina); (2) veículo de PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) e (3) PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (1 mg/kg), ($p < 0,001$). Comparações ponto a ponto mostram que os animais que receberam apenas PTX apresentaram queda significativa do limiar nociceptivo a partir do 8º dia ($p < 0,01$), tiveram pico hiperalgésico entre o 10º e 14º dias ($p < 0,001$) e aumento do limiar nociceptivo após o pico, a partir do 16º dia ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. P1G10 na dose de 1 mg/kg quando administrada juntamente ao PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) foi capaz de reverter a alodinia fria causada pelo fármaco a níveis similares aos do grupo veículo de PTX + veículo de P1G10 (controle), em comparação ao grupo que recebeu apenas PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) ($p < 0,001$) (ANOVA fatorial, pós-teste Tukey; Figura 11). As figuras representativas da distribuição dos dados relacionados à Figura 11 encontram-se no Apêndice D. Tendo em vista esses resultados, optamos por utilizar a menor dose de P1G10 (1 mg/kg) para a realização das avaliações histológicas subsequentes.

Figura 11. Avaliação do efeito antinociceptivo de P1G10 (1 mg/kg) na alodinia fria induzida por paclitaxel.



Animais BALB/c fêmeas (n= 26 animais) foram divididos em 4 grupos. Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (18 dias) tiveram início no 1º dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º e 18º dias após o primeiro dia de tratamento. Diferenças estatisticamente significativas: Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina) ^{aaa} $p < 0,001$; PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 (salina) vs veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) ^{ddd} $p < 0,001$; PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg) ^{eee} $p < 0,001$. Comparação ponto a ponto: Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina) vs PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg), # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina) vs Veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg), ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ (ANOVA fatorial, pós-teste Tukey).

5.3. Avaliação histológica dos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal

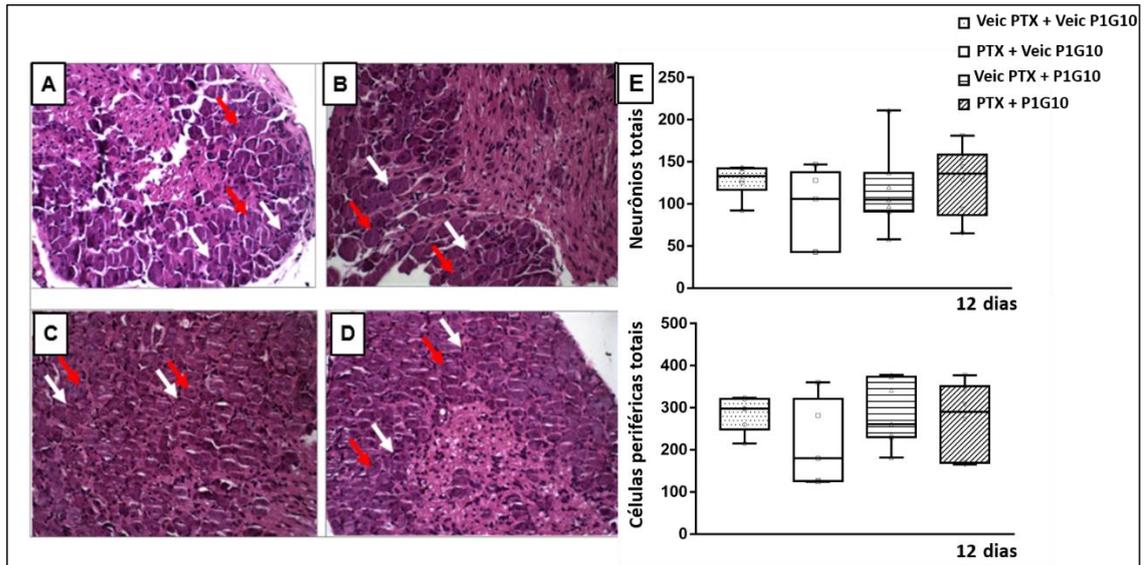
Camundongos BALB/c fêmeas receberam tratamentos com PTX e/ou P1G10 1 mg/kg, conforme descrito em métodos. Após o 12º (Figura 12) ou 18º (Figura 13) dias de tratamento os animais foram eutanasiados, os GRD da medula espinhal foram retirados e suas análises histológicas realizadas. Os cortes dos tecidos foram corados com Hematoxilina & Eosina e analisados em microscópio óptico. Não foram encontradas alterações degenerativas celulares importantes entre os diferentes grupos de tratamentos nas lâminas histológicas de GRD avaliadas.

Após 12 dias do início do tratamento com PTX, pico da alodinia apresentada no teste comportamental, a contagem da população celular de neurônios e células

periféricas totais nos GRD analisados ($n = 24$) mostra que as medianas não estão alinhadas, o que sugere diferença entre os tratamentos. Em relação ao número de células periféricas, o tratamento com veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina) – controle, apresentou maior valor mediano (298,0), enquanto que o tratamento PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 o menor valor mediano (180,0). A contagem do número de neurônios, também, mostrou maior valor mediano para o grupo controle (133,0) em relação ao grupo que recebeu apenas PTX (106,0). Entretanto não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$), ANOVA de um fator de Kruskal-Wallis por postos; Figura 12 E).

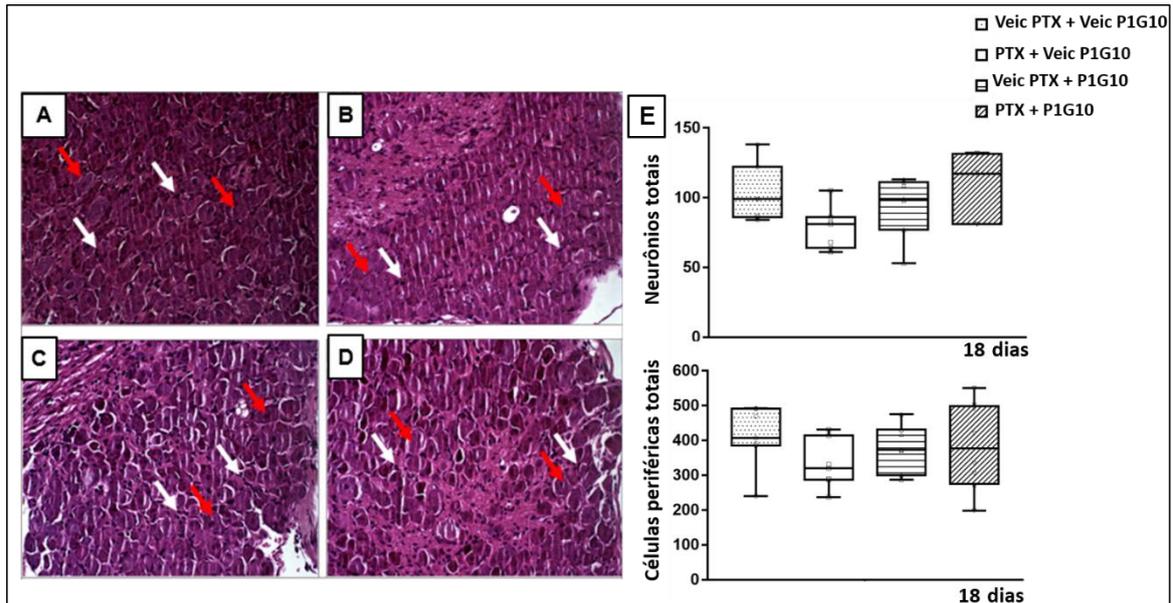
Já em relação aos 18 dias, a contagem da população celular, revelou uma tendência à diminuição do número de neurônios e de células periféricas nos GRD dos animais que receberam PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina) em comparação ao grupo veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina) – controle (valores medianos para neurônios: 74,5 PTX vs 99,00 controle; células periféricas: 305,0 PTX vs 407,0 controle). Houve, também, uma diminuição da população celular no grupo dos animais que recebeu PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina) quando comparado ao grupo que recebeu PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (1 mg/kg) (valores medianos para neurônios: 74,5 PTX vs 113,00 PTX + P1G10; células periféricas: 305,0 PTX vs 377,0 PTX + P1G10). A diferença observada para a população de neurônios ficou no limite da significância ($p = 0,047$), enquanto que para as células periféricas a diferença observada não foi significativa ($p = 0,247$, ANOVA de um fator de Kruskal-Wallis por postos; Figura 13 E). As tabelas representativas dos dados relativos às Figuras 12 e 13 encontram-se no Apêndice E.

Figura 12. Avaliação histológica de gânglios da raiz dorsal da medula espinhal após 12 dias do início dos diferentes tratamentos.



Animais BALB/c fêmeas ($n= 24$ animais) foram divididos em grupos **(A)** veículo PTX (salina) + veículo P1G10 (salina) **(B)** PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 (salina) **(C)** veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) **(D)** PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg). Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (12 dias) tiveram início no 1º dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6º, 8º, 10º, 12º dias após o primeiro dia de tratamento. A coleta do GRD dos animais para análise histológica foi realizada no 12º dia de tratamento, após eutanásia. As setas vermelhas indicam neurônios, enquanto as setas brancas indicam células periféricas. Aumento de 40X, coloração HE. **(E)** Distribuição dos dados da população celular dos gânglios da raiz dorsal. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores medianos dos diferentes grupos ($p > 0,05$) (ANOVA de um fator de Kruskal-Wallis por postos).

Figura 13. Avaliação histológica de gânglios da raiz dorsal da medula espinhal após 18 dias do início dos diferentes tratamentos.



Animais BALB/c fêmeas ($n = 29$ animais) foram divididos em grupos **(A)** veículo PTX (salina) + veículo P1G10 (salina) **(B)** PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 (salina) **(C)** veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) **(D)** PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg). Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (18 dias) tiveram início no 1º dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º e 18º dias após o primeiro dia de tratamento. A coleta do GRD dos animais para análise histológica foi realizada no 18º dia de tratamento, após eutanásia. As setas vermelhas indicam neurônios, enquanto as setas brancas indicam células periféricas. Aumento de 40X, coloração HE. **(E)** Distribuição dos dados da população celular dos gânglios da raiz dorsal. Diferenças estatísticas entre os grupos - neurônios, $p = 0,047$; células periféricas, $p = 0,247$ (ANOVA de um fator de Kruskal-Wallis por postos).

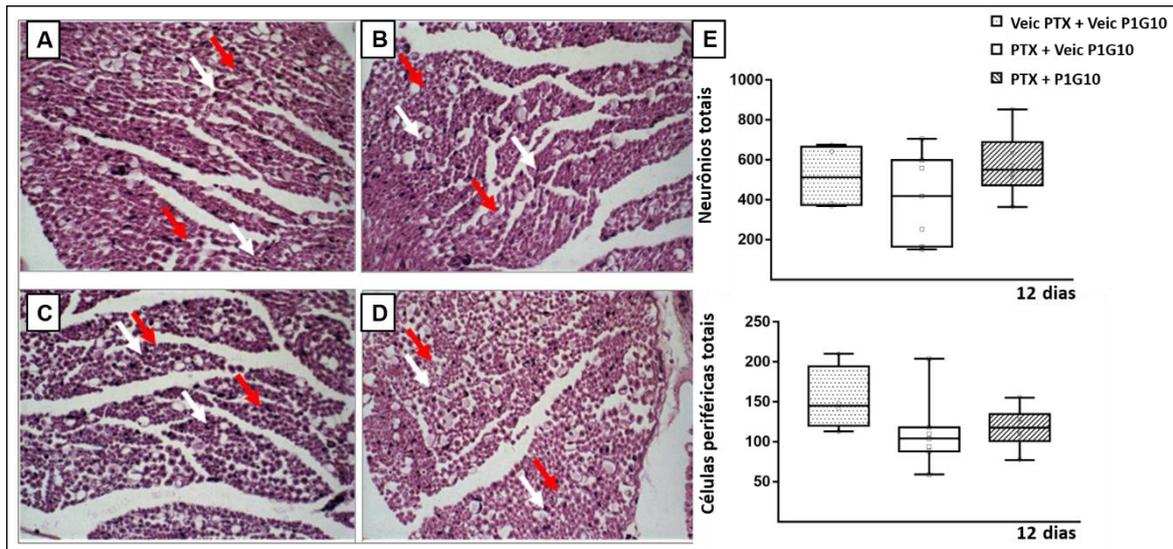
5.4. Avaliação histológica dos nervos ciáticos (NC)

As análises histológicas dos NC dos animais, tratados ou não com P1G10 1 mg/kg, foram feitas após o 12º (Figura 14) ou 18º (Figura 15) dias da primeira administração de PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias). Os cortes dos tecidos foram corados com Hematoxilina & Eosina e analisados em microscópio óptico. Não foram encontradas alterações ou sinais degenerativos celulares importantes entre os diferentes grupos de tratamentos, para ambos os períodos avaliados. Devido à perda amostral e n amostral insuficiente, em decorrência de cortes inapropriados dos tecidos, no grupo veículo PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg), esse grupo foi excluído das próximas análises estatísticas. As comparações múltiplas foram realizadas pelo

teste exato de Fisher e a técnica da extensão do teste da mediana foi realizada para avaliar se os tratamentos apresentaram mesmo valor mediano.

Na avaliação relativa a 12 dias após o início dos diferentes tratamentos, a contagem da população de células periféricas totais nos nervos ciáticos, assim como para os GRD, mostra que as medianas não estão alinhadas, o que sugere diferença entre os tratamentos. O tratamento com veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina) – controle, apresentou o maior valor mediano (145,0), enquanto que o tratamento com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina) apresentou o menor valor mediano (104,0), mostrando cerca de 30% de diminuição (Figura 14 E). No entanto, não houve diferença significativa entre os valores medianos dos tratamentos ($p > 0,05$, teste exato de Fisher). A representação das medianas que ficaram acima ou abaixo da mediana de corte (técnica da extensão do teste da mediana) encontram-se na Tab. 1.

De maneira semelhante, na contagem celular de neurônios totais nos NC, as medianas não estão alinhadas e o tratamento com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina) apresentou o menor valor mediano (419,0), enquanto que o tratamento com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (1 mg/kg) apresentou o maior valor mediano (550,0) (Figura 14 E). Nesse caso, também, não houve diferença entre os valores medianos dos tratamentos ($p > 0,05$; teste exato de Fisher). A representação das medianas que ficaram acima ou abaixo da mediana de corte (técnica da extensão do teste da mediana) encontram-se na Tab. 2.

Figura 14. Avaliação histológica de nervos ciáticos após 12 dias do início dos diferentes tratamentos.

Animais BALB/c fêmeas (n= 23 animais) foram divididos em grupos **(A)** veículo PTX (salina) + veículo P1G10 (salina) **(B)** PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 (salina) **(C)** veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) **(D)** PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg). Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (12 dias) tiveram início no 1º dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6º, 8º, 10º, 12º dias após o primeiro dia de tratamento. A coleta do nervo ciático dos animais para análise histológica foi realizada no 12º dia de tratamento, após eutanásia. As setas vermelhas indicam neurônios enquanto as setas brancas indicam células periféricas. Aumento de 60X, coloração HE. **(E)** Distribuição dos dados da população celular dos nervos ciáticos no 12º dia de tratamento.

Tabela 1. Frequência de células periféricas totais – nervo ciático (12 dias)

PTX (8 mg/kg) <i>i.p.</i>	Salina +	PTX +	PTX +
P1G10 (1 mg/kg) <i>s.c.</i>	Salina	Salina	P1G10
Abaixo da mediana	1	5	3
Acima da mediana	3	2	3

Mediana de corte = 113. Teste Exato de Fisher ($p = 0,332$)

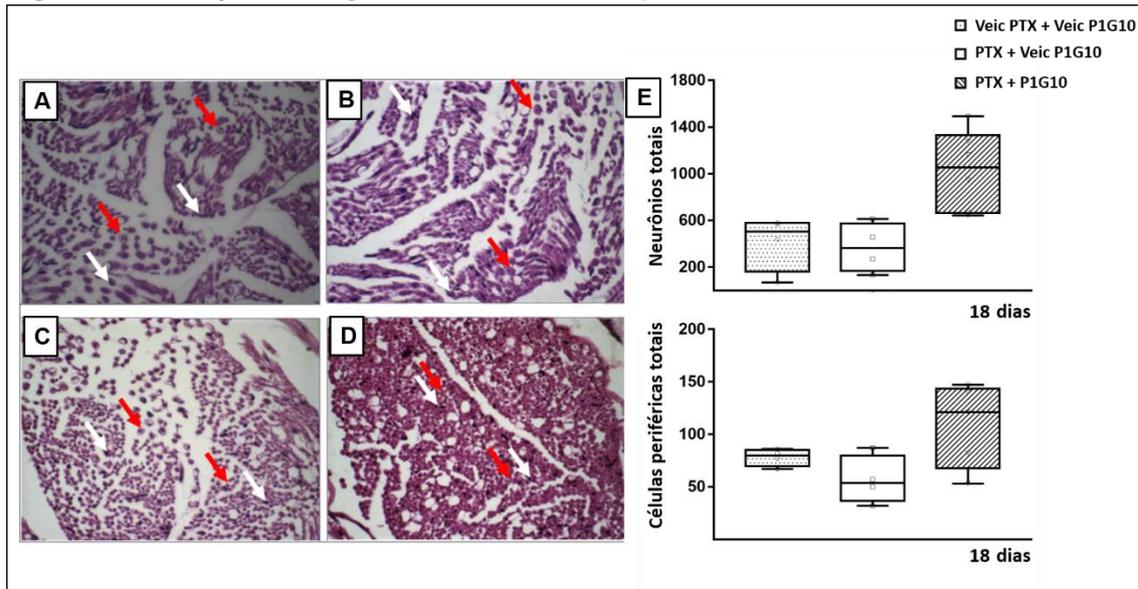
Tabela 2. Frequência dos neurônios totais – nervo ciático (12 dias)

PTX (8 mg/kg) <i>i.p.</i>	Salina +	PTX +	PTX +
P1G10 (1 mg/kg) <i>s.c.</i>	Salina	Salina	P1G10
Abaixo da mediana	2	4	3
Acima da mediana	2	3	3

Mediana de corte = 530. Teste Exato de Fisher ($p = 0,3691$)

No protocolo de avaliação de 18 dias do início dos diferentes tratamentos, na contagem da população de células periféricas totais dos nervos ciáticos, de forma análoga aos 12 dias, as medianas não estão alinhadas, o que sugere diferença entre os tratamentos. Observa-se que o tratamento que obteve maior valor mediano (121,0) foi com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (1 mg/kg), enquanto que, o menor valor mediano (53,5), foi encontrado com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina), ou seja 55% menor que o tratado com P1G10 (Figura 15 E). Da mesma forma, não houve diferença entre os valores medianos dos tratamentos ($p > 0,05$, teste exato de Fisher, Tab. 3)

Resultado semelhante foi obtido para a população celular de neurônios totais, sendo o tratamento com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (1 mg/kg) o de maior valor mediano (1056,0) e o tratamento com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina) o de menor valor mediano (364,0), mostrando uma diminuição de 65% no número dessas células (Figura 15 E). Vale ressaltar que todos os animais que receberam tratamento PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (1 mg/kg), ficaram acima do valor mediano de referência ($p < 0,01$, teste exato de Fisher, Tab. 4).

Figura 15. Avaliação histológica de nervos ciáticos após 18 dias do início dos diferentes tratamentos.

Animais BALB/c fêmeas (n= 16 animais) foram divididos em grupos **(A)** veículo PTX (salina) + veículo P1G10 (salina) **(B)** PTX (8 mg/kg) + veículo P1G10 (salina) **(C)** veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) **(D)** PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg). Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (18 dias) tiveram início no 1º dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º e 18º dias após o primeiro dia de tratamento. A coleta do nervo ciático dos animais para análise histológica foi realizada no 18º dia de tratamento, após eutanásia. As setas vermelhas indicam neurônios, enquanto as setas brancas indicam células periféricas. Aumento de 60X, coloração HE. **(E)** Distribuição dos dados da população celular dos nervos ciáticos no 18º dia de tratamento.

Tabela 3. Frequência de células periféricas totais – nervo ciático (18 dias)

PTX (8 mg/kg) <i>i.p.</i>	Salina +	PTX +	PTX +
P1G10 (1 mg/kg) <i>s.c.</i>	Salina	Salina	P1G10
Abaixo da mediana	3	3	2
Acima da mediana	1	1	3

Mediana = 82. Teste exato de Fisher ($p = 0,4872$)

Tabela 4. Frequência de neurônios totais – nervo ciático (18 dias)

PTX (8 mg/kg) <i>i.p.</i>	Salina +	PTX +	PTX +
P1G10 (1 mg/kg) <i>s.c.</i>	Salina	Salina	P1G10
Abaixo da mediana	4	3	0
Acima da mediana	0	1	6

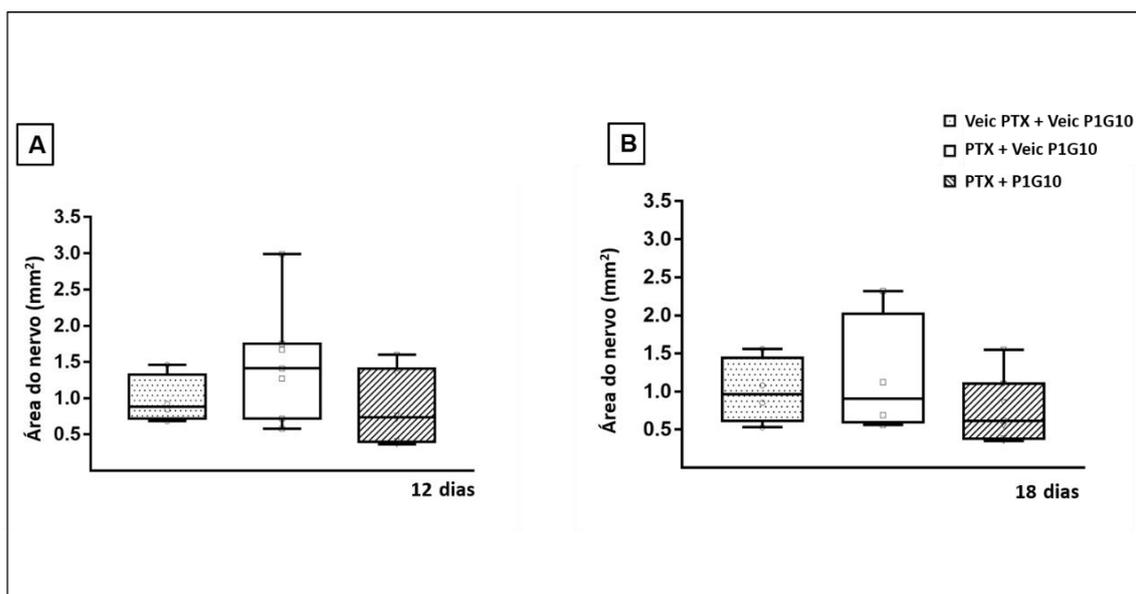
Mediana = 597. Teste exato de Fisher ($p = 0,004672$)

5.5. Avaliação da área total dos NC

No primeiro período avaliado, a área total dos NC revelou que o tratamento com PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias) + veículo de P1G10 (salina) apresentou o maior valor mediano (1,41 mm²) e o tratamento com PTX + P1G10 (1 mg/kg) o menor (0,74 mm²), cerca de 50% de diminuição (Figura 16 A). Entretanto, não houve diferença significativa entre os valores medianos dos tratamentos ($p > 0,05$, teste exato de Fisher; Tab. 5).

Aos 18 dias de tratamento a medida da área dos NC mostrou que o tratamento com PTX (8mg/ kg/dia, por 4 dias) + P1G10 (1mg/kg) foi o de menor valor mediano (0,61 mm²), enquanto que o com veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina) apresentou o maior valor (0,96 mm²) (Figura 16 B). Entretanto, não houve diferença entre os valores medianos dos tratamentos. ($p > 0,05$, teste exato de Fisher; Tab. 6).

Figura 16. Distribuição dos dados para área total dos nervos ciáticos nos 12^o e 18^o dias do início dos diferentes tratamentos.



Animais BALB/c fêmeas (n= 41 animais) foram divididos em 4 grupos. Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (12 ou 18 dias) tiveram início no 1^o dia experimental. As medidas de nocicepção foram realizadas antes da primeira injeção (resposta basal) e nos 6^o, 8^o, 10^o, 12^o, 14^o, 16^o e 18^o dias após o primeiro dia de tratamento. A coleta do nervo ciático dos animais para análise histológica foi realizada no 12^o e no 18^o dia de tratamento, após eutanásia. **(A)** Coleta do nervo ciático dos animais para análise da área no 12^o dia de tratamento **(B)** Coleta realizada no 18^o dia de tratamento.

Tabela 5. Frequência da área do nervo ciático (12 dias)

PTX (8 mg/kg) <i>i.p.</i>	Salina +	PTX +	PTX +
P1G10 (1 mg/kg) <i>s.c.</i>	Salina	Salina	P1G10
Abaixo da mediana	3	2	4
Acima da mediana	1	5	2

Mediana de corte = 0.92. Teste exato de Fisher ($p = 0,2308$)

Tabela 6. Frequência da área do nervo ciático (18 dias)

PTX (8 mg/kg) <i>i.p.</i>	Salina +	PTX +	PTX +
P1G10 (1 mg/kg) <i>s.c.</i>	Salina	Salina	P1G10
Abaixo da mediana	2	2	4
Acima da mediana	2	2	3

Mediana = 0,85. Teste exato de Fisher ($p = 1$)

6. DISCUSSÃO

Em vista da propriedade anti-inflamatória da fração proteolítica do látex do fruto de *Vasconcellea cundinamarzensis*, P1G10, que inclui em seu mecanismo de ação a modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias (FREITAS et al., 2019; ALBUQUERQUE et al., 2020), neste trabalho nos propusemos a investigar o seu efeito protetor e/ou modulador na dor neuropática periférica induzida por paclitaxel (PTX). Vários estudos têm demonstrado a importância da inflamação no estabelecimento e na manutenção da dor neuropática periférica induzida por quimioterápico (DNPIQ), tornando-se essa um possível e interessante alvo terapêutico (WANG e LEHKY, 2012).

O PTX foi escolhido em detrimento de outros quimioterápicos pelo fato de ser um dos principais taxanos utilizados no tratamento de uma variedade de tumores sólidos, incluindo as neoplasias de ovário e de mama. As evidências suportam que o uso semanal do fármaco tem eficácia e tolerabilidade superiores no tratamento de câncer de mama em estágio inicial e metastático (SEIDMAN et al., 2008, SPARANO et al., 2008, GREIMEL et al., 2011). Além disso, também é sugerido que esse quimioterápico seja um dos principais causadores da DNPIQ, colocando em risco o tratamento e a sobrevivência dos pacientes, mostrando-se ideal para a reprodução desse modelo de dor (REYES-GIBBY et al., 2009, MO et al., 2012, ARGYRIOU et al., 2014; SERETNY et al., 2014, KIM; DOUGHERTY; ABDI, 2015).

O fármaco antineoplásico é frequentemente administrado em pacientes do sexo feminino, entretanto a maioria dos estudos que abordaram a DNPIQ em modelos animais foi realizada com ratos ou camundongos machos. Homens e mulheres sentem dor de maneira diferente e respondem de formas distintas a classes específicas de fármacos analgésicos. Dessa forma, o gênero é fator crítico na modulação da experiência à dor (HWANG et al., 2012). Neste trabalho foram utilizados animais BALB/C fêmeas como modelo, com vista a trabalhos futuros, que abordem a DNPIQ quando na implantação do tumor 4T1, derivado de um tumor espontâneo de mama em camundongos BALB/cfC3H (DEXTER et al., 1978; HEPNER et al., 1978) e tratamento com PTX.

Inicialmente, foram avaliados dois modelos de nocicepção, com o intuito de definir o mais adequado para estudar o efeito antinociceptivo da fração proteolítica P1G10 sobre a DNPIQ. Polomano e colaboradores (2001), mostraram que PTX

administrado *i.p.*, em diferentes doses, produz hiperalgesia térmica ao calor significativa na cauda e nas patas traseiras dos animais tratados. Todavia, o teste piloto realizado neste trabalho, utilizando-se o método Hot Plate, não reproduziu hiperalgesia térmica importante nas patas dos animais que receberam PTX, uma vez que os valores de latência de resposta obtidos foram muito próximos, entre os grupos tratado e controle. Observou-se com a administração do fármaco (resultados em Apêndice B), uma queda na latência de resposta dos animais, que teve início no 7º dia de tratamento e que se manteve até o 14º dia, seguida de uma subida a partir deste período. De forma semelhante, Parvathy e Masocha (2013), por meio do mesmo teste comportamental, mostraram que os animais BALB/c fêmeas que receberam tratamento com PTX, apresentam redução no tempo de latência de reação ao estímulo térmico, com pico hiperalgésico no 7º e no 10º dias de tratamento. Entretanto, os resultados obtidos com o Hot Plate, aqui apresentados, mostram heterogeneidade amostral importante e não se obteve normalidade dos dados (distribuição normal), o que retrata a dificuldade de validação da técnica, justificando assim, a exclusão desse método para o estudo.

Estudo com regime de tratamento quimioterápico similar, mostra que animais tratados com PTX desenvolvem, também, alodinia fria, evidenciada pela redução na latência de reação no teste da placa fria (Cold Plate) (MASOCHA e PARVATHY, 2016). No teste piloto no qual se utilizou o método Cold Plate, realizado por um período de 24 dias, observamos que, de maneira geral, a média de latência do grupo tratado com PTX foi menor quando comparada à média do grupo controle, com pico hiperalgésico no 10º dia de tratamento. Os dados seguiram distribuição normal e foram observados efeitos de interação (tratamento e dia). Assim, optamos por continuar as avaliações seguintes utilizando o Cold Plate. Ademais, a literatura aponta que animais tratados com PTX apresentam alodinia mecânica acentuada, alodinia fria e hiperalgesia mecânica, mas pouca ou nenhuma hiperalgesia térmica ao calor, o que reforça a escolha pelo método (POLOMANO et al., 2001; PETERS et al., 2007; MASOCHA e PARVATHY, 2016). Em relação ao período de tratamento, uma vez que as latências de resposta dos animais tratados com PTX não variaram de maneira importante do 14º dia ao 21º, ajustamos os próximos protocolos para que houvesse intervalo menor entre as medidas (dias alternados) e para que fosse realizado por um período total de 18 dias.

Usualmente, pacientes que experenciam neuropatia após tratamento com o quimioterápico PTX, relatam dor intensa em queimação em resposta à aplicação de estímulos térmicos frios que são inócuos em voluntários sadios (DOUGHERTY et al., 2004; CAPONERO; MONTARROYOS; TAHAMTANI, 2016). Uma das principais ferramentas experimentais que pode ser utilizada em modelos animais, para abordagem da neuropatia induzida pelo quimioterápico, que resulta em alodinia fria, é o método Cold Plate. O teste tem como vantagens sua velocidade relativa e a sua capacidade de controle preciso da temperatura (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017), que foi ajustada para 2° C em nosso estudo. Outra vantagem do método, em comparação ao teste da acetona por exemplo é que, nesse último, as respostas evocadas podem incorporar respostas aversivas ao odor de acetona, e o controle sobre a taxa e o grau de resfriamento não é possível. Além disso, a acetona tem alta pressão de vapor e uma pequena tensão superficial, o que dificulta a aplicação de uma quantidade uniforme na pata traseira do animal (YIN et al., 2015).

Comportamentos aversivos sobre a exposição a superfícies controladas pela temperatura, como levantamento das patas, agitação, ou saltar ocorrem a temperaturas abaixo de 5°C, o que sugere que este deva ser considerado o limiar para frio nocivo em roedores. Dor fria patológica é um sintoma comum na DNPIQ e pode apresentar-se como alodinia fria, uma resposta à dor a temperaturas que normalmente não provocam dor, e/ou hiperalgesia fria, uma sensibilidade aumentada à dor por temperatura fria (YIN et al., 2015). No presente estudo, consideramos que os animais que receberam PTX, manifestaram uma alodinia fria, uma vez que essa temperatura (2°C) não provocou uma resposta de retirada reduzida nos animais do grupo controle, conforme comparação estabelecida em outro estudo (ALLCHORNE et al., 2005). Ademais, a grande maioria dos trabalhos que avaliam a DNPIQ por meio desse método, se referem à manifestação de redução da latência de resposta nessa condição como alodinia fria (RENN et al., 2011; SANNA et al., 2014; MASOCHA e PARVATHY, 2016).

Uma vez estabelecido o método, em novo ensaio com o teste Cold Plate (18 dias de tratamento), pudemos mostrar que a administração do PTX (*i.p.*), na dose de 8 mg/kg por 4 dias consecutivos, foi capaz de reduzir o limiar nociceptivo dos animais em comparação ao limiar dos animais do grupo controle, que receberam apenas veículo de PTX. A queda do limiar pôde ser observada a partir do 6° dia do início da administração do fármaco, corroborando os resultados de estudo semelhante que

utilizou o mesmo teste comportamental (MASOCHA e PARVATHY, 2016). Tal queda foi mantida por um período de 18 dias após o início do tratamento com PTX, tendo seu pico hiperalgésico no 14º dia e leve subida após esse período. O mesmo perfil foi observado por Toma et al. (2017), que demonstraram que o estabelecimento da hiperalgesia mecânica e da alodinia fria ao quimioterápico ocorrem na primeira semana de administração do fármaco e se tornam menos evidentes depois da segunda semana do tratamento.

A observação clínica dos animais durante a indução da alodinia fria por PTX revelou a ausência de alterações significativas no estado clínico, como alopecia, diarreia ou perda de peso. Tanto os animais tratados com veículo de PTX (salina) quanto os tratados com PTX, não apresentaram variações importantes no peso corporal (resultados – Apêndice F), como descrito previamente por Polomano e colaboradores (2001). A manutenção do peso dos animais corrobora os dados da literatura que suportam que os animais que recebem baixas doses contínuas do quimioterápico (diariamente) não mostram perda de peso, quando comparados àqueles que recebem a dose máxima tolerável do mesmo agente antineoplásico (20 mg/kg, semanalmente) (JIANG et al., 2010, HWANG et al., 2012, TOMA et al., 2017). Por outro lado, o tratamento com P1G10 na ausência de PTX, mostrou um aumento significativo do peso dos animais em relação aos animais do grupo controle. Ensaio com P1G10 mostraram que o tratamento com a fração melhora o estado clínico dos animais, evidenciado pelo ganho de peso. Em modelo de úlcera gástrica, houve recuperação total do peso perdido com a indução da lesão por ácido acético 10%, nos animais tratados com P1G10 (ARAÚJO-SILVA, 2009). Em modelo de colite aguda induzida por TNBS, animais tratados com P1G10 mostraram ganho de peso de 30% em relação aos não tratados com a fração (ALBUQUERQUE et al., 2020).

A avaliação da ação antinociceptiva de P1G10 sobre a nocicepção decorrente do uso do quimioterápico mostrou que a administração sistêmica (s.c.) de P1G10 impede o desenvolvimento da alodinia fria induzida por PTX. No entanto, os efeitos antinociceptivos de P1G10 foram observados apenas para a dose de 1 mg/kg, não sendo evidenciados pelas doses de 3 mg/kg e de 5 mg/kg. Contrariamente, as doses superiores de P1G10 revelaram um efeito nociceptivo, próximos àquele produzido pelo PTX, principalmente na maior dose, de 5 mg/kg.

Em outros modelos animais, a fração P1G10 mostrou atividade antitumoral entre as doses de 3 e 5 mg/kg, reduzindo a massa de tumores sólidos, como o de

Erlich (3 mg/kg – 68%) (VIANA et al., 2010) e o melanoma B16F1 (5 mg/kg - 70%) (DITZZ et al., 2015). Dessa forma, optamos por avaliar, inicialmente, a ação antinociceptiva de P1G10 em doses maiores, considerando a intenção de associar o efeito antitumoral ao efeito antinociceptivo, para que a fração pudesse ser utilizada como adjuvante ao tratamento oncológico. Todavia, durante administração s.c. de P1G10 nas doses de 3 mg/kg e 5 mg/kg os animais apresentaram lesões cutâneas no local da aplicação, que variaram de leves a moderadas. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram a existência destes efeitos tóxicos, porém para doses maiores de P1G10 (LEMOS et al., 2016). Como no presente trabalho os animais foram submetidos à administração s.c. de P1G10 por 18 dias consecutivos, acredita-se que o dano cutâneo, mostrado com as doses de 3 e 5 mg/kg, possa ter sido elemento decisivo para promover agitação e nocicepção nos animais, representando assim, um fator gerador de dúvida.

Apesar de na dose de 3 mg/kg P1G10, quando administrada juntamente ao veículo de PTX, não ter apresentado limiares nociceptivos tão baixos quanto os evidenciados pela dose de 5 mg/kg, tal limiar ainda ficou aquém do desejado. Além disso, quando administrada juntamente ao PTX, P1G10 não foi capaz de reverter a alodinia fria induzida pelo quimioterápico a níveis similares aos do grupo veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina) – controle. De maneira oposta, P1G10 na dose de 1 mg/kg mostrou efeito antinociceptivo na alodinia fria induzida por PTX e foi capaz de revertê-la em níveis próximos aos dos animais do grupo controle. Em adição, nessa dose não foram observadas lesões cutâneas, sendo esta, também, a menor dose eficaz (52% de inibição) contra o crescimento do tumor 4T1, como previamente descrito por Braga (2013).

O mecanismo pelo qual P1G10 atenua a alodinia fria nesse modelo de neuropatia periférica não é conhecido e, atualmente, é motivo de inquietação para trabalhos futuros. No entanto, uma possibilidade, em vista do que já foi descrito, é que esse efeito se deva às suas características anti-inflamatórias. No modelo de carcinoma mamário inflamatório murino 4T1, P1G10 promoveu modulação do processo inflamatório tumoral, com redução nos níveis de IL-6, MCP-1 e KC/CXCL1 (BRAGA, 2013). Albuquerque e colaboradores (2020) mostraram que P1G10 reduz os níveis de TNF α e MCP-1 (CCL-2), em modelo murino de colite induzida por TNBS, mediadores estes reconhecidos, também, por contribuírem para o estabelecimento e manutenção da DNPIQ (WANG e LEHKY, 2012).

Em modelos de nocicepção por constrição crônica do nervo ciático, foram constatados efeitos benéficos da bromelina (mistura de cisteíno proteases derivadas do abacaxi), que incluiu a reversão da hiperalgesia térmica decorrente da constrição nervosa (BAKARE e OWOYELE, 2020). A bromelina também mostrou potencial efeito em outros modelos inflamatórios. Em ensaio *in vitro*, realizado com biópsias do cólon de pacientes com colite ulcerativa, o tratamento com a bromelina foi capaz de reduzir, de forma significativa, níveis de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias (ONKEN et al., 2008). Um dos mecanismos propostos para a ação anti-inflamatória da bromelina se refere a sua capacidade de remover moléculas da superfície celular, algumas das quais, como CD128, que constituem o receptor para IL-8, quimiocina que regula a atividade de neutrófilos e a quimiotaxia para sítios inflamatórios. Sabidamente, como consequência da inibição da migração de neutrófilos, há uma diminuição da resposta inflamatória aguda (FITZHUGH et al., 2008). A atividade anti-inflamatória de P1G10, também, é associada à redução da atividade de MPO em modelo de colite, o que sugere uma menor presença ou uma menor ativação de neutrófilos nessa condição (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Assim como P1G10, a bromelina constitui-se de um concentrado de enzimas proteolíticas, principalmente cisteíno proteinases (HALE et al., 2005). Dadas as semelhanças bioquímicas e farmacológicas entre essas e, principalmente, em relação à sua atividade anti-inflamatória, sugerimos que essas enzimas vegetais compartilhem propriedades farmacológicas que possam ser usadas como alternativas para tratar os sintomas associados ao tratamento antineoplásico, como a DNPIQ demonstrada neste trabalho.

Quimioterápicos, como os taxanos, também são reconhecidos por induzir a regulação positiva de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) em estruturas como os GRD e os nervos periféricos (KAWASAKI et al., 2008). Em revisão sobre possíveis mecanismos subjacentes à DNPIQ, Wang e Lehky (2012) discutem o papel das MMPs na patogênese da neuropatia, que inclui a capacidade de degradação da barreira sangue nervo, a degradação da bainha de mielina e a indução de migração, infiltração e ativação de células inflamatórias nos GRD e nervos periféricos. As citocinas liberadas pelas células inflamatórias induzem hipersensibilidade dos nervos periféricos contribuindo para o quadro doloroso (KAWASAKI et al., 2008). A fração proteolítica P1G10, em modelo murino de lesão induzida por radiação UVB, mostrou, além de atividade anti-inflamatória e antioxidante, a capacidade de inibição da

metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9). A presença de P1G10 0,1% ou 1% em amostras de pele, 24 horas após irradiação UVB, foi capaz de reverter o aumento da atividade de MMP-9 ($p < 0,05$) à níveis próximos do basal (FREITAS et al., 2019). Essa capacidade de inibição de MMP poderia ser outro mecanismo pelo qual P1G10 é capaz de reduzir a nocicepção decorrente do uso do PTX, tendo em vista a participação destas proteases na indução da dor.

Em uma segunda etapa deste trabalho, foram realizadas avaliações histológicas de estruturas nervosas envolvidas na nocicepção, como os gânglios da raiz dorsal (GRD) da medula e os nervos ciáticos (NC) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, para investigar possíveis alterações patológicas envolvidas na neuropatia periférica dolorosa induzida pelo PTX e o envolvimento de P1G10 na proteção ou recuperação destes tecidos. Há evidências na literatura de que os fármacos quimioterápicos danificam diretamente a estrutura das células dos GRD e dos nervos periféricos. A administração intravenosa de PTX parece regular positivamente o marcador de lesão nervosa ATF3 (fator de ativação de transcrição 3), induzido por estímulos de estresse e danos celulares, nos neurônios do GRD, e causar alterações morfológicas nas células satélites que circundam os neurônios sensoriais dos GRD (PETERS et al., 2007). O principal mecanismo de ação do PTX consiste na sua ligação aos microtúbulos, seguida de sua estabilização, o que por sua vez interfere no transporte intracelular e axonal dependente de microtúbulos. Assim, os taxanos, por meio da agregação de microtúbulos intracelulares, afetam não apenas o corpo de neurônios sensoriais, mas também os axônios periféricos (ARGYRIOU et al., 2012).

Examinamos as estruturas (neurônios e células periféricas no GRD e NC) em dois pontos chave no curso do tempo das medidas de comportamento, após o início do tratamento com PTX: (a) 12º dia, pico da dor e (b) 18 dias, na possível estabilização do comportamento doloroso. No entanto, nossos resultados não sustentam a hipótese de que a neuropatia periférica dolorosa induzida pelo PTX esteja relacionada à degeneração axonal ou às alterações morfológicas nas estruturas periféricas, uma vez que não foram observadas alterações histopatológicas ou sinais de lesão neuronal (degeneração hidrópica) nos animais tratados com PTX, para o esquema de administração do quimioterápico estabelecido neste protocolo - 4 doses de 8 mg/Kg (dose cumulativa de 32 mg/kg). Tampouco foram observadas diferenças significativas entre as áreas dos nervos ciáticos dos diferentes grupos de tratamento.

Modelos de neuropatia induzida por PTX em roedores, revelam graus variados de degeneração axonal dependente da dose e do cronograma de tratamento. Melli e colaboradores (2006) mostraram que, para esquema de 25 mg/kg a cada dois dias, para um total de 3 doses (dose cumulativa de 75 mg/kg), ocorre degeneração axonal distal nos coxins plantares, todavia sem efeitos degenerativos no NC dos camundongos tratados por PTX, sugerindo que o fármaco cause uma axonopatia distal. Em protocolo com ratos, de 2 mg/kg de PTX, por quatro dias alternados (dose cumulativa de 8 mg/kg), mitocôndrias aumentadas e vacuolizadas foram observadas, sem qualquer outra degeneração relatada (FLATTERS e BENNETT, 2006). Já em altas doses (60 mg/kg, 3 vezes/semana, dose cumulativa de 180 mg/kg), PTX foi capaz de causar grave degeneração nos axônios dos camundongos (WANG et al., 2002). Estudo mais recente, que investigou os efeitos do PTX (30 mg/kg 3 vezes/semana por 2 semanas, dose cumulativa de 180 mg/kg) nos ramos centrais dos axônios sensoriais dos GRD, revelou que, nas medulas espinhais de camundongos, os axônios degenerados estavam presentes nas colunas dorsais, onde os ramos centrais dos axônios GRD sobem rostralmente. Também, foram observadas alterações nos nervos periféricos (NC), entretanto, as fibras mielínicas degeneradas estiveram presentes em números, significativamente, maiores em segmentos distais do que em segmentos proximais, indicando que esse modelo exhibe o padrão de degeneração distal-proximal, como o observado em distúrbios nervosos periféricos humanos (TASNIM et al., 2016).

Assim como evidenciado no presente estudo, Tasnim e colaboradores (2016) não observaram sinais de degeneração nos corpos celulares neuronais sensitivos localizados no GRD, para esquema de administração de dose cumulativa de 180 mg/kg, dose essa, muito maior que a investigada no nosso protocolo de estudo (32 mg/kg). Em contrapartida, alterações como, perfis de mielina degenerada foram encontrados em todas as áreas transversais dos NC, tanto na região proximal, quanto distal, o que não corrobora os dados encontrados no nosso estudo. Assim, tendo em vista que apenas em doses moderadamente altas do quimioterápico foram evidenciadas alterações patológicas periféricas, é possível que o esquema de administração do quimioterápico utilizado neste protocolo não tenha sido suficiente para manifestação desses sinais degenerativos.

Em estudo experimental com ratos, Jin e colaboradores (2016), também não observaram dano no NC nos animais tratados com PTX em comparação ao dano

presente no grupo diabetes induzida por estreptozotocina, que manifesta neuropatia diabética. Embora o padrão de manifestações sensoriais das diferentes neuropatias, como dor ou dormência possa ser semelhante, existem diferenças quanto aos mecanismos patogênicos, grau de danos às fibras nervosas, características patológicas e gravidade ou características dos sintomas, o que dificulta o estabelecimento de um paradigma simplificado de patogênese e de mecanismos que se apliquem a todos os diferentes tipos de NP.

No protocolo de neuropatia induzida pelo quimioterápico PTX, estabelecido neste trabalho, observou-se uma tendência à diminuição da população celular do GRD nas análises histológicas, por coloração HE, podendo sinalizar neurotoxicidade referente ao uso do fármaco. Esse achado foi mais evidente no período de 18 dias após o início do tratamento, tanto no número de neurônios (que se apresentou no limite da significância) como no de células satélites nos GRD dos animais que receberam PTX em comparação ao grupo controle. Uma diminuição, também, foi percebida quando comparados os grupos de animais que receberam apenas PTX com aqueles que receberam PTX juntamente à P1G10. Diante desses resultados, pode-se inferir que o quimioterápico seja tóxico às células do GRD e que a fração atenua esse efeito deletério.

Como descrito em revisão realizada por Areti e colaboradores (2014), um dos mecanismos sugeridos para a neurotoxicidade causada pelos taxanos é devido ao seu acúmulo no SNP, principalmente no GRD, o que aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio. É sabido que os nervos de mamíferos são mais suscetíveis ao estresse oxidativo devido ao seu alto teor de fosfolípidios, por ter um axoplasma rico em mitocôndrias e por sua defesa antioxidante celular fraca. O estresse oxidativo gerado pode causar danos físicos aos neurônios, incluindo a apoptose celular. A apoptose induzida por PTX ocorre devido, principalmente, à liberação do citocromo c (Cyt c) e à desregulação do Ca^{2+} através da abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (mPTP) das mitocôndrias.

Portanto, há evidências de que o mecanismo de desenvolvimento da DNPIQ esteja relacionado ao dano mitocondrial e a um quadro de estresse oxidativo. Freitas e colaboradores (2019), em modelo murino de lesões cutâneas induzidas por UVB, mostraram que P1G10, além de promover efeitos anti-inflamatórios, apresentou uma atividade antioxidante no modelo em questão. A fração proteolítica foi capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS), de forma concentração dependente,

sendo essa ação comprovada pela mensuração da captura de radicais livres. De forma semelhante, a papaína, fração proteolítica da *C. papaya*, é reconhecida por exibir considerável ação antioxidante e inibir a peroxidação lipídica (MANOSROI et. al, 2014). Dessa maneira, é possível que P1G10 por meio de sua ação antioxidante contribua para a reversão/atenuação do quadro de estresse oxidativo promovido pelo uso do quimioterápico PTX e como consequência, reduza sua citotoxicidade. Entretanto, para uma conclusão definitiva, ensaios mais robustos focados na ação de P1G10 em modelo de DNPIQ são necessários.

Embora uma tendência à redução da população celular do GRD tenha sido observada com 18 dias de tratamento, esse padrão não foi evidenciado de forma análoga para o período de 12 dias, que caracterizaria o pico da DNP. Como evidenciado pelo teste comportamental escolhido para este estudo, no 12º já há uma neuropatia instalada por PTX. Dessa forma, esperava-se encontrar alterações patológicas condizentes com as alterações comportamentais. Sabendo que existe um intervalo de tempo entre a perda funcional e às alterações patológicas para essa condição (BEISWENGER; CALCUTT; MIZISIN, 2008), é possível que, no 12º dia, ainda não estejam estabelecidas alterações patológicas consistentes nesses tecidos.

Houve limitações no presente estudo devido às alterações no cronograma, decorrentes das restrições impostas pela pandemia do COVID- 19. Foram realizados testes comportamentais e análises histopatológicas, entretanto testes mais detalhados são necessários para uma melhor caracterização da fisiopatologia da DNPIQ e do mecanismo de ação de P1G10. Acredita-se que haja uma correlação entre nocicepção e reatividade do GRD. Em modelo de dor pós-cirúrgica (cirurgia na pata), Romero e colaboradores (2012) identificaram aumento da expressão de indicadores de ativação neuronal, como c-Fos, no GRD dos camundongos operados o que suporta a hipótese de que o GRD tenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção da hipersensibilidade à dor nessa condição. Assim, a expressão de c-Fos poderia ser um marcador molecular precoce envolvido na nocicepção a ser investigado, por meio de imunohistoquímica do GRD, no modelo de DNPIQ do presente estudo. Outra possibilidade seria a investigação de imunorreatividade de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como MCP-1/CCL2, nos GRD dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, como avaliado por Zhang et al. (2013) em modelo de DNP induzida por PTX. Além disso, vale ressaltar que os resultados do presente estudo revelam o papel profilático/protetor de P1G10 na DNP

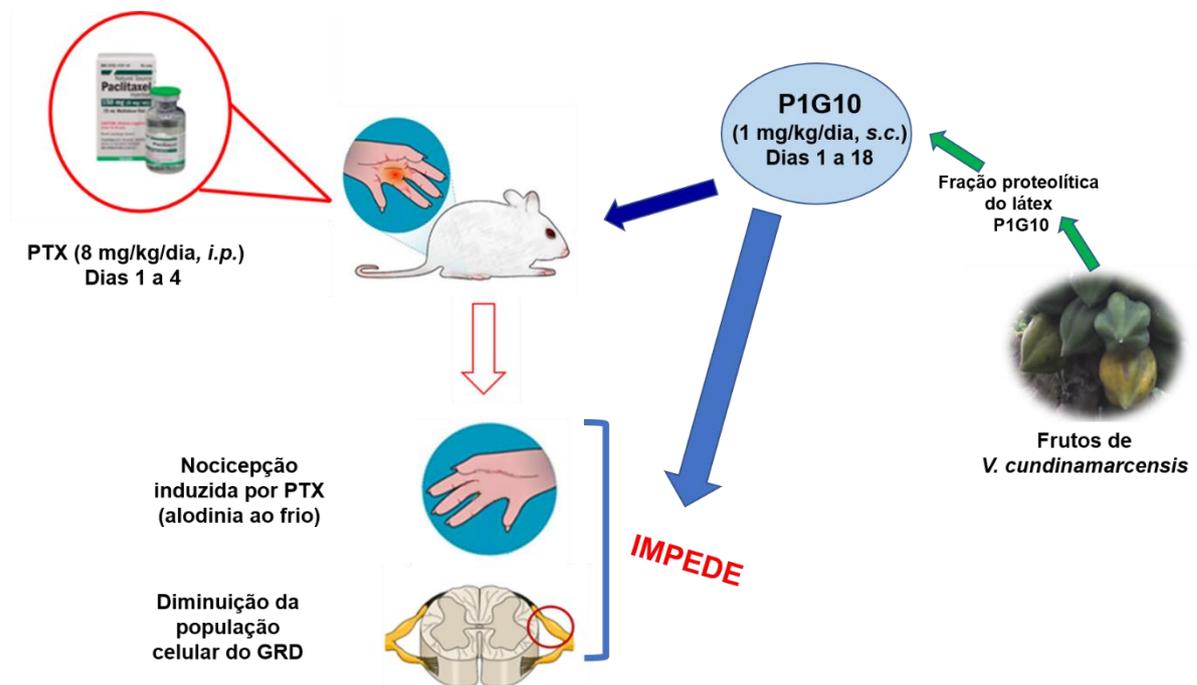
induzida por PTX, sendo necessária a investigação de sua ação uma vez já estabelecida a DNPIQ.

Apesar de suas limitações, este trabalho representa um estudo inicial que visa demonstrar o papel antinociceptivo de P1G10 em somatório aos seus já descritos efeitos antitumoral e antimetastático, tornando-a uma potente ferramenta de uso no contexto de terapia adjuvante no tratamento oncológico. Portanto, com base no paradigma experimental utilizado neste estudo, uma investigação mais detalhada sobre possíveis mediadores envolvidos na nocicepção, como citocinas e quimiocinas inflamatórias, assim como espécies reativas de oxigênio, deve ser realizada.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que P1G10, na menor dose estudada (1 mg/kg), possui efeito antinociceptivo frente à nocicepção induzida pelo quimioterápico PTX (alodinia fria). Esse efeito pode, em parte, ser decorrente da neuroproteção, em nível periférico, sugerida em tempos mais prolongados de tratamento com a fração P1G10 (Figura 17).

Figura 17. Representação esquemática dos efeitos de P1G10 sobre a DNP induzida por paclitaxel.



A nocicepção e a diminuição da população celular do gânglio da raiz dorsal da medula, induzidas por PTX, foram atenuadas pela ação de P1G10 (fração proteolítica do látex do fruto de *V. cundinamarcensis*).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLMANN M, HEMPEL G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. **Cancer chemotherapy and pharmacology**;78(4):661-71, Oct 1, 2016.

ALBUQUERQUE, R. M., PIZZITOLA, M. P., E SILVA, A. C. A., DITZ, D., FREITAS, K. M., FERREIRA, Ê., ... & LOPES, M. T. P. The proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex displays anti-inflammatory effect in a mouse model of acute TNBS-induced colitis. **Scientific reports**, 10(1), 1-11, 2020.

ALMEIDA V. D., LEITÃO A., REINA L. D., MONTANARI C.A., DONNICI C. L., LOPES M. T. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, Jan;28(1):118-29, 2005.

ALVARENGA ÉC, CAIRES A, LADEIRA LO, GAMERO EJ, ANDRADE LM, PAZ MT, LEITE MD. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, 66(1):43-8, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Chemotherapy for Breast Cancer, 2019 <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>> Acesso em 03 de dezembro de 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Determining a chemotherapy schedule (cycle), 2019 <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-is-chemotherapy-used-to-treat-cancer.html#references>> Acesso em 03 de dezembro de 2020.

ARAUJO E SILVA A. C. Avaliação da atividade anti-úlceras gástrica e de vias envolvidas no modo de ação da fração P1G10, obtida do látex de *Carica candamarcensis*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.

ARETI, A., YERRA, V. G., NAIDU, V. G. M., & KUMAR, A. Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. **Redox biology**, 2, 289-295, 2014.

ARGYRIOU, A. A., KOLTZENBURG, M., POLYCHRONOPOULOS, P., PAPAPETROPOULOS, S., & KALOFONOS, H. P. Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, 66(3), 218-228, 2008.

ARGYRIOU, A. A., BRUNA, J., MARMIROLI, P., & CVALETTI, G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. **Critical reviews in oncology/hematology**, 82(1), 51-77, 2012.

ARGYRIOU, A. A., KYRITSIS, A. P., MAKATSORIS, T., & KALOFONOS, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature. **Cancer management and research**, 6, 135, 2014.

AUSTIN, P., & MOALEM-TAYLOR, G. Pathophysiology of neuropathic pain: inflammatory mediators. **Neuropathic Pain**. Cambridge University Press: New York, 7, 77-86p, 2013.

BAEZ R, LOPES MT, SALAS CE, HERNANDEZ M. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. **Planta medica**, Oct; 73(13):137783, 2007.

BARBUTI, A. M., & CHEN, Z. S. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. **Cancers**, 7(4), 2360-2371, 2015.

BARON R, BINDER A, WASNER G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**. Aug 1; 9(8):807-19, 2010.

BASBAUM, A. I., BAUTISTA, D. M., SCHERRER, G., & JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, 139(2), 267-284, 2009.

BEISWENGER, K. K., CALCUTT, N. A., & MIZISIN, A. P. Epidermal nerve fiber quantification in the assessment of diabetic neuropathy. **Acta histochemical**, 110(5), 351-362, 2008.

BENNETT MI, SMITH BH, TORRANCE N, LEE AJ. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, Jun 1;122(3):289-94, 2006.

BEUTH, J., SCHNEIDER, B., VAN LEENDERT, R., UHLENBRUCK, G. Large-scale survey of the impact of complementary medicine on side-effects of adjuvant hormone therapy in patients with breast cancer. **In Vivo**, 30(1), 73-75, 2016.

BAKARE, A. O., & OWOYELE, B. V. Antinociceptive and neuroprotective effects of bromelain in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in Wistar rats. **The Korean Journal of Pain**, 33(1), 13, 2020.

BRAGA, A. D. Efeito da fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis*, P1G10, sobre o processo inflamatório tumoral. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

BRAGA A. D. Modulação do Fenótipo de Macrófagos Associados a Tumores Como Mecanismo de Ação da Atividade Antitumoral/Antimetastática de Proteases obtidas do látex de *V. cundinamarcensis*. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2017.

BRAVO LM, HERMOSILLA J, SALAS CE. A biochemical comparison between latex from *Carica candamarcensis* and *C. papaya*. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas**, Dec; 27(12):2831-42, 1994.

BRIGLE K., PIERRE A., FINLEY-OLIVER E., FAIMAN B., TARIMAN J. D., MICELI T. Myelosuppression, bone disease, and acute renal failure. **Clinical journal of oncology nursing**. Oct 2;21, 2017.

CAPONERO, R., MONTARROYOS, E. S., & TAHAMTANI, S. M. M. Neuropatia pós-quimioterapia. **Revista Dor**, 17, 56-58, 2016.

CAVALETTI, G., TREDICI, G., BRAGA, M., & TAZZARI, S. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol. **Experimental neurology**, 133(1), 64-72, 1995.

CESARE, P., MCNAUGHTON, P. Peripheral pain mechanisms. Current opinion in neurobiology, 7(4), 493-499, 1997.

CHOBOTOVA K, VERNALLIS AB, MAJID FA. Bromelain's activity and potential as an anticancer agent: current evidence and perspectives. *Cancer letters*, 290(2):148-56, Apr 28, 2010.

CHRISTIANO S. C. Avaliação das atividades farmacológicas de fração proteolítica obtida do látex da *Carica candamarcensis* em modelos de inflamação aguda e crônica. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

COHEN, S. P., MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Bmj**, 348, f7656, 2014.

COMMON TERMINOLOGY CRITERIA FOR ADVERSE EVENTS (CTCAE) v5.0. 2017. https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf. Acesso em 23 de abril de 2019.

DALE, R., STACEY, B. Multimodal treatment of chronic pain. **Medical Clinics**, 100(1), 55-64, 2016.

DEBLED M., HOUÉDÉ N., MADRANGES N., DONAMARIA C., FLOQUET A., DURAND M., MAURIAC L. Does chemotherapy-induced neutropaenia result in a postponement of adjuvant or neoadjuvant regimens in breast cancer patients? Results of a retrospective analysis. **British journal of cancer**, 97(12):1642, 2007.

DEUIS, J. R., DVORAKOVA, L. S., & VETTER, I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 284, 2017.

DEVITA, V., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. *Cancer: Principles and practice of oncology*. **Wolters Kluwer**, 2015.

DEVITA, V., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. *Cancer: Principles and practice of oncology*. **Wolters Kluwer**, 11th edition, 2018.

DEXTER, D. L., KOWALSKI, H. M., BLAZAR, B. A., FLIGIEL, Z., VOGEL, R., & HEPPNER, G. H. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. **Cancer research**, 38(10), 3174-3181, 1978.

DITZ D, FIGUEIREDO C, LEMOS F, VIANA C, ANDRADE S, SOUZA-FAGUNDES E, FUJIWARA R, SALAS C, LOPES M. Antiangiogenesis, loss of cell adhesion and apoptosis are involved in the antitumoral activity of Proteases from *V.*

cundinamarcensis (*C. candamarcensis*) in murine melanoma B16F1. *International journal of molecular sciences*, (4):7027-44, Apr;16, 2015.

DOUGHERTY, P. M., CATA, J. P., CORDELLA, J. V., BURTON, A., & WENG, H. R. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. **Pain**, 109(1-2), 132-142, 2004.

EISENHAUER, E. A., & VERMORKEN, J. B. The taxoids. **Drugs**, 55(1), 5-30, 1998.

FEIN, A. Nociceptors and the perception of pain. University of Connecticut Health Center, 4, 61-67, 2014.

FERLINI, C., RASPAGLIO, G., MOZZETTI, S., DISTEFANO, M., FILIPPETTI, F., MARTINELLI, E., & SCAMBIA, G. Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. **Molecular pharmacology**, 64(1), 51-58, 2003.

FITZHUGH, D. J., SHAN, S., DEWHIRST, M. W. & HALE, L. P. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. **Clin. Immunol.** 128, 66–74, 2008.

FLATTERS, S. J., & BENNETT, G. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**, 122(3), 245-257, 2006.

FRANSSON, M. N., GREEN, H., LITTON, J. E., & FRIBERG, L. E. Influence of Cremophor EL and genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of paclitaxel and its metabolites using a mechanism-based model. **Drug metabolism and disposition**, 39(2), 247-255, 2011.

FREITAS KM, BARCELOS LS, CALIARI MV, SALAS CE, LOPES MT. Healing activity of proteolytic fraction (P1G10) from *Vasconcellea cundinamarcensis* in a cutaneous wound excision model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 96:269-78, Dec 1, 2017.

FREITAS, K. M., SILVA, A. C., VELOSO, E. S., FERREIRA, Ê., BARCELOS, L. S., CALIARI, M. V., ... & LOPES, M. T. P1G10, the Proteolytic Fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis*, Stimulates Tissue Repair after Acute Exposure to Ultraviolet B Radiation. **International journal of molecular sciences**, 20(18), 4373, 2019.

GHERSI, D., WILLSON, M. L., CHAN, M. M. K., SIMES, J., DONOGHUE, E., & WILCKEN, N. Taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane database of systematic reviews*, (6), 2015.

GILARDINI, A., AVILA, R. L., OGGIONI, N., RODRIGUEZ-MENENDEZ, V., BOSSI, M., CANTA, A., ... & KIRSCHNER, D. A. Myelin structure is unaltered in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Neurotoxicology**, 33(1), 1-7, 2012.

GLOBOCAN. All cancers. Number of deaths in 2018, both sexes, all ages. 2018 <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>> Acesso em: 02 de dezembro, 2020.

GOMES, F. S., SPÍNOLA, C. D. V., RIBEIRO, H. A., LOPES, M. T., CASSALI, G. D., & SALAS, C. E. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. **Burns**, 36(2), 277-283, 2010.

GORNSTEIN, E., SCHWARZ, T. L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: mechanisms and unanswered questions. **Neuropharmacology**, 76, 175-183, 2013.

GREIMEL, E. R., BJELIC-RADISIC, V., PFISTERER, J., HILPERT, F., DAGHOFER, F., PUJADE-LAURINE, E., ... & ARBEITSGEMEINSCHAFT GYNAEKOLOGISCHE ONKOLOGIE OVARIAN CANCER STUDY GROUP. Toxicity and quality of life outcomes in ovarian cancer patients participating in randomized controlled trials. **Supportive Care in Cancer**, 19(9), 1421-1427, 2011.

HALE, L. P., GREER, P. K., TRINH, C. T., & GOTTFRIED, M. R. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. **Clinical Immunology**, 116(2), 135-142, 2005.

HANAHAAN, D., & WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100(1), 57-70, 2000.

HANAHAAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5):646-74, Mar, 4, 2011.

HEPPNER, G. H., DEXTER, D. L., DENUCCI, T., MILLER, F. R., & CALABRESI, P. Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. **Cancer Research**, 38(11 Part 1), 3758-3763, 1978.

HUEHNCHEN P., BOEHMERLE W., ENDRES M. Assessment of paclitaxel induced sensory polyneuropathy with "Catwalk" automated gait analysis in mice. **PloS one**, 8(10):e76772, 2013.

HWANG, B. Y., KIM, E. S., KIM, C. H., KWON, J. Y., & KIM, H. K. Gender differences in paclitaxel-induced neuropathic pain behavior and analgesic response in rats. **Korean journal of anesthesiology**, 62(1), 66, 2012.

IASP. IASP Terminology. 2017. < <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain>>. Acesso em: 11 de outubro de 2020

INCA. O que é câncer? 2020. <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 02 de dezembro, 2020.

INCA. Tratamento do câncer. 2019. < <https://www.inca.gov.br/tratamento>>. Acesso em: 02 de dezembro, 2020.

JAGGI, A. S., JAIN, V., & SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & clinical pharmacology**, 25(1), 1-28, 2011.

JANUŠKEVIČIENĖ I., PETRIKAITĖ V. Heterogeneity of breast cancer: the importance of interaction between different tumor cell populations. **Life Sciences**. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117009>, 2019.

JIANG, H., TAO, W., ZHANG, M., PAN, S., KANWAR, J. R., & SUN, X. Low-dose metronomic paclitaxel chemotherapy suppresses breast tumors and metastases in mice. **Cancer investigation**, 28(1), 74-84, 2010.

JIN, H. Y., LEE, N. Y., KO, H. A., LEE, K. A., & PARK, T. S. Comparison of sensory tests and neuronal quantity of peripheral nerves between streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats and paclitaxel (PAC)-treated rats. **Somatosensory & Motor Research**, 33(3-4), 186-195, 2016.

JORDAN, M. A., TOSO, R. J., THROWER, D., & WILSON, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9552-9556, 1993.

KAVANAUGH, W. M. *Antibody Prodrugs for Cancer*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2019. DOI: 10.1080/14712598.2020.1699053

KAWASAKI, Y., XU, Z. Z., WANG, X., PARK, J. Y., ZHUANG, Z. Y., TAN, P. H., ... & JI, R. R. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early-and late-phase development of neuropathic pain. **Nature medicine**, 14(3), 331-336, 2008.

KIM, W. Y., WOO, S. U., SEO, J. H., SON, G. S., LEE, J. B., BAE, J. W. Toxicities, dose reduction and delay of docetaxel and paclitaxel chemotherapy in breast cancer without distant metastases. **Journal of cancer research and therapeutics**, 7(4), 412, 2011.

KIM, J. H., DOUGHERTY, P. M., ABDI, S. Basic science and clinical management of painful and non-painful chemotherapy-related neuropathy. **Gynecologic oncology**, 136(3), 453-459, 2015.

LEE, G. I., NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, 47(2), 173-180, 2020.

LEIPNER, J. & SALLER, R. Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. **Drugs**, 59(4): 769-780, 2000.

LEMOS FO, FERREIRA LA, CARDOSO VN, CASSALI GD, SALAS CE, LOPES MT. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. **European Journal of Dermatology**, 21(5):722-30, Oct 1, 2011.

LEMOS FO, VILLALBA MI, TAGLIATI CA, CARDOSO VN, SALAS CE, LOPES MT. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of a *Vasconcellea cundinamarcensis* proteinase fraction with pharmacological activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, (1):94-101, Feb;26, 2016.

LEMOS, F. O., DITZ, D., SANTOS, V. G., PIRES, S. F., DE ANDRADE, H. M., SALAS, C. E., & LOPES, M. T. Cysteine proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. Candamarcensis*) inhibit melanoma metastasis and modulate expression of proteins related to proliferation, migration and differentiation. **International journal of molecular sciences**, 19(10), 2846, 2018.

LEÓN J. *Botánica de los cultivos tropicales*. Bib. Orton IICA/CATIE; 1987.

LEIPNER, J., SALLER, R. Systemic enzyme therapy in oncology. **Drugs**, 59(4), 769-780, 2000.

LI, Y., ZHANG, H., KOSTURAKIS, A. K., CASSIDY, R. M., ZHANG, H., Kennamer-Chapman, R. M., ... & DOUGHERTY, P. M. MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Brain, behavior, and immunity**, 49, 255-266, 2015.

LIANG, Y., ZHANG, H., SONG, X., & YANG, Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Seminars in cancer biology**. Vol. 60, pp. 14-27, 2020.

LOLIGNIER, S., GKIKA, D., ANDERSSON, D., LEIPOLD, E., VETTER, I., VIANA, F., & BUSSEROLLES, J. New insight in cold pain: role of ion channels, modulation, and clinical perspectives. **Journal of Neuroscience**, 36(45), 11435-11439, 2016.

LOPRINZI, C. L., MADDOCKS-CHRISTIANSON, K., WOLF, S. L., RAO, R. D., DYCK, P. J. B., MANTYH, P., & DYCK, P. J. The paclitaxel acute pain syndrome: sensitization of nociceptors as the putative mechanism. **The Cancer Journal**, 13(6), 399-403, 2007.

LUNDQVIST, E. A., FUJIWARA, K., & SEOUD, M. Princípios da quimioterapia. Figo cancer report, 2015.

MACDONALD DI, WOOD JN, EMERY EC. Molecular mechanisms of cold pain. **Neurobiology of Pain**,100044, Jan 7; 2020.

MANOSROI, A., CHANKHAMPAN, C., PATTAMAPUN, K., MANOSROI, W., & MANOSROI, J. Antioxidant and gelatinolytic activities of papain from papaya latex and bromelain from pineapple fruits. **Chiang Mai J. Sci**, 41(3), 635-648, 2014.

MARJANOVIC N. D., WEINBERG R. A., CHAFFER C. L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. **Clinical chemistry**, 59(1):168-79, 2013.

MASOCHA W., PARVATHY S. S. Preventative and therapeutic effects of a GABA transporter 1 inhibitor administered systemically in a mouse model of paclitaxel-induced neuropathic pain. **Peer J.**, 4: e2798, Dec 15, 2016.

MELLI, G., JACK, C., LAMBRINOS, G. L., RINGKAMP, M., & HÖKE, A. Erythropoietin protects sensory axons against paclitaxel-induced distal degeneration. **Neurobiology of disease**, 24(3), 525-530, 2006.

MELLO V. J., GOMES M. T., LEMOS F. O., DELFINO J. L., ANDRADE S. P., LOPES M. T., SALAS C. E. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**,15(4):237-44, 2008.

MO M, ERDELYI I, SZIGETI-BUCK K, BENBOW J. H., EHRLICH B. E. Prevention of paclitaxel induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment. **The FASEB Journal**; 26(11):4696-709. Nov, 2012.

NASCIMENTO T. G. Neutropenia e qualidade de vida em mulheres com câncer de mama durante o tratamento quimioterápico. Dissertação. (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. NCI Dictionary of Cancer Terms. 2019. <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/her2-negative>> Acesso em: 18 de abril de 2019

OERLEMANS, C., BULT, W., BOS, M., STORM, G., NIJSEN, J. F. W., HENNINK, W. E. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. **Pharmaceutical research**, 27(12), 2569-2589, 2010.

ONKEN, J. E., GREER, P. K., CALINGAERT, B., & HALE, L. P. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. **Clinical Immunolog.**, 126(3), 345-352, 2008.

OOSTENDORP, R. L., BUCKLE, T., LAMBERT, G., GARRIGUE, J. S., BEIJNEN, J. H., SCHELLENS, J. H., VAN TELLINGEN, O. Paclitaxel in self-micro emulsifying formulations: oral bioavailability study in mice. **Investigational new drugs**, 29(5), 768-776, 2011.

OSSIPOV, M. H. The perception and endogenous modulation of pain. **Scientifica**. 2012, 2012.

PALMIERI, C. & JONES, A. The 2011 EBCTCG polychemotherapy overview. **Lancet Lond. Engl**, 379, 390–392, 2012.

PARVATHY, S. S., & MASOCHA, W. Matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 prevents the development of paclitaxel-induced hyperalgesia in mice. **Medical Principles and Practice**, 22(1), 35-41, 2013.

PERSOHN, E., CANTA, A., SCHOEPFER, S., TRAEBERT, M., MUELLER, L., GILARDINI, A., ... & GIUSSANI, G. Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats. **European journal of cancer**, 41(10), 1460-1466, 2005.

PETERS, C. M., JIMENEZ-ANDRADE, J. M., JONAS, B. M., SEVCIK, M. A., KOEWLER, N. J., GHILARDI, J. R., ... & MANTYH, P. W. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. **Experimental neurology**, 203(1), 42-54, 2007.

PETO, R., DAVIES, C., GODWIN, J., GRAY, R., PAN, H. C., CLARKE, M., & WANG, Y. C. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. **Lancet**, 379(9814), 2012.

PILLAI, G. Nanomedicines for cancer therapy: an update of fda approved and those under various stages of development. *SOJ Pharm Pharm Sci* 1 (2): 13. Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development, 2014.

POLOMANO, R.C., MANNES, A. J., CLARK, U.S., BENNETT, G.J. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*, 94(3), 293-304.

POSTMA, T. J., VERMORKEN, J. B., LIEFTING, A. J. M., PINEDO, H. M., & HEIMANS, J. J. Paclitaxel-induced neuropathy. ***Annals of Oncology***, 6(5), 489-494, 1995.

QUASTHOFF, S., HARTUNG, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. ***Journal of neurology***, 249(1), 9-17, 2002.

RENN, C. L., CAROZZI, V. A., RHEE, P., GALLOP, D., DORSEY, S. G., & CVALETTI, G. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxalipatin-based chemotherapy in mice. ***Molecular pain***, 7, 1744-8069, 2011.

REYES-GIBBY CC, MORROW PK, BUZDAR A, SHETE S. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy as a predictor of neuropathic pain in breast cancer patients previously treated with paclitaxel. ***The Journal of Pain***, 10(11):1146-50, 2009.

ROMERO, A., GONZALEZ-CUELLO, A., LAORDEN, M. L., CAMPILLO, A., VASCONCELOS, N., ROMERO-ALEJO, E., & PUIG, M. M. Effects of surgery and/or remifentanyl administration on the expression of pERK1/2, c-Fos and dynorphin in the dorsal root ganglia in mice. ***Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology***, 385(4), 397-409, 2012.

ROWINSKY, E. K., DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (taxol). ***New England Journal of Medicine***, 332(15):1004-1014, 1995.

SALAT, K. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1—current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy. ***Pharmacological reports: PR***, 2020.

SANNA, M. D., QUATTRONE, A., GHELARDINI, C., & GALEOTTI, N. PKC-mediated HuD–GAP43 pathway activation in a mouse model of antiretroviral painful neuropathy. ***Pharmacological research***, 81, 44-53, 2014.

SCHWENKLENKS M., JACKISCH C., Constenla M., Kerger J. N., Paridaens R., Auerbach L., Bosly A., Pettengell R., Szucs T. D., Leonard R. Neutropenic event risk and impaired chemotherapy delivery in six European audits of breast cancer treatment. ***Supportive care in cancer***, 1;14(9):901-9, 2006.

SEIDMAN, A. D., BERRY, D., CIRRINCIONE, C., HARRIS, L., MUSS, H., MARCOM, P. K., ... & UNGARO, P. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. ***Journal of Clinical Oncology***, 26(10), 1642-1649, 2008.

SERETNY M, CURRIE GL, SENA ES, RAMNARINE S, GRANT R, MACLEOD MR, COLVIN LA, FALLON M. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis. ***PAIN***, 155(12):2461-70, 2014.

SIEGEL R, DESANTIS C, VIRGO K, STEIN K, MARIOTTO A, SMITH T, COOPER D, GANSLER T, LERRO C, FEDEWA S, LIN C. Cancer treatment and survivorship statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**; 62(4):220-41, Jul, 2012.

SOMMER, C., KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience letters**, 361(1-3), 184-187, 2004.

SPARANO, J. A., WANG, M., MARTINO, S., JONES, V., PEREZ, E. A., SAPHNER, T., ... & DAVIDSON, N. E. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, 358(16), 1663-1671, 2008.

TASNIM, A., RAMMELKAMP, Z., SLUSHER, A. B., WOZNIAK, K., SLUSHER, B. S., & FARAH, M. H. Paclitaxel causes degeneration of both central and peripheral axon branches of dorsal root ganglia in mice. **BMC neuroscience**, 17(1), 1-8, 2016.

TEIXEIRA RD, RIBEIRO HA, GOMES MT, LOPES MT, SALAS CE. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**; 46(11):956-61, Nov 1, 2008.

TEIXEIRA MJ. Fisiopatologia da dor. Neto, OA; Costa, CMC; Siqueira, JTT; Teixeira, MJ Dor: princípios e prática. Porto Alegre: Artmed, 145-57, 2009.

TOFARIS, G. K., PATTERSON, P. H., JESSEN, K. R., & MIRSKY, R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **Journal of Neuroscience**, 22(15), 6696-6703, 2002.

TOLEDO S., C., VERA A., M., CÁRCAMO G., L., TAPIA C., G., & PÉREZ P., J. Cáncer de mama inflamatorio. Cuadernos de Cirugía, 26(1), 55-61, 2018.

TOMA, W., KYTE, S. L., BAGDAS, D., ALKHLAIF, Y., ALSHARARI, S. D., LICHTMAN, A. H., ... & DAMAJ, M. I. Effects of paclitaxel on the development of neuropathy and affective behaviors in the mouse. **Neuropharmacology**, 117, 305-315, 2017.

TONACO LA, GOMES FL, VELASQUEZ-MELENDZ G, LOPES MT, SALAS CE. The proteolytic fraction from latex of *Vasconcellea cundinamarcensis* (P1G10) enhances wound healing of diabetic foot ulcers: a double-blind randomized pilot study. **Advances in therapy**, 35(4):494-502, 2018.

VIANA, C. T. R. Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo de carcinoma de Ehrlich. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

VILLALBA M. I. C. Avaliação de parâmetros toxicológicos da fração P1G10, obtida do látex de *Carica candamarcensis*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

VIDAL, T. J., FIGUEIREDO, T. A., PEPE, V. L. E. O mercado brasileiro de anticorpos monoclonais utilizados para o tratamento de câncer. **Cadernos de Saúde Pública**, 34, e00010918, 2018.

VIDAL, L. V., FINOT, V. L., MORA, K. D. C., & VENEGAS, F. A. Características físico-químicas del látex de papayuelo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). **Información tecnológica**, 20(6), 93-103, 2009.

WALD M, OLEJAR T, POUČKOVÁ P, ZADINOVA M. Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with the Lewis lung carcinoma. **Life sciences**; 63(17):PL237-43, Sep 18, 1998.

WANG, M. S., DAVIS, A. A., CULVER, D. G., & GLASS, J. D. Wild mice are resistant to paclitaxel (taxol) neuropathy. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, 52(4), 442-447, 2002.

WANG X. M., LEHKY T. J. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. **Cytokine**; 59 (1):3-9, Jul 1, 2012.

WANI M. C., TAYLOR H. L., WALL M. E., COGGON P., MCPHAIL A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J Am Chem Soc.**, 93(9):2325-7, 1971.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **Journal of Clinical Investigation**. 120 (11): 3742–3744, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer today. Top cancer per country, estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, both sexes, all ages. 2018 <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=globe&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D> Acesso em: 02 de dezembro, 2020.

WOZNIAK, K. M., NOMOTO, K., LAPIDUS, R. G., WU, Y., CAROZZI, V., CAVALETTI, G., ... & SLUSHER, B. S. Comparison of neuropathy-inducing effects of eribulin mesylate, paclitaxel, and ixabepilone in mice. **Cancer research**, 71(11), 3952-3962, 2011.

YIN, K., ZIMMERMANN, K., VETTER, I., & LEWIS, R. J. Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways. **Biochemical pharmacology**, 93(2), 125-140, 2015.

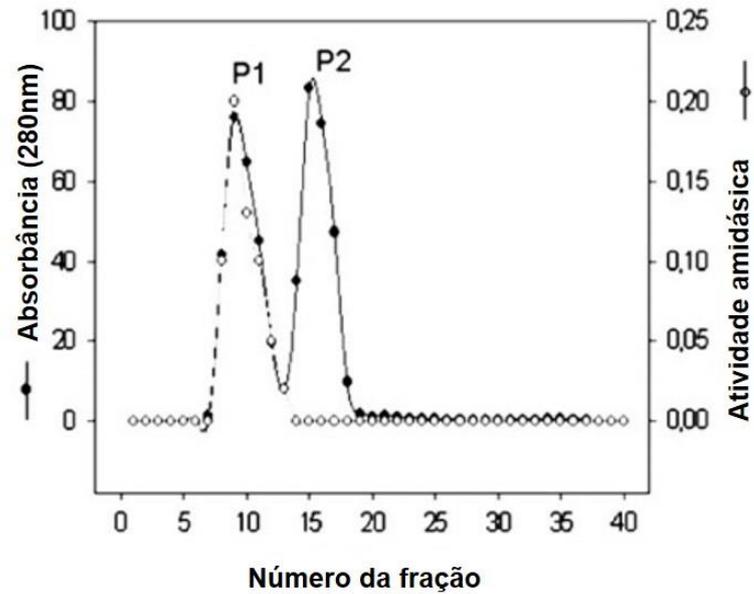
ZHANG, Z., MEI, L., FENG, S. S. Paclitaxel drug delivery systems. **Expert opinion on drug delivery**, 10(3), 325-340, 2013.

ZHANG, H., BOYETTE-DAVIS, J. A., KOSTURAKIS, A. K., LI, Y., YOON, S. Y., WALTERS, E. T., & DOUGHERTY, P. M. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its receptor CCR2 in primary sensory neurons contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **The Journal of Pain**, 14(10), 1031-1044, 2013.

ZHOU C, ZHANG J. Immunotherapy-based combination strategies for treatment of gastrointestinal cancers: current status and future prospects. **Frontiers of medicine**;13(1):12-23, Feb 1, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A- PERFIL CROMATOGRÁFICO DO LÁTEX DE *Vasconcellea cundinamarcensis*



Perfil cromatográfico do látex em resina Sephadex G-10. O látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* foi dissolvido em acetato de sódio 1,0 M (pH 5,0) e aplicado em coluna contendo resina Sephadex G-10. Foram determinados o perfil proteico (absorbância a 280nm) e a atividade amidásica com BAPNA. A partir da filtração G-10 do látex se obteve P1G10 e P2G10.

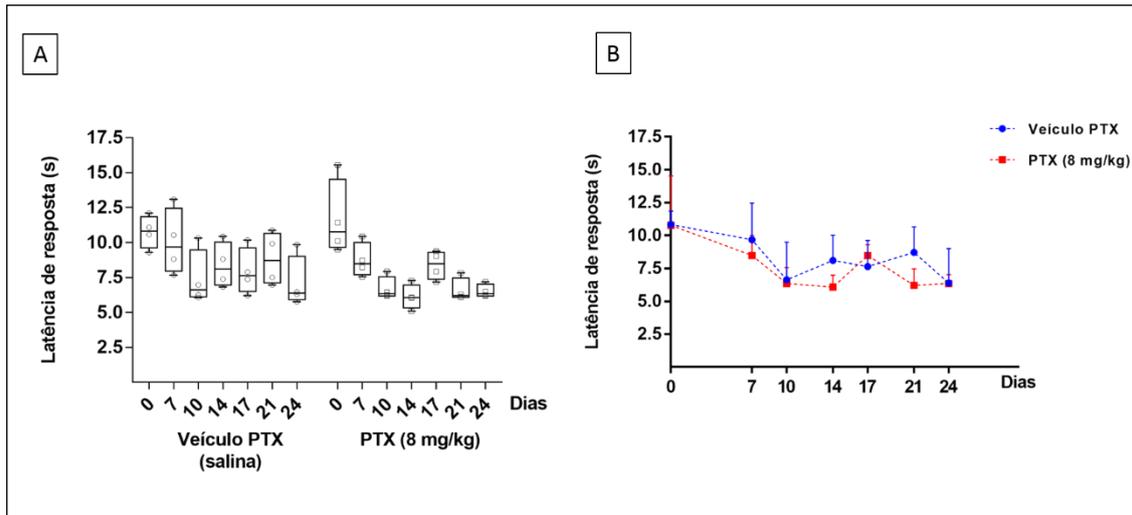
**APÊNDICE B – RESULTADOS UTILIZADOS PARA A DEFINIÇÃO DO
MODELO DE DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA INDUZIDA POR
QUIMIOTERÁPICO (DNPIQ).**

TESTE HOT PLATE

Medidas descritivas das latências obtidas pelo teste Hot Plate

Dias	Veículo PTX (salina) *			PTX (8 mg/kg) *		
	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅
0	9,62	10,83	11,86	9,65	10,77	14,52
7	7,96	9,68	12,47	7,71	8,48	10,01
10	6,12	6,63	9,49	6,19	6,35	7,57
14	6,96	8,12	10,03	5,33	6,07	6,98
17	6,50	7,64	9,62	7,37	8,48	9,30
21	7,11	8,72	10,65	6,12	6,21	7,45
24	5,90	6,39	9,01	6,19	6,34	7,02

* Interquartis (de acordo com o teste de Anderson Darling, os dados não seguem a distribuição Gaussiana).



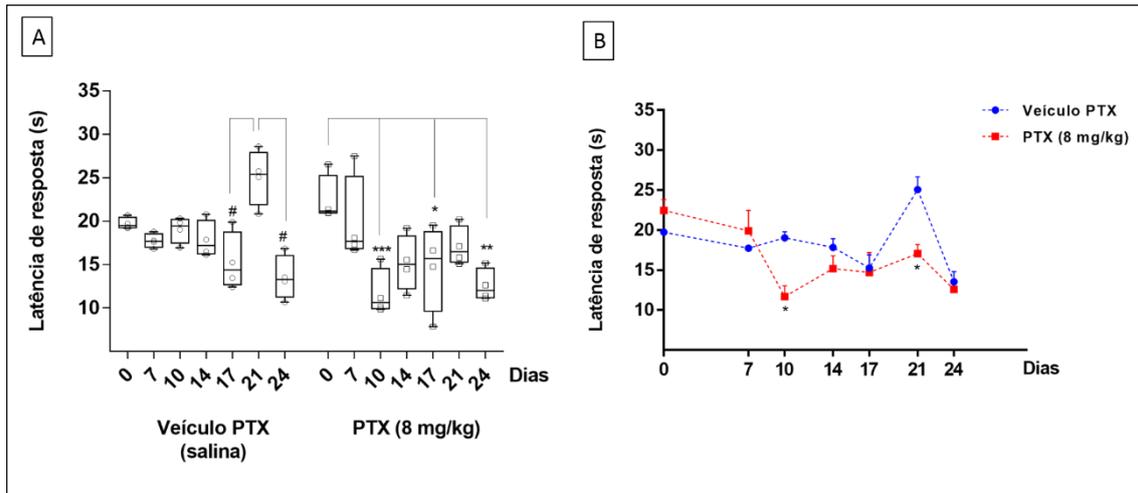
Latências obtidas durante a aplicação do teste Hot Plate. Animais BALB/c fêmeas (n= 8 animais) foram divididos entre os grupos veículo de PTX (salina) e PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias, *i.p.*). Foram realizadas medidas de nocicepção antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal e nos 7°, 10°, 14°, 17°, 21°, e 24° dias após o primeiro tratamento. **(A)** Distribuição dos dados das latências para os diferentes tratamentos. São representados os valores medianos e o intervalo interquartil **(B)** Medianas das latências ao longo do tempo (Friedman, pós-teste LSD).

TESTE COLD PLATE

Medidas descritivas das latências obtidas pelo teste Cold Plate

Dias	Veículo PTX (salina) *	PTX (8 mg/kg) *
0	19,73 ± 0,34	22,46 ± 1,36
7	17,74 ± 0,41	19,91 ± 2,55
10	19,04 ± 0,74	11,70 ± 1,35
14	17,84 ± 1,06	15,18 ± 1,60
17	15,26 ± 1,66	14,71 ± 2,48
21	25,07 ± 1,60	17,07 ± 1,13
24	13,53 ± 1,28	12,59 ± 0,93

* média e erro padrão da média



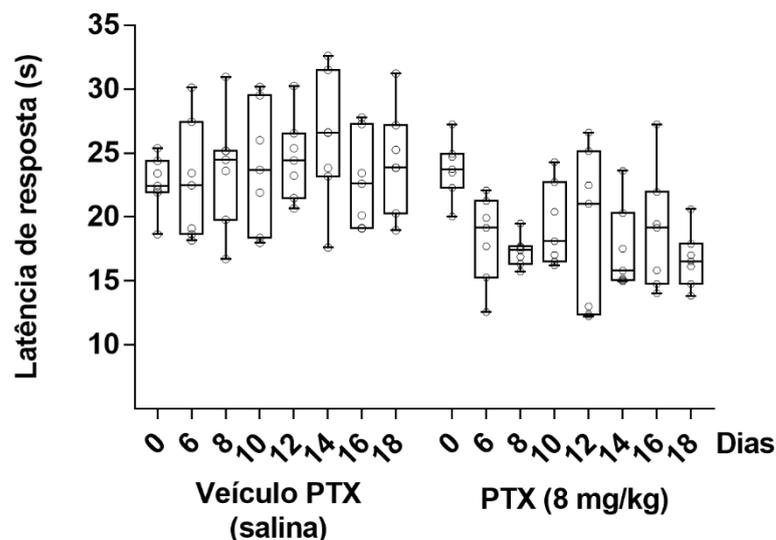
Latências obtidas durante a aplicação do teste Cold Plate. Animais BALB/c fêmeas ($n = 8$ animais) foram divididos entre os grupos veículo de PTX (salina) e PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias, *i.p.*). Foram realizadas medidas de nocicepção antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal e nos 7°, 10°, 14°, 17°, 21°, e 24° dias após o primeiro tratamento. **(A)** Distribuição dos dados das latências para os diferentes tratamentos (# dia 21 vs dia 17; # dia 21 vs dia 24, $p < 0,05$; *** dia 0 vs dias 10, $p < 0,001$, *17, $p < 0,05$ e **24, $p < 0,01$; ANOVA fatorial). **(B)** Médias das latências ao longo do tempo. São mostradas diferenças estatisticamente significativas (Veículo PTX (salina) vs PTX (8 mg/kg) * $Lp < 0,05$, ANOVA fatorial, pós-teste Tukey).

**APÊNDICE C – DADOS REPRESENTATIVOS DA DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS
SUBMETIDOS AO COLD PLATE SOB EFEITO DE PACLITAXEL (PTX) AO
LONGO DO TEMPO**

Latências de resposta obtidas no teste Cold Plate sob efeito de PTX

Dias	Veículo PTX (salina)*	PTX (8 mg/kg) *
0	22,61 ± 0,81	23,78 ± 0,85
6	22,78 ± 1,75	18,29 ± 1,28
8	23,70 ± 1,70	17,31 ± 0,45
10	23,95 ± 1,86	19,34 ± 1,21
12	24,58 ± 1,23	18,99 ± 2,38
14	26,00 ± 1,94	17,49 ± 1,25
16	22,79 ± 1,37	18,93 ± 1,76
18	24,38 ± 1,56	16,68 ± 0,83

* média e erro padrão da média



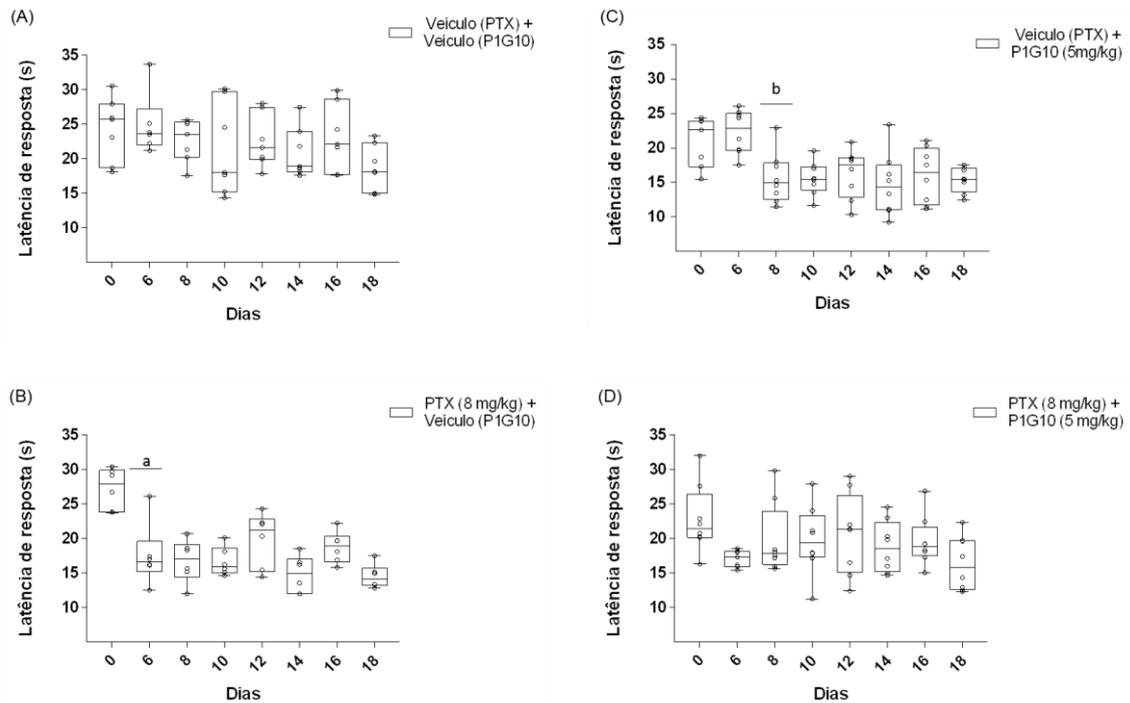
Distribuição dos dados do teste Cold Plate. Animais BALB/c fêmeas (n= 14 animais) foram divididos entre os grupos veículo de PTX (salina) e PTX (8 mg/kg/dia, por 4 dias, *i.p.*). Foram realizadas medidas de nocicepção antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal e nos 6°, 8°, 10°, 12°, 14°, 16° e 18° dias após o primeiro tratamento (ANOVA fatorial).

**APÊNDICE D – DADOS REPRESENTATIVOS DA DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS
SUBMETIDOS AO TESTE COLD PLATE SOB EFEITO DE P1G10**

**Latências de resposta obtidas no teste Cold Plate sob efeito de PTX e/ou P1G10
(5mg/kg)**

Dias	Veículo (PTX) * + Veículo (P1G10)	PTX (8 mg/kg) * + Veículo (P1G10)	Veículo (PTX) * + P1G10 (5mg/kg)	PTX (8mg/kg) * + P1G10 (5mg/kg)
0	24,30 ± 1,75	26,05 ± 1,33	20,90 ± 1,38	22,76 ± 1,74
6	24,94 ± 1,84	15,51 ± 0,79	22,32 ± 1,12	17,07 ± 0,46
8	22,68 ± 1,16	17,00 ± 1,44	15,67 ± 1,31	19,81 ± 1,82
10	21,40 ± 2,53	17,00 ± 0,89	15,61 ± 0,86	19,78 ± 1,76
12	22,58 ± 1,46	18,55 ± 2,01	16,28 ± 1,26	20,63 ± 2,09
14	20,92 ± 1,39	15,27 ± 0,95	14,69 ± 1,62	18,81 ± 1,31
16	23,14 ± 1,82	18,09 ± 1,04	16,02 ± 1,41	19,58 ± 1,28
18	18,76 ± 1,24	14,96 ± 0,62	15,38 ± 0,64	16,39 ± 1,38

* média e erro padrão da média

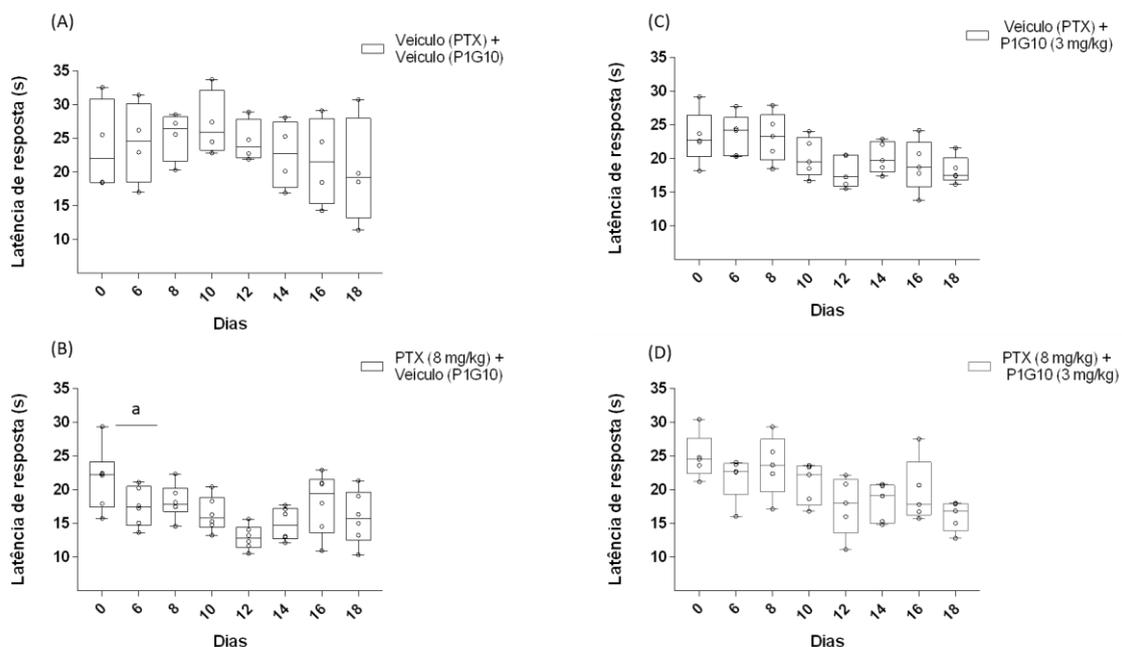


Distribuição dos dados e comparação das médias ao longo do tempo. Animais BALB/c fêmeas (n= 29 animais) foram divididos nos grupos veículo de PTX (salina) + veículo de P1G10 (salina), PTX (8 mg/kg) + veículo (P1G10), veículo (PTX) + P1G10 (5 mg/kg) e PTX (8 mg/kg) + P1G10 (5mg/kg). Foram realizadas medidas de nocicepção antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal, e nos 6°, 8°, 10°, 12°, 14°, 16° e 18° dias após o primeiro tratamento. O tratamento com P1G10 teve início juntamente com a administração de PTX e foi realizado diariamente. Letras: (a) dia 0 vs dias 6,14 e 18 ($p < 0,01$); (b) dia 6 vs dia 14 ($p < 0,01$); ANOVA fatorial.

Latências de resposta obtidas no teste Cold Plate sob efeito de PTX e/ou P1G10 (3 mg/kg)

Dias	Veículo (PTX) * + Veículo (P1G10)	PTX (8 mg/kg) * + Veículo (P1G10)	Veículo (PTX) * + P1G10 (3mg/kg)	PTX (8mg/kg) * + P1G10 (3mg/kg)
0	23,79 ± 3,38	21,67 ± 1,91	23,26 ± 1,76	24,93 ± 1,52
6	24,42 ± 3,02	17,50 ± 1,17	23,44 ± 1,40	21,85 ± 1,47
8	25,43 ± 1,81	18,27 ± 1,05	23,20 ± 1,62	23,65 ± 2,01
10	27,14 ± 2,40	16,41 ± 1,06	20,22 ± 1,31	20,94 ± 1,36
12	24,61 ± 1,56	12,91 ± 0,74	18,03 ± 1,05	17,65 ± 1,94
14	22,63 ± 2,51	14,89 ± 0,99	20,18 ± 1,03	18,13 ± 1,28
16	21,61 ± 3,27	18,05 ± 1,85	19,07 ± 1,71	19,72 ± 2,12
18	20,13 ± 4,00	15,90 ± 1,61	18,27 ± 0,91	16,12 ± 0,98

* média e erro padrão da média

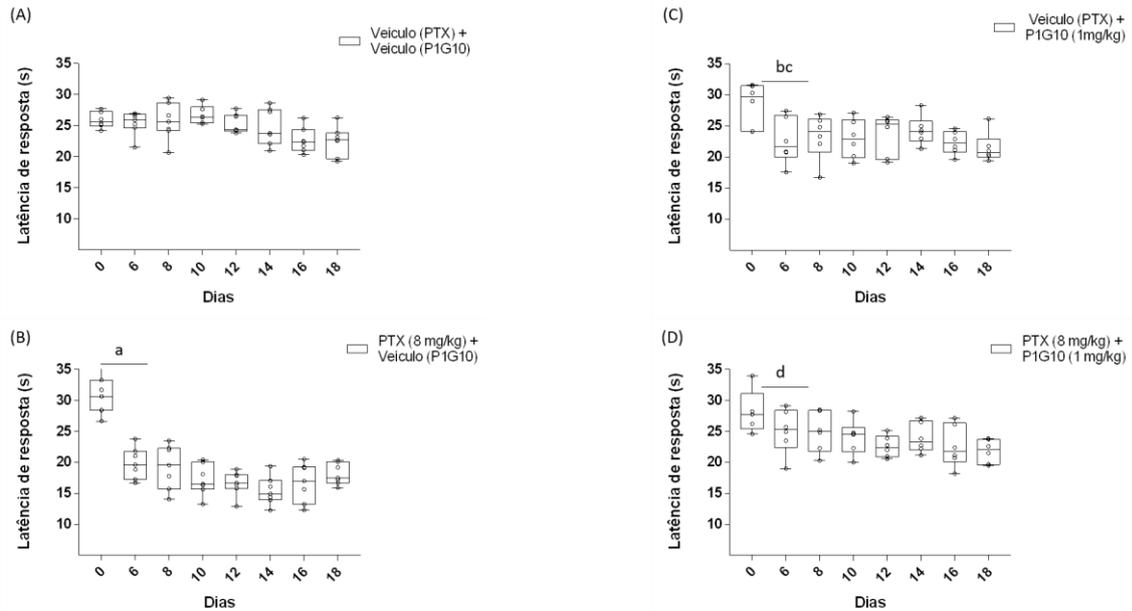


Distribuição dos dados e comparação das médias ao longo do tempo. Animais BALB/c fêmeas (n= 20 animais) foram divididos entre os grupos, veículo PTX (salina) + veículo P1G10 (salina), PTX (8 mg/kg) + veículo (P1G10), veículo (PTX) + P1G10 (3 mg/kg) e PTX (8 mg/kg) + P1G10 (3 mg/kg). Foram realizadas medidas de nocicepção antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal, e nos 6°, 8°, 10°, 12°, 14°, 16° e 18° dias após o primeiro tratamento. O tratamento com P1G10 teve início juntamente com a administração de PTX e foi realizado diariamente. Letras: (a) dia 0 vs dia 12 ($p < 0,05$); ANOVA fatorial.

Latências de resposta obtidas no teste Cold Plate sob efeito de PTX e/ou P1G10 (1 mg/kg)

Dias	Veículo (PTX) * + Veículo (P1G10)	PTX (8 mg/kg) * + Veículo (P1G10)	Veículo (PTX) * + P1G10 (1mg/kg)	PTX (8mg/kg) * + P1G10 (1mg/kg)
0	25,93 ± 0,53	30,61 ± 1,13	28,43 ± 1,41	28,13 ± 1,59
6	25,38 ± 0,72	19,86 ± 0,95	22,60 ± 1,53	25,07 ± 1,47
8	25,69 ± 1,12	19,27 ± 1,35	23,28 ± 1,49	24,90 ± 1,33
10	26,73 ± 0,59	17,20 ± 0,95	22,93 ± 1,28	24,05 ± 1,12
12	25,34 ± 0,59	16,64 ± 0,74	23,61 ± 1,34	22,55 ± 0,70
14	24,85 ± 1,12	15,42 ± 0,87	24,30 ± 0,95	23,93 ± 0,98
16	22,65 ± 0,76	16,72 ± 1,19	22,30 ± 0,76	22,63 ± 1,39
18	22,50 ± 0,90	18,13 ± 0,65	21,48 ± 0,98	21,80 ± 0,78

* média e erro padrão da média



Distribuição dos dados e comparação das médias ao longo do tempo. Animais BALB/c fêmeas ($n= 26$ animais) foram divididos entre os grupos: veículo PTX (salina) + veículo P1G10 (salina), PTX (8 mg/kg) + veículo (P1G10), veículo (PTX) + P1G10 (1 mg/kg) e PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg). Foram realizadas medidas de nocicepção antes da primeira injeção de PTX, para caracterização da resposta basal, e nos 6^o, 8^o, 10^o, 12^o, 14^o, 16^o e 18^o dias após o primeiro tratamento. O tratamento com P1G10 teve início juntamente com a administração de PTX e foi realizado diariamente. Letras: (a) dia 0 vs dias 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18, ($p < 0,001$); (b) dia 0 vs dia 16 ($p < 0,05$) (c) dia 0 vs dia 18 ($p < 0,01$). (d) dia 0 vs dia 18 ($p < 0,05$); ANOVA fatorial.

**APÊNDICE E – TABELAS REPRESENTATIVAS DOS DADOS DA POPULAÇÃO
CELULAR DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO TESTE COLD PLATE NOS 12° E 18°
DIAS DE TRATAMENTO COM PTX E / OU P1G10**

Número de neurônios e células periféricas totais no gânglio da raiz dorsal da medula (GRD).

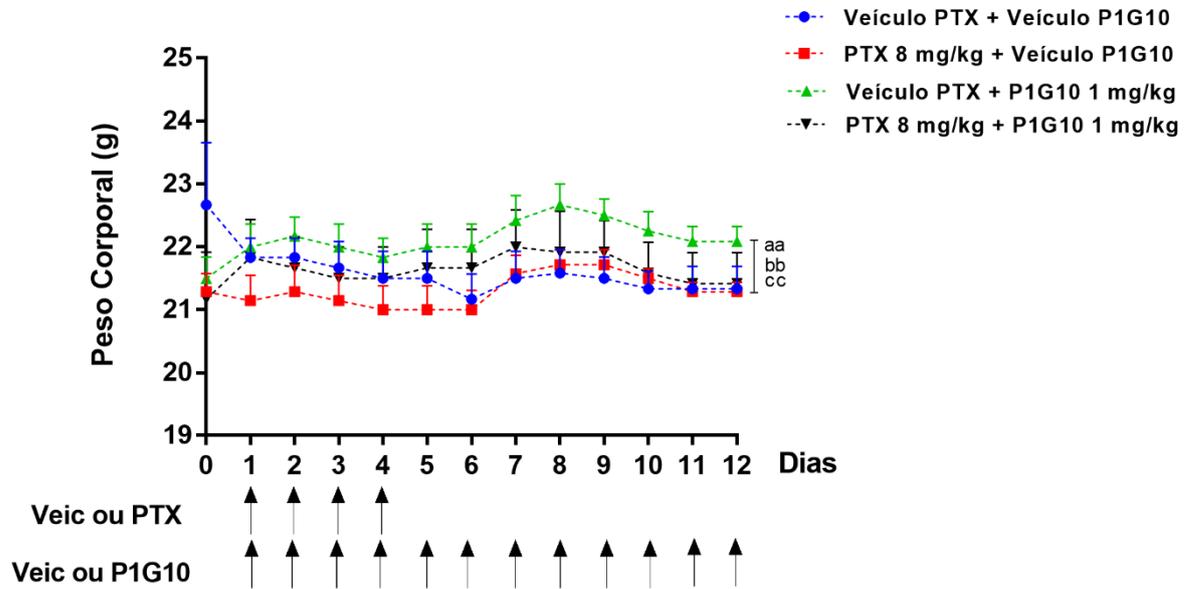
Neurônios totais				
Dias	Veículo (PTX) * + Veículo (P1G10)	PTX (8 mg/kg) * + Veículo (P1G10)	Veículo (PTX) * + P1G10 (1mg/Kg)	PTX (8mg/kg) * + P1G10 (1mg/kg)
12	133,0	106,0	105,0	136,0
18	99,0	74,5	99,0	113,0

* mediana

Células periféricas totais				
Dias	Veículo (PTX) * + Veículo (P1G10)	PTX (8 mg/kg) * + Veículo (P1G10)	Veículo (PTX) * + P1G10 (1mg/kg)	PTX (8mg/kg) * + P1G10 (1mg/kg)
12	298,0	180,0	261,0	290,5
18	407,0	305,0	373,0	377,0

* mediana

APÊNDICE F – RESULTADO DO PESO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO TESTE COLD PLATE



Peso corporal dos animais obtido durante a realização do teste Cold Plate. Animais BALB/c fêmeas (n= 25 animais) foram divididos em 4 grupos. Os tratamentos diários com PTX ou veículo (4 dias) e P1G10 ou veículo (12 dias) tiveram início no 1º dia experimental. As medidas do peso corporal foram realizadas por 12 dias consecutivos. Diferenças estatisticamente significativas: Veículo PTX (salina) + Veículo P1G10 (salina) vs Veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) ^{aa} $p < 0,01$; PTX (8 mg/kg) + Veículo P1G10 (salina) vs Veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) ^{bb} $p < 0,01$; PTX (8 mg/kg) + P1G10 (1 mg/kg) vs Veículo PTX (salina) + P1G10 (1 mg/kg) ^{cc} $p < 0,01$. (ANOVA fatorial, pós-teste Tukey).