

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALYSSON VINÍCIUS BRAGA

**ATIVIDADES DO ÁCIDO 4-((NITROOXI) METIL)-3-NITROBENZOICO EM
MODELOS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

Belo Horizonte
2023

ALYSSON VINÍCIUS BRAGA

**ATIVIDADES DO ÁCIDO 4-((NITROOXI) METIL)-3-NITROBENZOICO EM
MODELOS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Renes de Resende Machado

Coorientador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho

Belo Horizonte
2023

B813a Braga, Alysson Vinícius.
Atividades do ácido 4-((nitrooxi) metil)-3-nitrobenzoico em modelos de dor e inflamação [recurso eletrônico] / Alysson Vinícius Braga. – 2023.
1 recurso eletrônico (111 f. : il.) : pdf

Orientador: Renes de Resende Machado.
Coorientador: Márcio de Matos Coelho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Doadores de oxido nítrico – Teses. Óxido nítrico – Teses. 2. Dor – Teses. 3. Inflamação– Teses. 4. Citocinas – Teses. 5. Dor neuropática – Teses. 6. Paclitaxel – Teses. I. Machado, Renes de Resende. II. Coelho, Márcio de Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ATIVIDADES DO ÁCIDO 4-((NITROOXI) METIL)-3-NITROBENZÓICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR E INFLAMAÇÃO"

ALYSSON VINÍCIUS BRAGA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Dra. Adriana Cristina Soares de Souza
Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ

Dr. Paulo Sérgio de Almeida Augusto
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Felipe Rodrigues Fernandes
Faculdade Ciências da Vida

Profa. Dra. Débora Maria Abrantes Costa
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Renes de Resende Machado - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 02 de junho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Cristina Soares de Souza, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 17:33, 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 **Marcio de Matos Coelho, Coordenador(a) de curso**, em 02/06/2023, às 17:34, 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 **Débora Maria Abrantes Costa, Professora do Magistério Superior**, em 02/06/2023, às 17:34, 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 **Renes de Resende Machado, Professor do Magistério Superior**, em 02/06/2023, às 17:34, 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 **Felipe Fernandes Rodrigues, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 17:35, 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 **Paulo Sérgio de Almeida Augusto, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 17:37, 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 https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2359077 e o código CRC 26A6F7E9.

Dedico o grau de Doutor

A minha mãe, Maria Donizete Braga, meu pai, Charles Diniz, minha irmã Jhienny Braga, e ao meu companheiro Thiago Prata, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram em todas as etapas conquistadas na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado por mais essa etapa conquistada.

À minha mãe, Maria Donizete Braga, por ter sido minha base e minha fortaleza durante todos os anos da minha vida.

A minha irmã, Jhienny Braga e ao meu pai Charles Diniz, pela amizade, paciência e apoio.

Ao meu companheiro Thiago Prata por todo afeto, companheirismo e por sempre acreditar em mim.

Ao Prof. Renes, que me acolheu como um filho, acreditando na minha capacidade e me dando incentivo em todas as etapas desse projeto. Sou muito grato por conhecer pessoas que nos inspiram e com certeza, o professor Renes é uma dessas.

Ao Prof. Márcio, pelos conselhos e todos ensinamentos que foram repassados durante essa caminhada.

Aos Professores Renata Barbosa, Isabela César, Marília Goulart e André Barros pelo apoio e colaborações ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos, Ronei, Roniele, Lucas, Petalah, Júnia, Patrícia, Fabiane, Ana Flávia, Claudiane, João Paulo, Lidiane, Natália, Carol e Suellen por todo apoio e incentivo.

Aos colegas de laboratório Marcela, Sarah, Ivo, Felipe, Roger e Barbara por terem se transformado em grandes amigos, tornando mais leve o trabalho.

Aos amigos do biotério, Adelaide e Batista, pela dedicação e profissionalismo no atendimento e fornecimento dos animais.

À Faculdade de Farmácia, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, pelo suporte.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

RESUMO

O desenvolvimento de diferentes substâncias doadoras de óxido nítrico (NO) tem aumentado devido à contribuição da via de sinalização mediada por essa molécula na patogênese de diversas condições clínicas, incluindo manifestações inflamatórias e dolorosas. Quando se modifica a estrutura de fármacos para liberação de NO resulta-se em melhores atividades anti-inflamatória e antinociceptiva e também com um melhor perfil de segurança. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar as atividades do composto ácido 4-((nitrooxi) metil)-3-nitrobenzoico (RIY09), doador de NO, em modelos experimentais de dor e inflamação, bem como os possíveis mecanismos envolvidos. A administração intraperitoneal (i.p.) do composto RIY09 (100 ou 150 mg/Kg) inibiu a resposta nociceptiva induzida por calor e a alodínia mecânica induzida por carragenina. A atividade motora dos animais não foi alterada pela administração do composto RIY09 (150 mg/Kg, i.p.). O pré-tratamento com o composto RIY09 (50, 100 e 150 mg/Kg, i.p.) também reduziu o edema de pata induzido por carragenina. As atividades nos modelos de dor inflamatória e edema foram associadas à diminuição do recrutamento de neutrófilos e diminuição da produção de citocinas inflamatórias, como interleucina-1 β , interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e CXCL-1, e aumento da produção da citocina anti-inflamatória interleucina-10. A administração do composto RIY09 (50, 100 e 150 mg/Kg, i.p.) reduziu a alodínia mecânica induzida por paclitaxel no 7º dia de sensibilização com o quimioterápico. A administração prévia de AM251 (4 ou 8 mg/Kg, i.p.) e naltrexona (10 mg/Kg, i.p.), mas não de glibenclamida (20 ou 40 mg/Kg, *per os*), reduziu a atividade antinociceptiva do composto RIY09. O composto RIY09 também reduziu citocinas inflamatórias em estruturas como gânglios da raiz dorsal e tálamo. Cinco horas após a administração do RYI09 (150 mg/Kg, i.p.), houve aumento das concentrações plasmáticas de nitrito, indicando que o RIY09 possivelmente libera NO, um evento que se correlaciona com as suas atividades. Desse modo, nossos resultados demonstram que o composto RIY09 apresenta atividades antinociceptiva e anti-inflamatória nos modelos experimentais avaliados. Esses resultados reforçam o interesse na investigação de compostos doadores de NO como candidatos a fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.

Palavras chaves: doadores de NO; óxido nítrico; dor; inflamação; citocinas; ácido 4-((nitrooxi) metil)-3-nitrobenzoico; dor neuropática; paclitaxel.

ABSTRACT

The development of different nitric oxide (NO) donor substances has increased due to the contribution of the signaling pathway mediated by this molecule in the control of several clinical conditions, including inflammatory and painful manifestations. Structural modification for NO release may result in substances with better anti-inflammatory and antinociceptive activities and with a better safety profile. Thus, the aim of the present study was to evaluate the activities of the compound 4-((nitrooxy)methyl)-3-nitrobenzoic acid (RIY09), a NO donor, in experimental models of pain and inflammation, as well as the possible mechanisms involved. Intraperitoneal (i.p.) administration of compound RIY09 (100 or 150 mg/Kg) inhibited heat-induced nociceptive response and carrageenan-induced mechanical allodynia. The motor activity of the animals was not altered by the administration of 150 mg/Kg, i.p. of compound RIY09. Pretreatment with compound RIY09 (50, 100 and 150 mg/Kg, i.p.) also reduced carrageenan-induced paw edema. Activities in inflammatory pain and edema models were associated with decreased neutrophil recruitment and decreased production of inflammatory cytokines such as IL1 β , IL-6, TNF- α and CXCL-1, and increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The i.p. of the compound RIY09 (50, 100 and 150 mg/Kg) reduced the mechanical allodynia induced by paclitaxel on the 7th day of sensitization with the chemotherapy. Previous administration of AM251 (4 or 8 mg/Kg, i.p.) and naltrexone (10 mg/Kg, i.p.) but not glibenclamide (20 or 40 mg/Kg, p.o.), reduced the antinociceptive activity of compound RIY09. The RIY09 compound also reduced the production of inflammatory cytokines in structures such as DRGs and thalamus. After 5 h of i.p administration of compound RIY09 (150 mg/Kg) there was an increase in plasma nitrite concentrations, indicating that this compound possibly releases NO, correlating with the activities presented by this new compound. Thus, our results demonstrate that the compound RIY09 presents antinociceptive and anti-inflammatory activities in the evaluated experimental models. These results reinforce the interest in investigating NO donor compounds as candidates for analgesic and anti-inflammatory drugs.

Keywords: NO donos; nitric oxide; pain; inflammation; cytokines; 4-((Nitrooxy)methyl)-3-nitrobenzoic acid; neuropathic pain; paclitaxel.

LISTAS DE FIGURAS

1. Componentes da resposta inflamatória.....	17
2. Dor nociceptiva.....	23
3. Representação dos locais de ação de alguns agentes quimioterápicos no sistema nervoso periférico.....	28
4. Microscopia de transmissão do nervo isquiático de camundongos, mostrando a degeneração axonal causada pelo tratamento com paclitaxel.....	30
5. Imagens de microscopia de transmissão mostrando o processo de vacuolização (mitocôndrias atípicas) como consequência do tratamento com paclitaxel.....	31
6. Modulação do processamento nociceptivo pelo NO.....	41
7. Estrutura química do composto ácido 4-((nitrooxi] metil)-3-nitrobenzoico (RIY09).....	46
8. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.....	51
9. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	52
10. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 na coordenação motora dos animais.....	53
11. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	54
12. Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo RIY09 em modelo experimental de DN induzida pelo paclitaxel.....	56
13. Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo composto RIY09 após tratamento prévio com naltrexona, AM251 ou glibenclamida, sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	57
14. Efeito da pré-administração (30min) do composto RIY09 (50, 100 ou 150mg/Kg, <i>i.p.</i>), dipirona (500mg/Kg, <i>p.o.</i>) ou veículo (PEG 400 40%, <i>i.p.</i>) na resposta nociceptiva induzida pelo calor.....	59

15. Efeito da administração prévia (-30min) <i>i.p.</i> do composto RIY09 (50, 100 ou 150mg/Kg), dexametasona (Dexa; 2mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%) na alodínia mecânica induzida por administração <i>i.pl.</i> de carragenina (Cg; 400µg).....	60
16. Efeito da administração prévia (-30min) do composto RIY09 (150mg/Kg, <i>i.p.</i>), fenobarbital (50mg/Kg, <i>p.o.</i>) ou veículo (PEG 400 40%, <i>i.p.</i>) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante.....	61
17. Efeito da administração prévia (-30min) <i>i.p.</i> do composto RIY09 (50, 100 ou 150mg/Kg), dexametasona (Dexa; 2mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%) no edema da pata induzido pela administração <i>i.pl.</i> de carragenina (Cg; 400µg).....	62
18. Efeito da administração prévia (-30min) <i>i.p.</i> do composto RIY09 (150mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%) na produção de CXCL-1 (A), IL-6 (B), IL-1β (C), TNF-α (D) e IL-10 (E) induzidos pela administração <i>i.pl.</i> de carragenina (Cg; 400µg).....	64
19. Efeito da administração prévia (-30min) <i>i.p.</i> do composto RIY09 (150 mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%) na atividade de MPO induzida pela administração <i>i.pl.</i> de carragenina (Cg; 400µg).....	65
20. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, <i>i.p.</i>) ou pregabalina (30 mg/Kg, <i>p.o.</i>) sobre alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	67
21. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, <i>i.p.</i>) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em animais previamente (-15 min) tratados com naltrexona (Nalt; 5 ou 10 mg/Kg, <i>i.p.</i>)	69
22. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, <i>i.p.</i>) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em animais previamente (-30 min) tratados com glibenclamida (Glib; 20 ou 40 mg/Kg, <i>i.p.</i>)	70
23. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, <i>i.p.</i>) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em animais previamente (-15 min) tratados com AM251 (AM251; 4 ou 8 mg/Kg, <i>i.p.</i>)	71
24. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, <i>i.p.</i>), sobre a produção de CXCL-1 nos DRG (A) e tálamo (B)	73
25. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, <i>i.p.</i>) sobre a produção de TNF-α nos DRG (A) e tálamo (B)	74

26. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, i.p.) sobre a produção de IL-1 β nos DRG (A) e tálamo (B)	75
27. Concentrações plasmáticas de nitrito 5h após administração <i>i.p.</i> do composto RIY09 (150 mg /Kg) ou veículo (PEG 400 40%).....	76

LISTA DE TABELAS

1. Estudos que investigaram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de doadores de NO, modificados estruturalmente, em modelos experimentais.....	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINE: Anti-inflamatório não esteroide
AIE: Anti-inflamatório esteroide
ATP: Adenosina trifosfato
CB1: Receptor canabinoide 1
CCI: constrição do nervo isquiático.
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA: Adjuvante Completo de Freund
COX: Ciclooxigenase
CXCL-1: Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Dexa: Dexametasona
DMSO: Dimetilsulfóxido
DN: Dor neuropática
DNIQ: Dor neuropática induzida por quimioterápico
et al.: e outros
ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática
EUA: Estados Unidos da América
H: Hora
i.p.: Intraperitoneal
i.pl.: Intraplantar
IASP: International Association for the Study of Pain
IFN: Interferon
IL: Interleucina
K_{ATP}: (Canais) para potássio dependentes de ATP
Kg: Quilograma
LPS: Lipopolissacarídeo
LT: Leucotrieno
Ltda: Limitada
mg: Miligrama
mL: Mililitro
MPO: Mieloperoxidase
n: Número de animais experimentais
NF-κB: Fator nuclear kappa B

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

P: Probabilidade de significância

p.: Página

p.o.: *Per os*

p/v: Concentração em peso por volume

PAF: Fator de ativação plaquetária

PGE₂: Prostaglandina E₂

ROS: Espécie reativa de oxigênio

rpm: Rotações por minuto

s: Segundo

SNC: Sistema nervoso central

TNF: Fator de necrose tumoral

TRPV1: Receptores de potencial transitório vaniloide tipo 1

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

v: Volume

µg: Micrograma

µL: Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1.Aspectos Gerais da inflamação	17
1.2.Aspectos Gerais da dor.....	20
1.2.1. Dor nociceptiva.....	22
1.2.2. Dor inflamatória.....	23
1.2.3. Dor disfuncional.....	24
1.2.4. Dor neuropática.....	25
1.2.4.1.Dor neuropática induzida por quimioterápico.....	27
1.2.4.2.Dor neuropática induzida por paclitaxel.....	28
1.3.Farmacoterapia da dor e inflamação.....	32
1.4.Papel fisiológico do NO.....	39
1.5.Doadores de NO.....	42
1.6.Composto ácido 4-((nitrooxi) metil)-3-nitrobenzoico.....	45
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVO.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1.Animais.....	49
4.2.Drogas e reagentes.....	49
4.3.Preparo, doses e vias de administração das soluções e suspensões.....	50
4.3.1. Preparo da suspensão de RIY09.....	50
4.3.2. Preparo da solução de Dipirona, dexametasona, fenobarbital e suspensão de pregabalina.....	50
4.3.3. Suspensão de carragenina.....	50

4.3.4. Suspensão de paclitaxel.....	50
4.3.5. Soluções de naltrexona, glibenclamida e AM251.....	50
4.4.Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor	51
4.5.Avaliação da alodínia mecânica.....	51
4.6.Avaliação dos efeitos induzidos pelo RIY09 sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	52
4.7.Avaliação dos efeitos induzidos pelo RIY09 sobre a coordenação motora	53
4.8.Avaliação dos efeitos induzidos pelo RIY09 sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	53
4.9.Avaliação da produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e CXCL-1 induzida por carragenina.....	54
4.10. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	57
4.11. Avaliação do efeitos induzido pelo composto RIY09 no modelo de DN induzida por paclitaxel.....	55
4.12. Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida e AM251 sobre a atividade antinociceptiva do composto RIY09 no modelo experimental de DN induzida por paclitaxel.....	56
4.13. Avaliação do efeito induzido pelo composto RIY09 sobre as concentrações de TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β em estruturas do processamento nociceptivo no modelo de DN induzida por paclitaxel.....	57
4.14. Avaliação da concentração plasmática de nitrito.....	57
4.15. Análise estatística.....	58
5. RESULTADOS.....	59
5.1.Efeito do composto RIY09 na resposta nociceptiva induzida por calor.....	59
5.2.Efeito do composto RIY09 na alodínia mecânica induzida por carragenina.....	59
5.3.Efeito induzido pelo composto RIY09 sobre a coordenação motora.....	61
5.4.Efeito do composto RIY09 no edema de pata induzida por carragenina.....	61

5.5.Efeitos induzidos pelo composto RIY09 sobre a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e CXCL-1 na pata.....	63
5.6.Efeitos induzidos pelo composto RIY09 sobre a atividade da MPO.....	65
5.7.Efeito induzido pela RIY09 sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel.....	66
5.8.Efeitos induzidos pela naltrexona, glibenclamida ou AM251 sobre a atividade antinociceptiva do RIY09.....	68
5.9.Efeitos induzidos pelo RIY09 sobre a produção de CXCL-1, TNF- α e IL-1 β nas estruturas DRG e tálamo.....	72
5.10. Efeito induzido pelo composto RIY09 sobre a concentração plasmática de nitrito.....	76
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO.....	88
8. PERSPECTIVAS.....	89
9. MANUSCRITO PUBLICADO.....	90
10. REFERÊNCIAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da inflamação

A inflamação é uma resposta adaptativa que pode ser desencadeada por diversos estímulos e/ou condições nocivas, como infecções, lesões teciduais, cânceres, doenças autoimunes, depressão, doenças cardiovasculares e metabólicas como o Diabetes Mellitus tipo II (SCRIVO *et al.*, 2011). Em condições normais a resposta inflamatória possui um papel benéfico, como por exemplo, no controle e proteção de processos infecciosos, mas pode tornar-se prejudicial quando esse processo ocorre de forma desregulada e exacerbada, como acontece na sepse e em estados inflamatórios crônicos como a osteoartrite (MEDZHITOV, 2008).

Normalmente o processo inflamatório ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, envolvendo diversas células como as do sistema imunológico, dos vasos sanguíneos e diversos mediadores inflamatórios. A inflamação consiste em cinco sinais e sintomas clássicos: rubor, tumor, calor, dor e perda de função (MEDZHITOV, 2008; KOTAS & MEDZHITOV, 2015).

Basicamente uma resposta inflamatória consiste em quatro componentes: estímulos ou indutores inflamatórios, os sensores ou receptores que os detectam, mediadores inflamatórios e o tecido e/ou células alvo (Fig. 1).

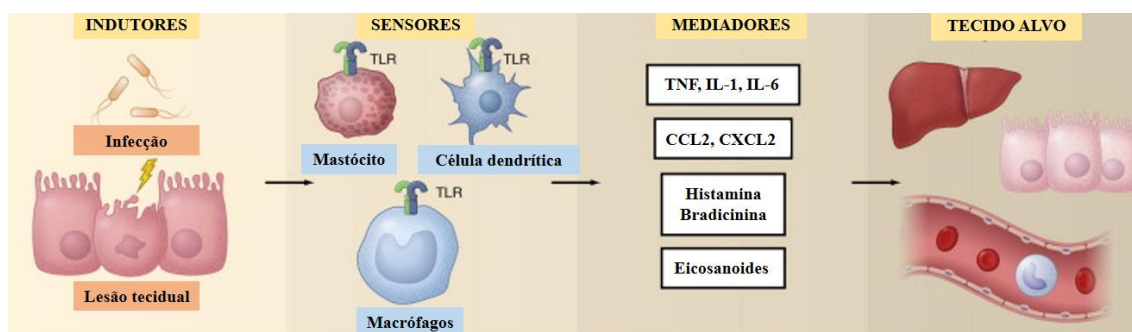


Figura 1. Componentes da resposta inflamatória. Adaptada de MEDZHITOV (2008).

Vários mediadores podem contribuir para o processo inflamatório, como bradicinina, prostaglandinas (PGs), leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanos, fator de ativação plaquetária (PAF) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Em especial, podem ser citadas as citocinas, que são um grupo diversificado de peptídeos e

glicopeptídeos, secretadas por diferentes células em resposta a uma variedade de estímulos (MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Fazem parte deste grupo: as interleucinas (ILs) como IL-1 β e IL-6, interferons (IFNs), quimiocinas (CXCL1, CXCL2) e fatores de necrose tumoral (TNFs) como TNF- α (KANY *et al.*, 2019; ZHANG & AN, 2007).

O tipo de mecanismo desencadeado em determinadas condições inflamatórias depende da origem do estímulo inflamatório. Por exemplo, durante a resposta imune inata, estímulos bacterianos normalmente são detectados por meio dos receptores *Toll-like* (TLRs), que são expressos em macrófagos residentes do tecido. A ativação desses receptores induz a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, quimiocinas (CCL2 e CXCL2) e PGE₂. A ligação aos receptores TLRs resulta na ativação das vias do fator nuclear kappa B (NF κ B) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias. O aumento da produção desses mediadores pode gerar vasodilatação, aumento do extravasamento de neutrófilos e comprometimento do tecido. As células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e mastócitos, serão as responsáveis pela destruição dos patógenos (MEDZHITOV, 2010; LIBBY, 2007).

Quando ocorre uma lesão tecidual, sem a participação efetiva de patógenos bacterianos, a inflamação acontece em decorrência da tentativa de reparação do tecido danificado. Em situações normais as células mesenquimais e epiteliais são separadas por uma membrana basal. A ruptura dessa membrana acarreta em um desequilíbrio homeostático, resultando em respostas de reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008). Inicialmente, macrófagos residentes induzem respostas inflamatórias por meio da produção de mediadores inflamatórios, que também serão responsáveis pela sensibilização de nociceptores, responsáveis pela sensação de dor no local afetado. A inflamação e a nocicepção estão intimamente ligadas por vários processos, como a formação de exsudato, a formação do edema tecidual e a liberação de mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2010). Esses processos podem ser responsáveis pelo aparecimento da dor inflamatória, como abordaremos a frente com maiores detalhes.

A inflamação pode ser classificada de acordo com a sua duração em aguda ou crônica. A inflamação aguda possui um tempo de duração relativamente curto podendo variar de

horas a dias, e suas principais características são o processo de vasodilatação, resultando em eritema, seguido pelo extravasamento de plasma e constituintes plasmáticos para o local afetado, contribuindo para o desenvolvimento do edema tecidual. O aumento do fluxo de constituintes plasmáticos do compartimento intravascular para o interstício, acontece devido aumento da permeabilidade capilar gerado por substâncias como histamina, bradicinina, leucotrienos e substância P. O processo de vasodilatação também pode ser mediado pela liberação local de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas vasodilatadoras, como PGE₂ e PGI₂. O aumento do fluxo sanguíneo facilita a liberação local de mediadores inflamatórios e o processo de migração leucocitária, particularmente dos neutrófilos. A migração neutrofílica é facilitada graças a regulação positiva de moléculas de adesão nas células endoteliais promovendo o influxo desses leucócitos para o local lesionado (MEDZHITOV, 2010; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004; RYAN & MAJNO, 1977).

A resposta inflamatória aguda é normalmente finalizada assim que os indutores inflamatórios são eliminados e o dano tecidual é reparado. A transição do término da resposta inflamatória para o estado homeostático é conhecida como resolução da inflamação. Nessa fase, ocorre diminuição da síntese de mediadores pró-inflamatórios, interrompendo o recrutamento de leucócitos e a formação do edema tecidual. Durante a resolução, os leucócitos, particularmente os neutrófilos remanescentes, sofrem apoptose e subsequente processo de eferocitose por macrófagos diferenciados que possuem ação pró-resolutiva. Assim como a fase inicial da inflamação, a resolução também é coordenada e regulada pela produção de mediadores, que são denominados pró-resolutivos. Normalmente, esses mediadores são liberados durante o processo de apoptose de neutrófilos e/ou eferocitose por macrófagos. Esses mediadores possuem naturezas diversas, podendo destacar as lipoxinas (LXA4), resolvinas (RvD1), protectinas, maresinas e anexina A1 (AnxA1), entre outros. Os mediadores pró-resolutivos, além de inibir o recrutamento de neutrófilos e estimular o processo de remodelamento tecidual, podem aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (FEEHAN & GILROY, 2019; FULLERTON & GILROY, 2016; SUGIMOTO *et al.*, 2016).

Se a resposta inflamatória aguda não conseguir eliminar o indutor inflamatório, a inflamação persiste e adquire novas características. Ocorre então, falha na resolução da inflamação, tornando o processo inflamatório de forma crônica e conseqüentemente com

problemas no desenvolvimento da imunidade adaptativa (FULLERTON & GILROY, 2016). O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e linfócitos e resulta em diferentes tipos de remodelamento tecidual. Esse estado pode ser causado por infecções crônicas, danos não reparados aos tecidos, alérgenos persistentes, partículas estranhas não degradáveis ou cristais endógenos (urato monossódico) e respostas autoimunes (persistência de antígenos próprios). De forma geral, os mecanismos dos processos inflamatórios crônicos não são tão bem compreendidos e podem variar bastante entre estímulos e causas persistentes (MEDZHITOV, 2010). Doenças inflamatórias crônicas, como lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal e artrite reumatoide, possuem um alto impacto para a saúde pública, pois o processo inflamatório pode persistir por meses e anos, diminuindo a qualidade de vida do indivíduo (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV *et al.*, 2008).

1.2. Aspectos gerais da dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido (RAJA *et al.*, 2020). A dor também é considerada um fenômeno multidimensional, estando associada a vários componentes, incluindo sensoriais, fisiológicos, afetivos, comportamentais e espirituais (OMS, 2012). A dor atua como um mecanismo de proteção e um sistema de alarme para muitas condições patológicas, sendo o sintoma mais comumente associado à procura de auxílio médico (MICKLE *et al.*, 2016; LOESER & MELZACK, 1999). Esse sintoma justifica mais de 70% das consultas médicas em consultórios brasileiros (ROCHA *et al.*, 2007). No mundo, a prevalência da dor crônica é estimada em 27,5% com variação entre 10% a 50% entre os países, sendo essa estimativa semelhante àquela encontrada no Brasil (ZIMMER *et al.*, 2022; VASCONCELOS & ARAÚJO, 2018). E essa prevalência aumenta para 33% em países de média e baixa renda (JACKSON *et al.*, 2015), acometendo mais mulheres, idosos e moradores da zona rural (ZIMMER *et al.*, 2022).

O termo amplamente utilizado para definir esse sintoma, principalmente para estudos em animais experimentais, é nocicepção, que explica os mecanismos e vias neurais para codificação e processamento dos estímulos nocivos (LOESER & TREEDE, 2008). Geralmente, ocorre uma propagação de potenciais de ação que começam com a ativação de neurônios sensoriais chamados nociceptores, que estão presentes em diversos órgãos e

tecidos como epitelial, muscular, articulações, entre outros (GOLD & GEBHART, 2010). Os nociceptores geralmente identificam diversos estímulos como mecânicos térmicos ou químicos, dando origem ao processo de nocicepção (MICKLE *et al.*, 2016; BAUSBAUM *et al.*, 2009). Após a detecção dos estímulos pelos nociceptores, os potenciais de ação são transmitidos aos neurônios de segunda ordem localizados na medula espinhal ou tronco cerebral, com posterior participação talâmica, sendo interpretados como estímulos nocivos pelo córtex cerebral (MICKLE *et al.*, 2016; JULIUS, 2013; ROCHA *et al.*, 2007).

As fibras A δ e C são fibras envolvidas na detecção de estímulos nocivos e transdução desses estímulos em sinais elétricos e sua condução à medula espinhal ou tronco cerebral. As fibras A δ , são mielinizadas e, conseqüentemente, a transmissão dos potenciais de ação ocorre rapidamente. As fibras C, por sua vez, não são mielinizadas e conduzem os potenciais de ação de forma lenta (GOLD & GEBHART, 2010; ROCHA *et al.*, 2007).

Os nociceptores são funcionalmente caracterizados pelo tipo de receptores sensoriais/canais iônicos expressos na membrana plasmática. Esses receptores pertencem a família de receptores de potencial transitório (TRP) e sua funcionalidade varia com a temperatura, estímulos químicos ou forças mecânicas. Os TRPs são canais catiônicos não seletivos, que, quando ativados, transduzem um estímulo externo em uma mudança de potencial de membrana, abrindo canais para Na⁺/Ca²⁺ ou fechando canais para K⁺ (MICKLE *et al.*, 2016; VARDEH *et al.*, 2016).

Após a ocorrência de algum dano tecidual, substâncias químicas podem ser liberadas extracelularmente e modular a ativação de neurônios sensoriais. Entre os mediadores químicos responsáveis pela ativação de neurônios sensoriais, destacam-se a histamina, substância P, serotonina, bradicinina, acetilcolina, leucotrienos e prostaglandinas. Cada um desses mediadores interage com os nociceptores, aumentando ainda mais a sensibilização a estímulos nocivos. Esse fenômeno representa um mecanismo periférico pelo qual a lesão tecidual promove hipersensibilidade estímulos nocivos (JULIUS, 2013; BAUSBAUM *et al.*, 2009).

A duração da dor é uma característica mensurável que permite a diferenciação entre dor aguda e dor crônica. A dor crônica geralmente é reconhecida como uma dor que persiste

por mais de três meses, perdendo a função de alerta que ocorre na dor aguda. Esse tipo de dor está associado a um sofrimento emocional significativo, com interferência nas atividades cotidianas e na interação social do paciente (TREEDE *et al.*, 2015).

Existem vários tipos distintos de dor, que são classificados de acordo com a sua causa como dor nociceptiva, inflamatória, disfuncional e neuropática. Cada tipo de dor será abordado adiante com maiores detalhes. Os mecanismos neurobiológicos responsáveis por esses diferentes tipos de dor fornecem melhor compreensão dos tipos de dor gerados por diferentes fatores etiológicos em determinados pacientes e uma terapia mais direcionada (VARDEH *et al.*, 2016; COSTIGAN *et al.*, 2009; WOOLF, 2004).

1.2.1. Dor nociceptiva

A dor nociceptiva se manifesta como consequência de uma lesão atual ou futura em um tecido não neural e decorre da ativação de nociceptores que detectam a presença de estímulos potencialmente prejudiciais (TEIXEIRA *et al.*, 2016; HEHN *et al.*, 2012; WOOLF, 2004). De acordo com a localização dos nociceptores, a dor nociceptiva pode ser subdividida em dor somática e visceral (OMS, 2012).

A dor somática é desencadeada pela ativação de nociceptores em tecidos superficiais como (pele e mucosas) ou tecidos profundos (tecidos ósseo, muscular, conjuntivo e articulações). Cortes e entorses são exemplos de causas de dor somática superficial, enquanto as câibras musculares podem resultar em dor somática profunda. A dor visceral, por sua vez, é causada pela ativação de nociceptores localizados nas vísceras torácicas e abdominais (OMS, 2012).

Como mencionado anteriormente, a transdução de estímulos mecânicos, térmicos e químicos na dor nociceptiva ocorre por atividade elétrica nos nociceptores. Na ausência de estímulos, há pouca atividade espontânea dos nociceptores, devido a uma grande condutância de K^+ através de canais iônicos. Existem receptores específicos para a transdução de cada estímulo (Fig. 2), mas apenas a presença desse transdutor não necessariamente confere sensibilidade ao estímulo. Por exemplo, a presença de TRPM8, um transdutor de estímulo frio, não é suficientemente capaz de conferir a sensibilidade ao frio. A sensibilidade ao frio também pode depender da expressão de canais para K^+ (GOLD & GEBHART, 2010).

A dor nociceptiva deve ser controlada apenas em situações clínicas específicas, como procedimentos cirúrgicos ou traumas, evitando que este sistema seja incapacitado. Dessa forma, ocorre preservação da função protetora e, conseqüentemente, preservação de tecidos, caracterizando a dor nociceptiva como uma sensação fisiológica vital (WOOLF, 2004).

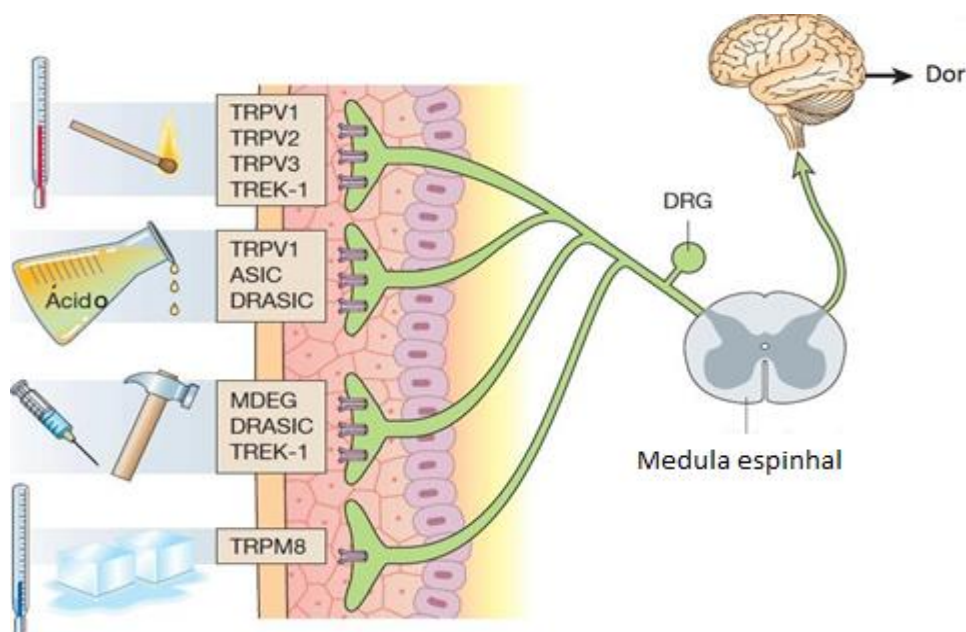


Figura 2. Dor nociceptiva. Adaptada de SCHOLZ & WOOLF (2002).

1.2.2. Dor inflamatória

A dor inflamatória ocorre devido à ativação e/ou sensibilização direta de nociceptores induzida por mediadores inflamatórios (VADEH *et al.*, 2016; WOOLF, 2004; SCHOLZ & WOOLF, 2002). Esse tipo de dor influencia negativamente na qualidade de vida dos pacientes, principalmente na realização de atividades normais, em decorrência da redução do funcionamento e mobilidade da área acometida (COBOS *et al.*, 2012).

Os danos teciduais são acompanhados pelo acúmulo de mediadores liberados de nociceptores ativados ou células não neurais que residem ou se infiltram na área afetada como mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. Esses mediadores são de naturezas diversas e incluem aminas bioativas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, bradicinina, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), fator de crescimento neural (NGF) e citocinas como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), entre outros (VADEH *et al.*, 2016; BASBAUM *et al.*, 2009).

Os nociceptores expressam um ou mais receptores de superfície celular capazes de reconhecer e responder a esses mediadores. A interação dos mediadores inflamatórios aumenta a excitabilidade dos nociceptores, gerando um aumento da sensibilidade a estímulos térmicos ou mecânicos, por exemplo (BASBAUM *et al.*, 2009). Os mediadores inflamatórios também induzem mudanças pós-transducionais de nociceptores. Um exemplo é o NGF, que pode aumentar a expressão do canal TRPV1 e, conseqüentemente, a transdução de estímulos nos nociceptores (VADEH *et al.*, 2016). Além disso, os mediadores também aumentam a excitabilidade e a sinalização dos nociceptores por aumentar a expressão de canais para sódio voltagem dependentes, como Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 (VADEH *et al.*, 2016; CHAHINE & O'LEARY, 2014).

Também ocorre um aumento da expressão de COX-2 nos neurônios da medula espinhal após inflamação periférica, decorrente da resposta gerada por citocinas de ação sistêmica como IL-1 β . Como resultado, ocorre aumento da produção de PGE₂ no sistema nervoso central (SNC), o que poderia explicar o quadro hiperalgésico que ocorre em determinadas situações inflamatórias (SAMAD *et al.*, 2001).

1.2.3. Dor disfuncional

A dor disfuncional é uma designação relativamente nova, sendo classificada como um tipo de dor crônica. As síndromes dolorosas disfuncionais englobam diversas doenças que possuem em comum a ausência de lesão tecidual que justifique a sensação dolorosa. Entre essas, destacam-se a fibromialgia, a síndrome do intestino irritável, a doença da articulação temporomandibular, a cistite intersticial, a migrânea e outras cefaleias primárias (SPECIALI *et al.*, 2016; NAGAKURA, 2015).

Atualmente, as prevalências de dores disfuncionais são razoavelmente altas, sendo de 2-8% para fibromialgia, 7-21% para síndrome do intestino irritável e 0,05-0,5% para a cistite intersticial/síndrome da bexiga dolorosa. A presença dessas desordens reduz significativamente a qualidade de vida dos pacientes (NAGAKURA, 2015).

Essas síndromes são causadas pelo mau funcionamento do aparelho somatossensorial e ocorrem em situações em que não há estímulo nocivo identificável no sistema nervoso (COSTIGAN *et al.*, 2009). Entretanto, ainda não estão bem elucidadas as alterações

neuroquímicas e os marcadores dessa condição dolorosa (NAGAKURA, 2015; SPECIALI *et al.*, 2016).

Em condições como fibromialgia, síndrome do intestino irritável e cistite intersticial, a dor está relacionada com uma amplificação autônoma de sinais nociceptivos no SNC, juntamente com a alteração do processamento sensorial (COSTIGAN *et al.*, 2009; VADEH *et al.*, 2016).

A farmacoterapia analgésica disponível não proporciona alívio adequado da dor disfuncional. Em parte, isso se deve à falta de compreensão dos mecanismos biológicos dessa condição dolorosa (NAGAKURA *et al.*, 2015).

1.2.4. Dor neuropática

A dor neuropática (DN) é a dor causada por lesões ou doenças do sistema somatossensorial, que é responsável pela percepção de toque, pressão, dor, temperatura, vibrações e movimentos (COLLOCA *et al.*, 2017; MEACHAM *et al.*, 2017). As prevalências da DN na população mundial variam de 6,9 a 10%, sendo mais comum em mulheres e pacientes idosos (COLLOCA *et al.*, 2017; POSSO *et al.*, 2016; VAN HECKE *et al.*, 2014). As causas mais comuns da DN são as infecções pelo vírus varicela-zoster, lesões dos nervos trigêmeos, radiculopatia dolorosa, neuropatia diabética, infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), amputações, hanseníase, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral (AVC), deficiência de vitamina B₁₂, câncer e quimioterapia (COLLOCA *et al.*, 2017; MEACHAM *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017).

Assim como outras condições dolorosas crônicas, a DN também está associada a vários fatores que afetam negativamente a vida dos pacientes, como ansiedade, insônia, mau humor e depressão, ocasionando uma redução da qualidade de saúde. Essa condição também implica em um aumento do número de prescrições medicamentosas e cuidados dos profissionais da saúde, resultados decorrentes de falhas da farmacoterapia (COLLOCA *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017).

Os sintomas da DN são classificados em positivos e negativos. Os sintomas positivos correspondem às sensações do tipo parestesias e disestesias, sendo dolorosas e, geralmente, descritas como queimaduras, formigamentos ou picadas. Esses sintomas

estão associados à hiperalgesia, que é um aumento da dor após contato com um estímulo que normalmente provoca dor, e alodínia, que é a dor após contato com um estímulo que normalmente não provocaria a dor. Os sintomas negativos são sensações do tipo anestesia tátil, hipoestesia térmica e perda de sensação vibratória (ZILLIOX, 2017; NICKEL *et al.*, 2012). Geralmente, esses sintomas são descritos como desconfortáveis pelo paciente, mas não dolorosos, e ocorrem devido à lesão direta dos neurônios sensoriais, gerando morte celular e comprometimento da transdução sensorial (HEHN *et al.*, 2012; NICKEL *et al.*, 2012).

Após lesões das fibras C e fibras A δ , causadas por toxinas, medicamentos e mediadores inflamatórios, ocorre uma alteração da densidade dessas fibras e uma hiperexcitabilidade neuronal, com mudança da expressão gênica e ativação de uma resposta imunológica. A hiperexcitabilidade neuronal pode ser explicada pelo aumento da expressão de isoformas de canais para sódio voltagem dependentes do tipo Nav. Os canais Nav também são expressos nos gânglios da raiz dorsal (DRG), originando potenciais de ação anormais ao longo da via nociceptiva. Dessa forma, a alteração da expressão e distribuição dos canais Nav nos neurônios sensoriais é responsável pela produção de potenciais de ação de origem espontânea. Esse fenômeno é chamado de atividade ectópica e explica o relato de dor que ocorre na ausência de qualquer estímulo externo. Esses canais são ativados após a detecção de estímulos pelos receptores do tipo TRP (TRPA1/TRPV4 para estímulos mecânicos, TRPA1/TRPM8 para frio e TRPV1 para calor) (COLLOCA *et al.*, 2017; MEACHAM *et al.*, 2017; GARCIA-LARREA, 2014; HEHN *et al.*, 2012).

A hiperexcitabilidade periférica induz a sensibilização de neurônios de segunda ordem na região do corno dorsal da medula espinhal ou tronco cerebral, ocasionando uma estimulação excitatória central (NICKEL *et al.*, 2012). O aumento da atividade dos canais para Ca²⁺ contribui significativamente para a liberação de neurotransmissores excitatórios nos terminais das fibras nociceptivas. O glutamato, um desses neurotransmissores envolvidos no processamento nociceptivo, interage com três receptores: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazepropiônico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e os receptores acoplados à proteína G (GARCIA-LARREA, 2014; NICKEL *et al.*, 2012).

O diagnóstico preciso da DN ainda é um obstáculo, pois não existe um teste diagnóstico ou um sintoma específico dessa condição. Levam-se em consideração a história prévia e

o exame físico do paciente. Deve ser realizada uma avaliação clínica cuidadosa, analisando a intensidade, a duração e a localização dos sintomas descritos pelos pacientes. Geralmente, empregam-se testes sensoriais que avaliam diferentes modalidades como toque leve, vibração, temperatura (ZILIOX, 2017).

1.2.4.1. Dor Neuropática induzida por quimioterápico

Um dos grandes problemas enfrentados por pacientes com câncer submetidos à quimioterapia é a neuropatia periférica induzida por quimioterápico (NPIQ), geralmente acompanhada de DN (SISIGNANO *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2013). Essa condição afeta cerca de 40% dos pacientes submetidos à quimioterapia, persistindo por anos após o tratamento (WOLF *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2013). Fatores como idade do paciente, dose, duração da farmacoterapia, co-administração com outros agentes quimioterápicos e condições patológicas pré-existentes, como diabetes, influenciam no desenvolvimento e evolução da NPIQ (WOLF *et al.*, 2008). A presença dessa condição, além de diminuir acentuadamente a qualidade de vida dos pacientes, limita a dose e a seleção de fármacos que serão empregados na quimioterapia (PARK *et al.*, 2013; CAROZZI *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014).

A dor neuropática induzida por quimioterápico (DNIQ) pode ocorrer após o tratamento com diversos fármacos antineoplásicos, como os compostos de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), alcaloides da vinca (vincristina, vinblastina), talidomida e bortezomibe (CAROZZI *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2013). Os sintomas mais frequentes são dor aguda, parestesias, disestesias e alodínia mecânica (SISIGNANO *et al.*, 2014; WOLF *et al.*, 2008). As terminações de neurônios sensoriais presentes nas extremidades das mãos e dos pés são inicialmente as mais afetadas (Fig. 3) (PARK *et al.*, 2013).

A gênese da DNIQ está associada à neurotoxicidade dos quimioterápicos, normalmente envolvendo estruturas como terminais de neurônios sensoriais, DRG e medula espinhal (Fig. 3) (CAROZZI *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2013). Os DRG, devido à sua vulnerabilidade, parecem ser um dos principais alvos desses agentes neurotóxicos, justificando o grande envolvimento sensorial em pacientes que apresentam NPIQ (PARK *et al.*, 2013). A quimioterapia ocasiona perda de terminais sensoriais,

alterações de receptores de membrana e da sinalização intracelular, o que resulta em mudança na excitabilidade e na neurotransmissão (BOYETTE-DAVIS et al., 2015).

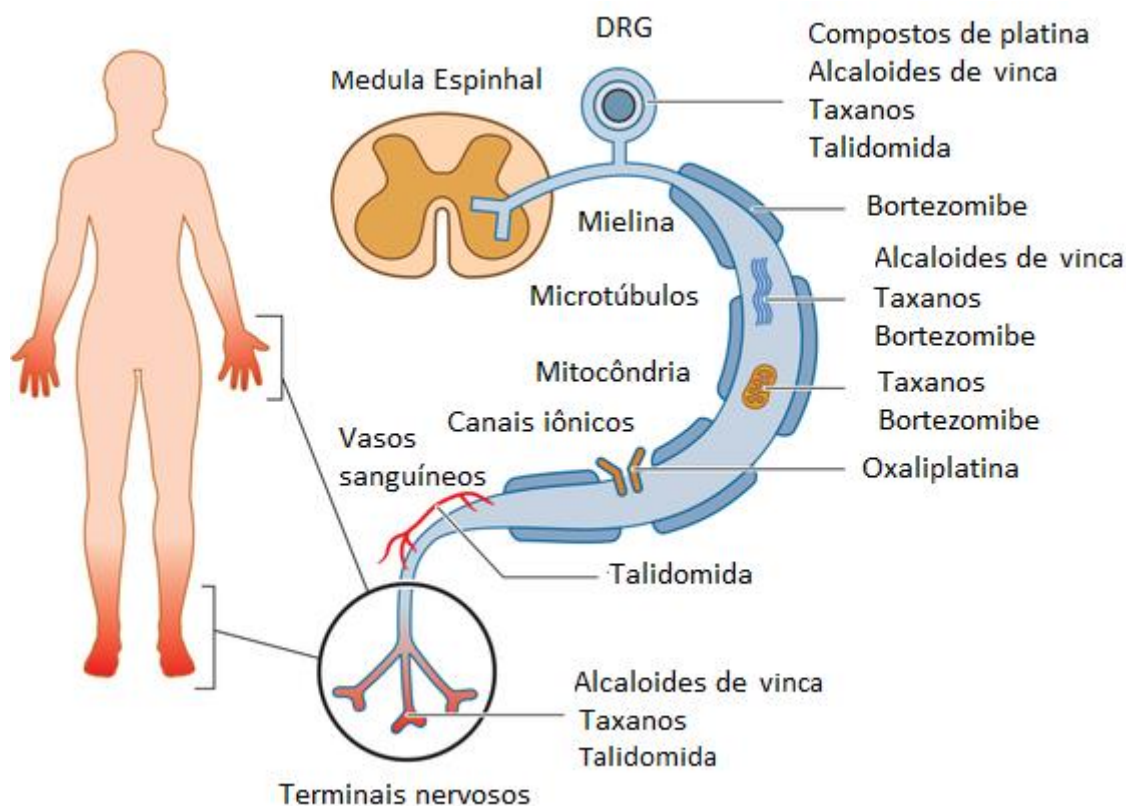


Figura 3. Representação dos locais de ação de alguns agentes quimioterápicos no sistema nervoso periférico. Adaptado de PARK *et al.* (2013).

1.2.4.2. Dor Neuropática induzida por paclitaxel

Um dos principais fármacos antineoplásicos descritos na clínica como causadores de DNIQ é o paclitaxel. Em um estudo realizado por Reyes-Gibby *et al.* (2009), de todos os pacientes com câncer de mama submetidos à quimioterapia com paclitaxel, cerca de 64 % apresentaram NPIQ e, entre esses, 27 % foram diagnosticados com DNIQ, afetando negativamente a sua qualidade de vida. O paclitaxel é um agente antiproliferativo extraído da planta *Taxus brevifolia* (WANI *et al.*, 1971) e utilizado no tratamento de pacientes com vários tipos de câncer como o de mama, pulmão, cérebro e ovário. A ação antiproliferativa resulta da inibição da divisão celular através da sua ligação a microtúbulos em crescimento (CAROZZI *et al.*, 2015; MARUPUDI *et al.*, 2007).

Por ser um fármaco lipofílico, o paclitaxel apresenta ampla distribuição tecidual, além de alta ligação às proteínas plasmáticas (88-98%) (MARUPUDI *et al.*, 2007). Após administração intravenosa, o paclitaxel acumula-se em grandes concentrações nos DRG e, em menores concentrações, no nervo isquiático, na medula espinhal e em algumas regiões cerebrais (CAVALETTI *et al.*, 2000). Esse fato justifica um dos principais efeitos adversos relatados pelo paclitaxel que é a neurotoxicidade, que pode ocorrer em decorrência da interrupção da função dos microtúbulos neurais, o que pode resultar em uma alteração do transporte axonal e, conseqüentemente, alteração da excitabilidade e sobrevivência dos neurônios sensoriais (SISIGNANO *et al.*, 2014). Os sintomas como parestesias e perda de sensibilidade, aparecem inicialmente nos pés dos pacientes, ocorrendo, posteriormente, nas mãos, como resultado da degeneração de axônios distais (CAROZZI *et al.*, 2015). Após a administração de paclitaxel, o pico de sensação dolorosa pode ocorrer em torno de três a quatro dias (SISIGNANO *et al.*, 2014).

Vários mecanismos contribuem para a DN induzida pelo paclitaxel. Em um estudo com pacientes em tratamento com paclitaxel, Dougherty *et al.* (2004) observaram que o quimioterápico promove lesão principalmente de fibras aferentes A e, em menor extensão, de fibras aferentes C. O tratamento também induzir uma degeneração axonal grave (Fig. 4) em nervos sensoriais e, conseqüentemente, uma diminuição da densidade axonal, com perda da integridade da mielina (CHEN *et al.*, 2017).

O paclitaxel altera a estrutura e a permeabilidade de mitocôndrias presentes nas fibras nociceptivas. Isso acontece em decorrência da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, ocasionando perda do potencial de membrana da mitocôndria. Conseqüentemente, aumenta-se a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de Ca^{2+} e redução das concentrações de trifosfato de adenosina (ATP). Ocorre então, um fenômeno descrito como vacuolização da mitocôndria (Fig. 5), seguido da perda da funcionalidade mitocondrial em axônios de neurônios sensoriais. Como as mitocôndrias são responsáveis pela regulação intracelular de Ca^{2+} , a alteração da sua permeabilidade é, então, responsável pelo aumento da propagação de sinais de Ca^{2+} e aumento da excitabilidade das fibras nociceptivas. A mitotoxicidade é uma das principais causas do desenvolvimento da DN induzida pelo paclitaxel (CAROZZI *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014).

A DN induzida pelo paclitaxel também está associada a um aumento da expressão das subunidades $\alpha 2/\delta$ dos canais para Ca^{2+} no corno dorsal da medula espinhal (XIAO *et al.*, 2007) e de canais para sódio do tipo Nav1.7 nos DRG (ZHANG & DOUGHERTY, 2014).

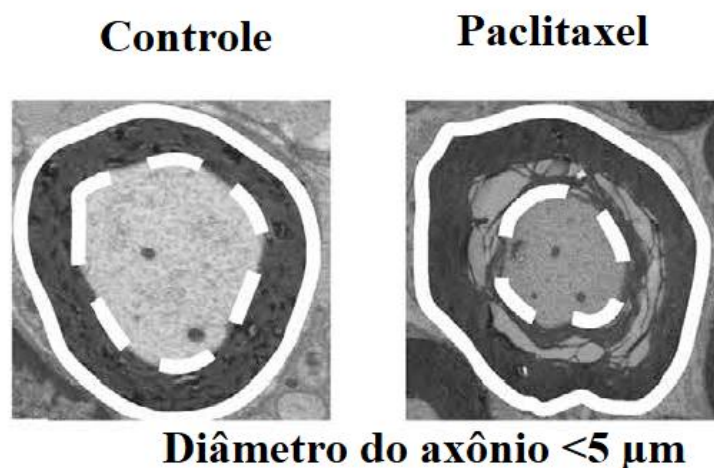


Figura 4. Microscopia de transmissão do nervo isquiático de camundongos, mostrando a degeneração axonal causada pelo tratamento com paclitaxel. A linha tracejada branca mostra o axônio e o círculo branco mostra a circunferência da mielina. Adaptado de CHEN *et al.*, 2017.

O aumento da produção de ROS via danos mitocondriais pode sensibilizar os transdutores do tipo TRP, como TRPA1 e TRPM8, aumentando a sensibilidade a estímulos diversos (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014). Além disso, a administração de antagonistas seletivos para TRPV1 (HARA *et al.*, 2013) e TRPV4 (ALESSANDRI-HABER *et al.*, 2004; MATERAZZI *et al.*, 2012) reduz a alodínia mecânica em animais tratados com paclitaxel, indicando uma possível participação desses transdutores na DN induzida por esse quimioterápico.

O paclitaxel também diminui a expressão de transportadores de glutamato na medula espinhal, gerando maior acúmulo desse neurotransmissor excitatório no espaço extracelular e, conseqüentemente, hiperexcitabilidade neuronal (CATA *et al.*, 2004). Além disso, esse quimioterápico ativa receptores NMDA no SNC, por meio de fosforilação, levando à ativação da via glutamatérgica e posterior experiência dolorosa (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014).

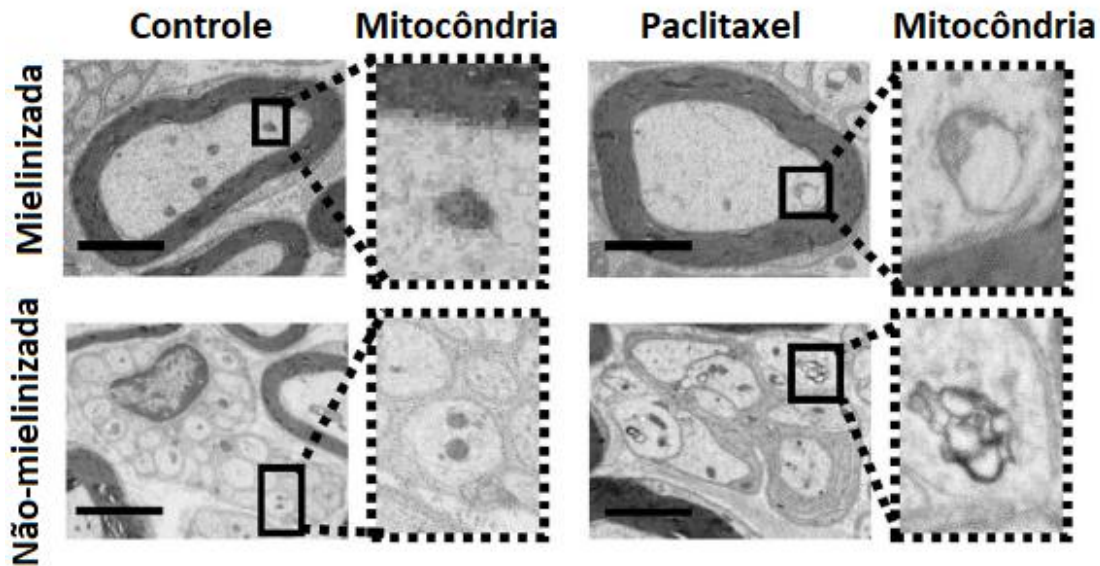


Figura 5. Imagens de microscopia de transmissão mostrando o processo de vacuolização (mitocôndrias atípicas) como consequência do tratamento com paclitaxel. Adaptado de CHEN *et al.* 2017.

O tratamento com paclitaxel também pode ativar vários mecanismos inflamatórios que estão envolvidos na gênese da DN. Aumenta-se o número de células de Langerhans nos DRG, que liberam fatores neurotróficos e mediadores inflamatórios diversos e induzem hipersensibilização de nociceptores. Ocorre acúmulo e ativação de macrófagos nos DRG, além da ativação de células gliais, gerando maior liberação de citocinas inflamatórias, principalmente IL-6, IL-1 β e TNF- α (CAROZZI *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014). O processo inflamatório induzido pelo paclitaxel geralmente se inicia entre quatro a sete dias após o tratamento e se mantém, justificando a cronificação da DNIQ (SISIGNANO *et al.*, 2014).

A indução da sensibilização após administração de paclitaxel em animais experimentais tem sido demonstrada em diversos estudos (BRAGA *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2017; KO *et al.*, 2014; AMI *et al.*, 2012). Administrando doses intercaladas de paclitaxel em quatro dias, gera-se sensibilização das fibras nociceptivas, com alteração do limiar nociceptivo a partir do segundo dia após a administração da primeira dose desse agente quimioterápico, com a presença de alodínia mecânica e fria e hiperalgesia térmica, sendo que a sensibilização pode persistir por 35 dias (BRAGA *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2018; POLOMANO *et al.*, 2000). Este modelo é útil na compreensão da fisiopatologia

da DN induzida pelo paclitaxel e na busca de novas farmacoterapias que possam diminuir a neurotoxicidade que ocorre durante o tratamento com esse agente quimioterápico e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

O manejo da DNPIQ ainda é visto como um obstáculo para a área clínica, devido à falta de fármacos que previnem ou aliviam essa condição dolorosa de forma efetiva (HERSHMAN *et al.*, 2014; SISIGNANO *et al.*, 2014). Por isso, há necessidade do desenvolvimento de pesquisas pré-clínicas e clínicas visando à identificação de farmacoterapia analgésica como novos mecanismos de ação que contribuam para a diminuição da ocorrência dessa condição clínica e a melhora da qualidade de vida dos pacientes.

1.3. Farmacoterapia da Dor e Inflamação

Apesar da dor e a inflamação serem processos que geralmente são benéficos e protetores ao organismo, em determinadas condições clínicas se faz necessário uma intervenção farmacológica para o controle desses processos. Atualmente são disponíveis diversas classes farmacológicas como anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), anti-inflamatórios esteroides (AIEs) e analgésicos opioides e não-opioides. A farmacoterapia com esses fármacos objetiva reduzir o processo inflamatório seja por inibição da produção, liberação e/ou ação dos mediadores inflamatórios reduzindo o edema tecidual e/ou a redução das experiências dolorosas, propiciando uma melhor qualidade de vida ao paciente.

Os AINEs são os fármacos mais prescritos mundialmente para o tratamento de dor e inflamação, representando em torno de 5-10% de todas prescrições médicas. Aproximadamente 35 milhões de pessoas fazem uso diário de AINEs, sendo uma das classes medicamentosas mais comumente associadas ao aparecimento de reações adversas. Além disso eles são os principais fármacos utilizados em automedicação, o que proporciona um aumento dos riscos de complicações e intoxicações medicamentosas. O uso desses fármacos sem receita é em torno de sete vezes maior do que a utilização deles com prescrição e orientação de um profissional de saúde. Outro fator preocupante é a utilização desses fármacos na população idosa. Estima-se que 96% dos idosos fazem uso de AINEs para o controle de condições inflamatórias e dolorosas, aumentando-se ainda

mais o risco em torno da segurança desses fármacos (FOKUNANG *et al.*, 2018; WONGRAKPANICH *et al.*, 2018).

São exemplos de fármacos pertencentes a essa classe: o ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e os coxibes. O mecanismo de ação dos AINEs ocorre pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX), resultando em uma diminuição da formação de prostaglandinas e tromboxanos, reduzindo o processo inflamatório. A diminuição da produção de prostaglaninas, particularmente a PGE₂ e PGI₂, resulta em uma menor sensibilização dos nociceptores aos mediadores inflamatórios, como bradicinina e serotonina (WALTERS *et al.*, 2016; HARIRFOROOSH *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2008). A enzima COX é classificada em duas isoformas: a COX 1, que é expressa constitutivamente nos tecidos, e a COX-2, que é produzida em períodos de estresse e inflamação. Vale ressaltar que a COX-2 também parece ser constitutiva em alguns órgãos, como os rins, e também no endotélio. Dessa forma, os AINEs podem ser classificados de acordo com sua afinidade pelas isoformas de COX: aqueles com maior afinidade pela COX-2 e aqueles que interagem com ambas as isoformas de forma semelhante. A inibição da COX-1, resulta na grande maioria das reações adversas dos AINEs não seletivos como distúrbios gastrointestinais, redução do fluxo renal, distúrbios hemorrágicos e eventos cardiogênicos (HARIRFOROOSH *et al.*, 2013).

Em contrapartida, a eficácia dos AINEs está relacionada à inibição da COX-2 o que resulta em inibição da formação de PGE₂ e, conseqüentemente, diminuição da dor e inflamação. O desenvolvimento de fármacos com maior afinidade para a COX-2, como os coxibes (rofecoxibe, celecoxibe e valdecoxibe) baseou-se no direcionamento da farmacoterapia para redução da inflamação sem reações adversas gastrointestinais. No entanto, o emprego desses fármacos resulta em aumento do risco de ocorrência de eventos cardiovasculares graves, como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio. Esse risco é justificado pela inibição da síntese de PGI₂ no endotélio vascular, associada à manutenção da produção de tromboxano A₂ pelas plaquetas, gerando risco de eventos tromboembólicos. Além disso, a inibição da COX-2, resulta em redução do fluxo renal e, conseqüentemente, da taxa de filtração glomerular, bem como aumento da produção de aldosterona. Esses eventos resultam, portanto, em elevação da pressão arterial,

contribuindo para a ocorrência de eventos cardiovasculares (GROSSER *et al.*, 2017; PIRLAMARLA & BOND, 2016; SHI & KLOTZ, 2008)

Recentemente têm-se postulado que esses eventos cardiovasculares não estão associados somente aos inibidores seletivos da COX-2 mas também a AINEs não seletivos como naproxeno e ibuprofeno. O diclofenaco é um AINE que apresenta riscos cardiovasculares elevados tão quanto aos fármacos da classe coxibes, provavelmente em decorrência da sua elevada afinidade pela isoforma COX-2 (GROSSER *et al.*, 2017 PIRLAMARLA & BOND, 2016). Solomon *et al.* (2017) avaliaram o risco cardiovascular do naproxeno (> 750mg/ dia) e o ibuprofeno (> 1200 mg/dia) em um estudo clínico randomizado conduzido com 24.081 pacientes com osteoartrite ou artrite reumática. Eles observaram que os pacientes em uso de naproxeno ou ibuprofeno apresentaram risco significativamente maior de toxicidade do que aqueles em uso de celecoxibe. E possivelmente esse risco torna-se elevado desde a primeira semana de tratamento com esses fármacos e aumenta-se com o prolongamento da farmacoterapia (BALLY *et al.* 2017). Esses achados são extremamente preocupantes, tendo em vista o uso irracional desses medicamentos pela população em geral.

Outra classe farmacológica bastante utilizada, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, são os AIEs como a hidrocortisona, prednisolona e dexametasona. Esses fármacos são análogos sintéticos do hormônio cortisol produzido pelo córtex adrenal. A maioria das ações anti-inflamatórias e imunossupressoras dos AIEs são atribuíveis, direta ou indiretamente, à sua interação com o receptor citosólico de glicocorticoide, que altera a transcrição de diversos genes, atingindo diversos alvos farmacológicos como células do sistema imune. O mecanismo de ação dessa classe ocorre por meio da inibição fatores de transcrição gênica, como o NF- κ B, responsável pela síntese de mediadores inflamatórios (HARDY *et al.*, 2020; KANAZAWA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2005). Podem ainda inibir a transcrição dos genes responsáveis pela síntese da COX-2, citocinas inflamatórias e moléculas de adesão celular. A toxicidade associada aos AIEs está relacionada a dose cumulativa e a duração do uso desses fármacos. Os efeitos adversos relacionados possuem relação com suas ações metabólicas e imunossupressoras podendo resultar em condições clínicas como hipertensão arterial sistêmica, miopatia, dislipidemia, hiperglicemia, osteoporose e

fraturas, distúrbios gastrointestinais e dermatológicos. (HARDY *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2013; FARDET *et al.*, 2007).

Os analgésicos não-opioides como paracetamol e dipirona e os opioides (morfina, codeína, tramadol e fentanila) também são amplamente utilizados no manejo de condições dolorosas. O paracetamol é um dos medicamentos de venda livre mais comumente utilizados no mundo. Em sua faixa terapêutica é bem tolerado, apresentando baixa incidência de efeitos adversos. Mas um dos grandes problemas relacionados ao seu uso é hepatotoxicidade, que ocorre em decorrência da produção do metabolito tóxico n-acetil-p-benzoquinona, uma substância altamente reativa que normalmente se combina com a glutatona gerando substâncias inativas. Com o aumento da dose de paracetamol e/ou diminuição da produção de glutatona como acontece em situações como pacientes portadores do vírus HIV, desnutrição ou alcoolismo, a n-acetil-p-benzoquinona se liga às proteínas hepáticas, resultando em lesão hepática (SCHUG *et al.*, 2003). Já o uso terapêutico da dipirona ainda é controverso em diversos protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas no mundo. Em muitos países o seu uso é proibido, em outros ocorre somente mediante a apresentação de prescrição médica e em países como Brasil, China e México a sua comercialização não requer receituário (LUTZ, 2019). Em um estudo observacional realizado no Brasil entre 2013 e 2014, observou-se que a dipirona é o principal fármaco associado a automedicação (DAL PIZZOL *et al.*, 2019). A preocupação com a automedicação é justificada em decorrência de relatos de agranulocitose associada ao uso de dipirona, o que representa risco ao usuário. Em estudo realizado na Europa, concluiu-se que pode ocorrer um caso de agranulocitose por pelo menos 1439 prescrições de dipirona e seu aparecimento independe da dose ou via de administração (LUTZ, 2019; HEDENMALM & SPIGSET, 2002).

O uso de fármacos analgésicos opioides como codeína e tramadol (opioides fracos) ou morfina e oxicodona (opioides fortes) são indicados em quadros de dor intermediária a intensa que não são aliviadas pelos analgésicos não opioides (COLUZZI *et al.*, 2016). O tramadol e o tapentadol são analgésicos opioides de baixa eficácia, podendo ser considerados como a segunda alternativa para o manejo da DN por apresentarem melhor perfil de segurança quando comparados a analgésicos opioides de elevada eficácia. Esses fármacos agem como agonistas de receptores μ opioides e inibem a recaptção de serotonina e norepinefrina, exercendo, dessa forma, seus efeitos analgésicos

(MCCARBERG *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017). O uso de analgésicos opioides de alta eficácia, como morfina e oxicodona, ainda é controverso, pois esses fármacos apresentam perfil de segurança inferior, sendo considerados como terceira alternativa no manejo da DN (COLLOCA *et al.*, 2017; MCCARBERG *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017). Terapias prolongadas com esses analgésicos podem gerar maior grau de dependência química e ocorrência de efeitos adversos como náuseas, vômitos, constipação, sedação, retenção urinária, hipotensão e depressão respiratória, que estão associados à descontinuação do tratamento (MCCARBERG *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017; GILRON *et al.*, 2015). Esses efeitos restringem a utilização desses fármacos na prática clínica, necessitando de um monitoramento farmacoterapêutico ao longo do tratamento da condição dolorosa (COLUZZI *et al.*, 2016; SCHUG *et al.*, 2003).

Atualmente têm-se explorado a pesquisa e utilização de biofármacos, como os anticorpos monoclonais para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes. Os anticorpos monoclonais (mAb) representam um grande avanço da medicina para o controle de doenças inflamatórias crônicas, doenças infecciosas e câncer. Isso ocorre devido sua alta especificidade e afinidade pelo local de ação, resultando em menores efeitos fora do alvo farmacológico. Outra vantagem do uso desses fármacos é a longa meia-vida sérica que eles apresentam, em torno de 2 a 4 semanas, permitindo a diminuição da frequência de administração. Um dos principais mecanismos dos mAb para o tratamento de quadros inflamatórios é o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . No mercado já estão disponíveis os fármacos adalimumabe e infliximabe (anti-TNF- α), tocilizumabe e siltuximabe (anti-IL-6) e rituximabe (anti-CD20), ambos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide e doença de Crohn (CASTELLI *et al.*, 2019; RYMAN & MEIBOHM, 2017; SHEPARD *et al.*, 2017; HANSEL *et al.*, 2010).

Além da série de benefícios que os mAbs oferecem para o controle clínico de diversas doenças inflamatórias, eles também apresentam diversos efeitos adversos que estão relacionados ao alvo ou mecanismo de ação. Em decorrência da sua alta especificidade, a toxicidade do mAb ocorre principalmente em função da inibição exagerada do alvo farmacológico. A ocorrência de efeitos fora do local de ação normalmente é rara e vai depender do papel que o alvo terapêutico desempenha nos processos fisiológicos do

organismo. Geralmente esses fármacos apresentam problemas de segurança que se relacionam à imunomodulação e a um aumento de desenvolvimento/ agravamento de quadros infecciosos (CASTELLI *et al.*, 2019; SHEPARD *et al.*, 2017; HANSEL *et al.*, 2010)

Cabe salientar a dificuldade do manejo farmacoterápico para condições dolorosas específicas como é o caso da DN. Em geral, o manejo da DN é voltado apenas para o alívio sintomático, sendo utilizados fármacos antiepilépticos ou antidepressivos como primeira alternativa (COLLOCA *et al.*, 2017; PESSOA *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014). Na prática clínica, ocorre um alívio parcial (40-50%) da dor após a utilização desses fármacos (PESSOA *et al.*, 2015). Os antidepressivos mais utilizados são os tricíclicos (amitriptilina e nortriptilina) e os inibidores da recaptação de serotonina/noradrenalina (principalmente, duloxetina e venlafaxina) (COLLOCA *et al.*, 2017; MCCARBERG *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017). O emprego desses fármacos para o alívio da dor baseia-se principalmente na ação sobre os controles inibitórios descendentes (vias noradrenérgica e serotoninérgica) por meio do aumento da disponibilidade de noradrenalina e/ou serotonina (COLLOCA *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017; GILRON *et al.*, 2015). Além de induzir a analgesia, os antidepressivos fornecem outros benefícios, como o tratamento de sintomas secundários como a depressão, frequentemente associada à DN (GILRON *et al.*, 2015).

Em um estudo randomizado, duplo-cego, realizado por Kautio *et al.*, (2009), demonstrou que a amitriptilina apresentou baixa eficácia na reversão dos sintomas associados à DN em pacientes submetidos à quimioterapia com alcaloides da vinca, derivados da platina ou taxanos. No estudo de fase III, realizado por Hammack *et al.* (2002), a nortriptilina também apresentou baixa eficácia no alívio da DN induzida por cisdiaminodicloroplatina. Por outro lado, a duloxetina mostrou-se eficaz (em torno de 59%) no manejo da DN em pacientes submetidos à quimioterapia com paclitaxel ou oxaliplatina (SMITH *et al.*, 2013). Em pacientes submetidos à quimioterapia com oxaliplatina, a neurotoxicidade sensorial foi reduzida em torno de 39% nos pacientes que foram tratados com venlafaxina (DURAND *et al.*, 2012).

Os anticonvulsivantes mais indicados para o manejo da DN são a gabapentina (análogo do ácido γ -aminobutírico-GABA) e a pregabalina. Os mecanismos de ação que

contribuem para os efeitos analgésicos induzidos pelos dois fármacos são semelhantes, envolvendo a interação com a subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais para Ca^{2+} voltagem dependentes, levando a uma diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios (COLLOCA *et al.*, 2017; ZILLIOX, 2017; PACHMAN *et al.*, 2011). A afinidade da pregabalina pela subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais para Ca^{2+} pré-sinápticos é superior quando comparada àquela da gabapentina (ZILLIOX, 2017). A gabapentina é eficaz no manejo de diversas síndromes que desencadeiam DN como neuropatia diabética, infecções por vírus varicela-zoster e síndrome do membro fantasma (WOLF *et al.*, 2008). Em contrapartida, esse fármaco é ineficaz no manejo da NP em pacientes submetidos à quimioterapia com taxanos, derivados da platina e alcaloides da vinca, como foi relatado no estudo de fase III desenvolvido por Rao *et al.* (2007). A pregabalina tem aprovação pela Food and Drug Administration para o alívio de quadros dolorosos associados a condições como neuropatia diabética, infecções pelo vírus varicela-zoster e fibromialgia (PACHMAN *et al.*, 2011). Esse fármaco alivia parcialmente a DN causada pela oxaliplatina em pacientes com câncer gastrointestinal (SAIF *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que quando são combinadas terapias analgésicas visando ao alívio da DN, deve-se levar em consideração a dose de cada fármaco e a tolerabilidade de cada paciente aos efeitos adversos (COLLOCA *et al.*, 2017). A terapia analgésica combinada geralmente não é recomendada durante o manejo da DNIQ, condição na qual deve ser empregada a monoterapia, a fim de evitar reatividades cruzadas entre os fármacos e, conseqüentemente, diminuição da efetividade da quimioterapia (SISIGNANO *et al.*, 2014).

Por mais que maioria dos fármacos utilizados para tratamento de pacientes com condições dolorosas e inflamatórias sejam eficazes, a farmacoterapia da dor e inflamação ainda apresenta limitações, principalmente envolvendo a segurança desses fármacos. Além disso, a farmacoterapia atualmente disponível não proporciona um manejo eficaz de condições dolorosas como a DN, tornando-se limitada em termos de efetividade de fármacos disponíveis (BASTOS & COELHO, 2013). Dessa forma, tomando como base as reações adversas apresentadas pelos fármacos atualmente disponíveis no mercado, a heterogeneidade e alta incidência das condições clínicas dolorosas e inflamatórias, se faz necessário a busca por novas alternativas farmacológicas com a perspectiva da descoberta de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios mais eficazes e seguros.

1.4. Papel fisiológico do NO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula simples que exerce várias funções fisiológicas. É um mediador presente em quase todas as células, podendo exercer diferentes funções como controle do tônus vascular, neurotransmissão, indução da expressão gênica de fatores de transcrição, regulação da função imunológica e apoptose celular. O NO endógeno é sintetizado a partir da L-arginina pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Existem 3 isoformas da NOS: a forma constitutiva neuronal (nNOS, presente em tecidos neurais, neutrófilos e músculo esquelético), a isoforma induzível (iNOS, presente em vários tipos de células após estímulos inflamatórios) e a isoforma constitutiva endotelial (eNOS, presente em células cardíacas, neurônios e plaquetas). A principal sinalização mediada pelo NO ocorre por meio da ativação da enzima citosólica guanilato ciclase, resultando na formação do GMP cíclico (cGMP). Após sua formação, o cGMP participa de várias vias intracelulares importantes para a regulação celular. (KORHONEN *et al.*, 2005; GUZIK *et al.*, 2003).

O NO formado pela eNOS é responsável por manter baixo o tônus vascular e evitar a adesão de leucocitária e plaquetária na parede vascular. Já o NO formado por nNOS atua como um neuromediador em neurônios centrais e em terminações nervosas periféricas não adrenérgicas e não colinérgicas (NANC). As atividades desempenhadas pela nNOS e a eNOS são dependentes Ca^{2+} , diferentemente da iNOS. O NO formado pela iNOS em macrófagos e monócitos desempenha papéis múltiplos na resposta inflamatória. A indução da iNOS pode ser iniciada por citocinas inflamatórias como o IFN- γ , TNF- α ou IL-1 β . Dessa forma, iNOS torna-se um alvo atrativo para alguns fármacos como glicocorticosteroides e citocinas, como IL 10, que conseguem inibir a sua indução, resultando em ação anti-inflamatória (GUZIK *et al.*, 2003).

O conhecimento do papel fisiológico do NO permitiu que várias linhas de pesquisa estudassem a modulação dessas atividades, por meio do aumento da sua disponibilização ou da sua inibição. A inibição da produção de NO pode contribuir para a diminuição da inflamação. Essa molécula está envolvida na imunidade inata como um agente citotóxico como ocorre em processos infecciosos e também está presente em concentrações significativas nos tecidos de pacientes com condições inflamatórias crônicas como artrite reumatoide. Assim, o desenvolvimento de inibidores seletivos para a enzima NOS,

particularmente iNOS, é baseado na diminuição das ações inflamatórias mediadas pelo NO, conseqüentemente, atenuação dos sinais e sintomas da inflamação (NAGY *et al.*, 2007; KORHONEN *et al.*, 2005; GUZIK *et al.*, 2003; COLEMAN, 2001). Em contrapartida outras linhas de pesquisa estão voltadas para o desenvolvimento de fármacos que possibilitem o aumento da disponibilização dessa molécula com foco anti-inflamatório e analgésico (GOMES *et al.*, 2020; CURY *et al.*, 2011.)

Cabe mencionar que o NO consegue apresentar atividades opostas, que podem ser dependentes da sua concentração local, da sua reatividade com as outras moléculas e do seu local de ação (COLEMAN, 2001). Assim o NO pode induzir efeitos como a facilitação ou inibição do processamento periférico da resposta nociceptiva (HANCOCK *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 1992; DUARTE & FERREIRA, 1992), efeitos inflamatórios ou anti-inflamatórios em modelos experimentais (ABRAMSON *et al.*, 2008; KORHONEN *et al.*, 2005; COLEMAN *et al.*, 2001).

O papel da sinalização do NO na modulação dor tem sido extensivamente investigado (GOMES *et al.*, 2020; CURY *et al.*, 2011). Um possível mecanismo que explica a atividade antinociceptiva do NO seria a ativação da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT). A PI3K é uma família de quinases, onde a isoforma PI3K γ pode ser ativada por diversas substâncias como os opióides, adenosina e canabinoides (Fig. 6). Ocorre então a regulação da via de sinalização nNOS/NO e posterior aumento na produção de GMPc. O GMPc aumenta a concentração de proteína quinase G (PKG) que gera a ativação de canais de potássio, permitindo o efluxo desse íon e conseqüentemente hiperpolarização e diminuição da excitabilidade neuronal periférica (GOMES *et al.*, 2020).

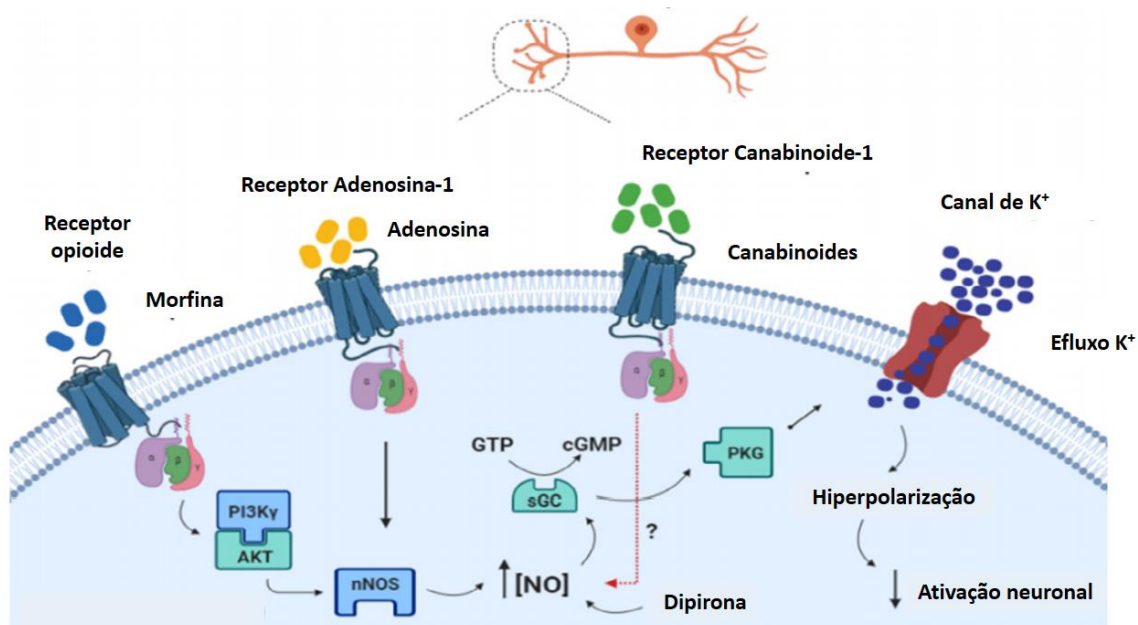


Figura 6. Modulação do processamento nociceptivo pelo NO. Adaptado GOMES *et al.* (2020).

Duarte *et al.* (1990) demonstraram que a ACh diminui a hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂, e que esse efeito é bloqueado quando ocorre a administração de NG-Monometil-L-arginina (L-NMMA), um inibidor da NOS, confirmando a participação da via NO/GMPc na analgesia induzida por ACh. Outros mecanismos parecem mediar o efeito antinociceptivo do NO. O NO por meio de uma reação de S-nitrosilação, processo não enzimático, promove a ativação de canais de K⁺ sensíveis a ATP (KAWANO *et al.*, 2009). Ele também pode reduzir a liberação de glutamato, neurotransmissor excitatório, pela S-nitrosilação de canais de Ca²⁺ voltagem dependentes (LU *et al.*, 2011; XIAO-GAO *et al.*, 2011). A participação da ativação de canais de K⁺ sensíveis a ATP como mecanismo analgésico do NO tem sido amplamente discutido e demonstrado em modelos experimentais, a exemplo de alguns fármacos como a morfina (GOMES *et al.*, 2020). Também existem evidências que o NO pode agir no controle inibitório descendente da dor, participando da via noradrenérgica e colinérgica, responsáveis pela antinocicepção no corno dorsal da medula espinhal (CURY *et al.*, 2011). Tegeder *et al.* (2002) avaliaram os efeitos da administração intratecal do análogo de GMPc, o 8-bromo-GMPc, em um ensaio de formalina em ratos. Os autores observaram que em baixas doses o análogo exercia um efeito antinociceptivo enquanto doses elevadas geraram hiperalgesia.

O NO pode exercer importantes sinais na regulação da resposta imune, como a inibição do NF- κ B (MATTHEWS *et al.*, 1996), resultando em uma diminuição na síntese de mediadores inflamatórios. Dessa forma, o NO consegue diminuir a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α que possuem papel fundamental na resposta inflamatória (THOMASSEN *et al.*, 1997). Ele também diminui a degranulação e a formação de fatores quimiotáticos e de espécies reativas em neutrófilos ativados, contribuindo para uma menor atuação dessas células na resposta inflamatória (CLANCY *et al.*, 1998; MOILANEN *et al.*, 1993). Além disso, outra ação do NO seria a diminuição do recrutamento dessas células leucocitárias para o foco inflamatório por meio da diminuição do rolamento e da adesão no endotélio vascular e da inibição da produção das moléculas de adesão (DAL SECCO *et al.* 2006; XU *et al.* 2013).

Tendo em vista a vasta atividade biológica apresentada pela molécula NO, torna-se atrativo a busca de pesquisas que utilizem a sua via de sinalização para o desenvolvimento de potenciais fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Uma das desvantagens do emprego da terapia com NO seria o tempo de meia-vida muito curta dessa molécula limitando a sua aplicação clínica como farmacoterapia para condições dolorosas e inflamatórias (GOMES *et al.*, 2020). Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos que liberem a molécula NO (doadores de NO) poderiam ser uma alternativa, pois estes poderiam atuar mais efetivamente por conta de uma meia vida mais longa, implicando em um maior sucesso terapêutico.

1.5. Doadores de NO

Diversos compostos doadores de NO já foram investigados em diferentes condições dolorosas e inflamatórias experimentais e podem representar uma alternativa farmacoterapêutica eficaz neste contexto (Tabela 1). Já foi demonstrado que o nitroprussiato de sódio, fármaco doador de NO, amplamente empregado na clínica para o tratamento de condições cardiovasculares, inibe a hiperálgia inflamatória induzida por PGE₂ de maneira dose-dependente (GOMES *et al.*, 2020). Da mesma forma uma única administração de gel de nitroglicerina reduziu o edema e a hiperálgia induzida por PGE₂ (FERREIRA *et al.*, 1992).

Fármacos analgésicos opioides como a morfina também podem agir por ativação da via de sinalização do NO (CUNHA *et al.*, 2010; RODRIGUES & DUARTE, 2000;

FERREIRA *et al.*, 1991). A morfina aumenta a produção de NO nas terminações neuronais, principalmente pela ação da enzima nNOS, justificando sua atividade analgésica na periferia (CUNHA *et al.*, 2010). A via NO/cGMP também parece desempenhar um papel fundamental no efeito analgésico de analgésicos não opioides como a dipirona. O uso de inibidores seletivos da nNOS diminuíram a atividade antinociceptiva mediada pela dipirona (ROMERO *et al.*, 2011). Assim com o aumento do cGMP ocorre abertura dos canais de K⁺ sensíveis ATP por estimulação da PKG (Fig. 6) (SACHS *et al.*, 2004). Essa via de sinalização também parece estar associada com a atividade antinociceptiva do diclofenaco (ALVES *et al.*, 2004).

Vários fármacos pertencentes a classe dos AINEs e AIEs foram modificados estruturalmente por meio do acoplamento de grupamentos doadores de NO. Entre os fármacos acoplados a doadores de NO podem ser mencionados o ácido acetilsalicílico (FIORUCCI *et al.*, 2000; TURNBULL *et al.*, 2008), o paracetamol (ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2002), o naproxeno (YOUNG *et al.*, 2005) e a prednisolona (PAUL-CLARK *et al.*, 2009). Essa estratégia levou ao desenvolvimento de novos compostos com melhores perfis de segurança e eficácia em ensaios pré-clínicos. Além disso, o uso de ácido nicotínico na forma de nicorandil (DUTRA *et al.*, 2013) e compostos de ftalimida (GODIN *et al.*, 2015; GODIN *et al.*, 2017), que liberam também liberam NO, mostraram eficácia em modelos experimentais de inflamação e dor.

Outra classe amplamente utilizada na prática clínica que também depende da sinalização do NO são as estatinas. Paralelamente aos seus efeitos na síntese de colesterol, as estatinas também aumentam a disponibilidade de NO por meio da eNOS, explicando seu benefício no tratamento das doenças cardiovasculares (GORABI *et al.*, 2019). A artovastatina apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos de hiperalgesia induzida por PGE₂ e de artrite (BARSANTE *et al.*, 2005), onde possivelmente parte dos seus efeitos ocorrem pela disponibilização do NO (SANTODOMINGO-GARZÓN *et al.*, 2006). Abacioğlu *et al.*, (2001) demonstraram que a modulação NO/cGMP contribuiu para antinocicepção induzida pela pirodoxina. A ativação da via NO parece ser também ativada por práticas terapêuticas alternativas como a eletroacupuntura (GOMES *et al.*, 2020).

White *et al.*, 2009 conduziu um estudo clínico com 916 pacientes com osteoartrite durante 13 semanas de tratamento naproxcinod (naproxeno doador de NO, 1500 mg/dia), naproxeno (1000 mg/dia) ou placebo. Eles observaram que o naproxcinod não induziu elevações da pressão arterial (PA), que foram observadas com o tratamento com naproxeno, e teve efeitos semelhantes sobre a PA quando comparados ao grupo placebo. Este mesmo fármaco mostrou eficácia semelhante a apresentada pelo rofecoxibe no tratamento de pacientes com osteoartrite, e também mostrando segurança cardiovascular superior ao fármaco seletivo da COX-2 (KARLSSON *et al.*, 2009). Um outro fármaco doador de NO (AZD3582) análogo do naproxeno, também apresentou uma melhora clínica nos efeitos adversos gastrointestinais associados ao naproxeno em terapia isolada (HAWKEY *et al.*, 2003). Esses achados clínicos reforçam a melhora do perfil de segurança apresentados por fármacos doadores de NO em estudos pré-clínicos, quando comparados aos seus percussores AINES.

Tabela 1. Estudos que investigaram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de doadores de NO, modificados estruturalmente, em modelos experimentais.

Estudo	Modelo	Droga, dose (mg/Kg) e vias de Administração	Possíveis mecanismos	Resultado
Al-Swayeh <i>et al.</i> , 2000 ^a	Nociceção induzida por formalina e dor inflamatória induzida por Carragenina Formalina	NO-aspirina 2,5 - 50 mg kg, <i>i.p</i> ou 2,5 - 100 mg/Kg, <i>p.o</i>	-	Redução da formação do edema de pata e redução da dor nociceptiva
Al-Swayeh <i>et al.</i> , 2000 ^b	Dor inflamatória induzida por Carragenina	NO-paracetamol 2,5 - 50 mg kg, <i>i.p</i> ou 2,5 - 100 mg/Kg, <i>p.o</i>	-	Redução da formação do edema de pata e redução da alodínia mecânica
Fiorucci <i>et al.</i> , 2000	Hepatite induzida por con A	NO-aspirina 18-100 mg/Kg	Redução da produção de citocinas	Redução das lesões hepáticas

Romero-Sandoval et al., 2002	Estimulação elétrica e mecânica	NO- paracetamol 15 -480 $\mu\text{mol/Kg}$, <i>i.v</i>	-	Redução da estimulação nociva
Romero-Sandoval et al., 2003	Injeção intrarticular de Carragenina	NO- paracetamol 15-960 $\mu\text{mol/Kg}$, <i>i.v</i>	-	Redução da dor inflamatória
Turnbull et al., 2008	Cultivo de macrófagos com LPS	NO-aspirina	Inibição da ativação de NF- κB	Redução de TNF α
Paul-Clark et al., 2009	Peritonite induzida por zymozan	NO- prednisolona 13,8 $\mu\text{mol/Kg}$ <i>p.o.</i>	Redução de migração neutrofílica	Redução dos processos inflamatórios
Hervera et al., 2009	Dor inflamatória por injeção de CFA	NO 2,2' - (hidroxinitroso- hidrazino)	Aumento da antinocicepção via δ -opioide	Redução da dor inflamatória
Godin et al., 2015	Nocicepção induzida por formalina e dor inflamatória induzida por Carragenina Formalina	Nitrato de 2- ftalimidetila 500 e 750 mg / kg <i>p.o</i>	Mecanismos opioidérgicos e canabinoidérgicos	Redução da dor nociceptiva e do edema de pata
Godin et al., 2017	Dor inflamatória por injeção de mBSA	Nitrato de 2- ftalimidetila 500 e 750 mg / kg <i>p.o</i>	Redução da produção de citocinas	Redução da alodínia mecânica
Wu et al., 2020	Alodinia mecânica por lesão da medula espinhal/ CCI	NO- gabapentina 28-280 $\mu\text{mol/Kg}$, <i>i.p</i>	Redução de TNF- α	Redução da alodínia mecânica

CCI: constrição crônica de nervo isquiático

CFA: administração *i.pl.* de adjuvante completo de Freund (CFA)

conA: Concanavalina A

mBSA: injeção intra-articular de albumina sérica bovina metilada (mBSA)

1.6. Composto ácido 4-((nitrooxi) metil)-3-nitrobenzoico

Modificar a estrutura química de substâncias é um procedimento comum em pesquisas que visam o desenvolvimento de novos fármacos. A síntese de moléculas modificadas permite a obtenção de compostos com melhores perfis farmacológicos e de segurança. Essa estratégia pode contornar o aparecimento de efeitos adversos dos anti-inflamatórios e analgésicos, que muitas vezes reduzem suas aplicações clínicas e a adesão do paciente ao tratamento.

Assim, o presente estudo propôs a avaliação da atividade do composto ácido 4-((nitrooxi) metil)-3-nitrobenzoico (RIY09) (Fig. 7), resultante do acoplamento da estrutura -ONO₂ em uma molécula simples aromática, liberadora de NO (BRAGA *et al.*, 2021) em modelos experimentais de inflamação e dor aguda e de dor neuropática induzida por paclitaxel em camundongos, assim como, dos possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade. Este composto foi desenvolvido pelo laboratório de química farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG sob orientação da Prof. Dr. Renata Barbosa.

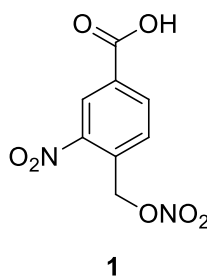


Figure 7. Estrutura química do composto ácido 4-((nitrooxi] metil)-3-nitrobenzoico (RIY09). Adaptado de BRAGA *et al.*, 2021.

2. JUSTIFICATIVA

A limitação da eficácia e segurança dos fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com condições dolorosas e inflamatórias evidencia a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas. O papel exercido pelo NO na regulação dos processos inflamatórios e nociceptivos indica que moléculas que modulam a produção ou ação desse mediador podem ser candidatas a fármacos úteis no manejo de condições dolorosas e inflamatórias diversas. A modificação estrutural de substâncias para o fornecimento da molécula NO resulta, normalmente, no aumento da atividade farmacológica e na melhora do perfil de segurança dessas substâncias quando comparadas aos fármacos atualmente disponíveis. Esse fato justifica o grande interesse no investimento de pesquisas nessa área, principalmente no desenvolvimento de substâncias doadoras de NO. Nesse contexto, a investigação da atividade do composto RIY09, substância doadora de NO, em modelos de dor e inflamação, assim como dos possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade, pode levar a melhor caracterização do seu perfil farmacológico e contribuir para a identificação de novas abordagens terapêuticas eficazes e seguras.

3. OBJETIVOS

Avaliar as atividades do composto RIY09 em modelos experimentais de dor e inflamação aguda e modelo de dor neuropática induzida por quimioterápico, bem como os possíveis mecanismos que medeiam essas atividades.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25 – 30 g). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos em sala com temperatura controlada de 27 ± 1 °C, correspondente à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Água e ração foram fornecidos *ad libitum*. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h, sendo acomodados em caixas de plástico (dimensões 40 x 34 x 17 cm) forradas com maravalha. Durante a realização de todos os protocolos, os animais foram manuseados de maneira cuidadosa, a fim de promover o menor estresse comportamental possível. Após o término dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia após anestesia geral. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo n°23/2016 e Protocolo n° 252/2021).

4.2. Drogas e reagentes

AM251 (Sigma, EUA)- antagonista CB1

Carboximetilcelulose (CMC; Sigma, EUA) - Veículo

Carragenina λ tipo IV (Sigma, EUA)- Estímulo inflamatório usado para a indução do edema de pata.

Cloreto de sódio 0,9% (Equiplex, Brasil) - Veículo

Cloridrato de cetamina (União Química, Brasil) - Anestésico.

Cloridrato de naltrexona (Sigma, EUA) - Antagonista opioidérgico.

Cloridrato de xilazina (União Química, Brasil) - Coadjuvante de anestesia.

Dexametasona (Sigma, EUA)- Fármaco anti-inflamatório utilizado como controle positivo

Dipirona Sódica (Sigma, EUA)- Fármaco analgésico utilizado como controle positivo

Fenobarbital (Sanofi Aventis, Brasil) - Fármaco depressor do SNC utilizado como controle positivo

Glibenclamida (Sigma, EUA) - Bloqueador de canais K_{ATP} .

Paclitaxel (Sigma, EUA) - Fármaco antineoplásico

Polietilenoglicol 400 (Synth, Brasil)- Veículo

Pregabalina (Teuto, Brasil) - Fármaco anticonvulsivante

RIY09 (ácido 4-((nitrooxi] metil)-3-nitrobenzoico) (Departamento de Química Farmacêutica, UFMG)- composto avaliado em modelos de dor e inflamação.

4.3. Preparo, doses e vias de administração das soluções e suspensões

4.3.1. Preparo da suspensão de RIY09

A suspensão do composto RIY09 foi preparada em solução salina (NaCl 0,9%; pH 6,8) contendo 40% (v/v) de PEG 400 e administrada por via intraperitoneal (*i.p.*) em um volume de 4 mL/Kg.

4.3.2. Preparo da solução de Dipirona, dexametasona, fenobarbital e suspensão de pregabalina

As soluções de dexametasona, fenobarbital, dipirona foram preparadas em solução salina. A dose do fenorbabital e da dipirona foram 50 mg/Kg e 500 mg/Kg, respectivamente, administradas por via *per os* (*p.o.*) em um volume de 10 mL/Kg. A dose utilizada da dexametasona foi de 2 mg/Kg, *i.p.*, em volume de 4 mL/Kg. A suspensão de pregabalina pregabalina foi preparada em carboximetilcelulose (CMC) 0,5% p/v em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v e administrada *p.o.* em uma dose de 30mg/Kg, em um volume de 10mL/Kg.

4.3.3. Suspensão de carragenina

A suspensão de carragenina (2%) foi preparada em solução salina e administrada por via intraplantar (*i.pl.*).

4.3.4. Suspensão de Paclitaxel

A solução de paclitaxel foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v injetável imediatamente antes de cada administração. O paclitaxel foi administrado por via intraperitoneal (*i.p.*) em volume de 2 mL/Kg. A dose padronizada foi de 2 mg/Kg.dia, administrada durante quatro dias.

4.3.5. Solução de naltrexona e glibenclamida e AM251

As soluções de naltrexona e glibenclamida foram preparadas em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v injetável imediatamente antes da administração. A naltrexona foi administrada *i.p.*, nas doses de 5 e 10 mg/Kg, em volume de 4 ml/Kg. A glibenclamida foi administrada *p.o.*, nas doses de 20 e 40 mg/Kg, em volume de 8 mL/Kg. A solução

de AM251 foi preparada em cremofor a 5% e etanol a 5% adicionado em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, administrada *i.p.* na dose de 4 ou 8 mg/Kg, em um volume de administração de 4ml/Kg.

4.4. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor

A avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor foi realizada com auxílio da placa quente (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil). Os animais foram colocados sob a superfície não aquecida da placa durante 2 min para ambientação nos três dias anteriores ao experimento. No momento do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre a placa metálica aquecida na temperatura estabelecida e o tempo para que os animais exibam comportamentos indicativos de desconforto (lambida das patas ou saltos) foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. A temperatura utilizada foi de 50 °C e o tempo de corte foi de 50 s (Fig. 8), a fim de evitar a ocorrência de lesão tecidual. O RIY09 (50, 100 ou 150 mg/Kg, *i.p.*), dipirona (500 mg/Kg, *p.o.*) ou veículo (PEG 400 40%, 4 mL/Kg, *i.p.*) foram administrados 30 minutos antes da realização do experimento.

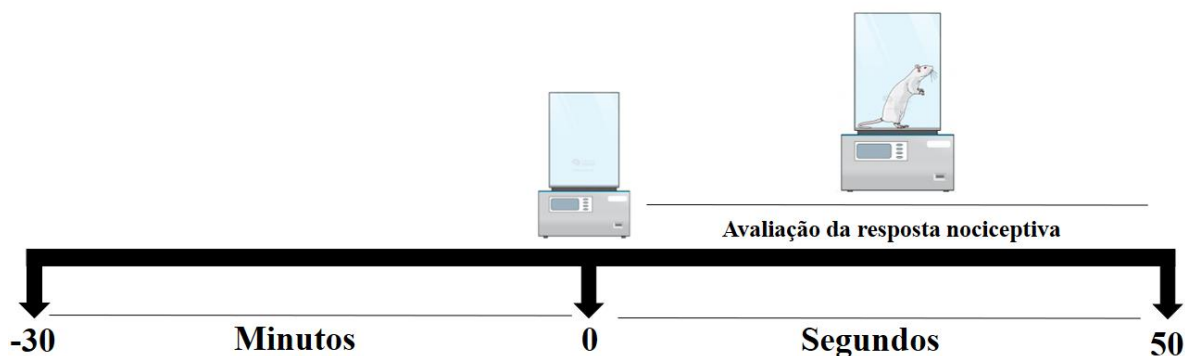


Figura 8. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.

4.5. Avaliação da alodínia mecânica

Para avaliação da alodínia mecânica no modelo experimental de DN induzida pelo paclitaxel, os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. Os animais foram ambientados no aparato de realização do teste por no mínimo 60 min por dia durante dois dias antes da realização do experimento e por 20 min logo antes do início do experimento. A alodínia mecânica foi avaliada por meio de um analgesímetro digital (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) que consiste de um transdutor de pressão manual adaptado a uma ponteira

de polietileno de 0,5 mm², que mede o limiar para a retirada da pata, expresso em gramas. O filamento foi aplicado sobre a superfície plantar da pata traseira direita com um aumento gradual de pressão até que o animal retirasse a pata. O valor da pressão que induz a retirada da pata é registrado automaticamente, em uma faixa de 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N. Foram feitas cinco medições, em intervalos de 20 s, sendo o maior e o menor valor eliminados e a resposta nociceptiva calculada como uma média dos três valores restantes. Os animais foram testados antes e depois dos tratamentos. O limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado no dia do teste e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes.

4.6 Avaliação dos efeitos induzidos pelo RIY09 na alodínia mecânica induzida pela carragenina

A suspensão de carragenina (400µg, 20µL, *i.pl.*) foi injetada 30 minutos após a administração do composto RIY09 (50, 100 ou 150 mg/Kg, *i.p.*), dexametasona (2 mg /Kg, *i.p.*) ou veículo (PEG 400 40%, 4 mL/Kg). A alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 h após a administração da carragenina (Fig. 9). Os resultados foram expressos como o limiar de retirada da pata absoluto (g).

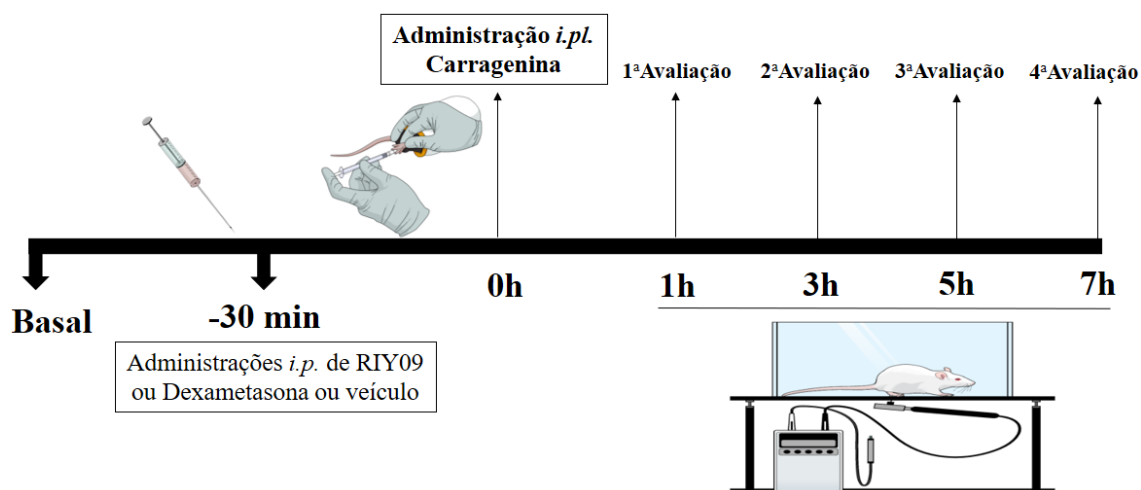


Figura 9. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.

4.7. Avaliação dos efeitos induzidos pelo RIY09 sobre a coordenação motora

A coordenação motora foi avaliada na haste girante (VAZ *et al.*, 1996). Os animais foram treinados no aparato, a 14 rpm, durante dois dias antes do experimento, em duas sessões diárias, durante 2 min. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias dos tempos de permanência basais fossem semelhantes. O RIY09 (150 mg/Kg, *i.p.*), o fenobarbital (50 mg/kg, *p.o.*) ou veículo (PEG 400 40 %, *i.p.*), foram administrados 30 minutos antes da primeira avaliação na haste girante. Em seguida, o tempo de permanência de cada animal na haste girante (14 rpm) foi determinado 0,5, 1, 3, 5 e 7 h após a administração do composto ou do fenobarbital (Fig. 10). O tempo de corte foi de 2 min.

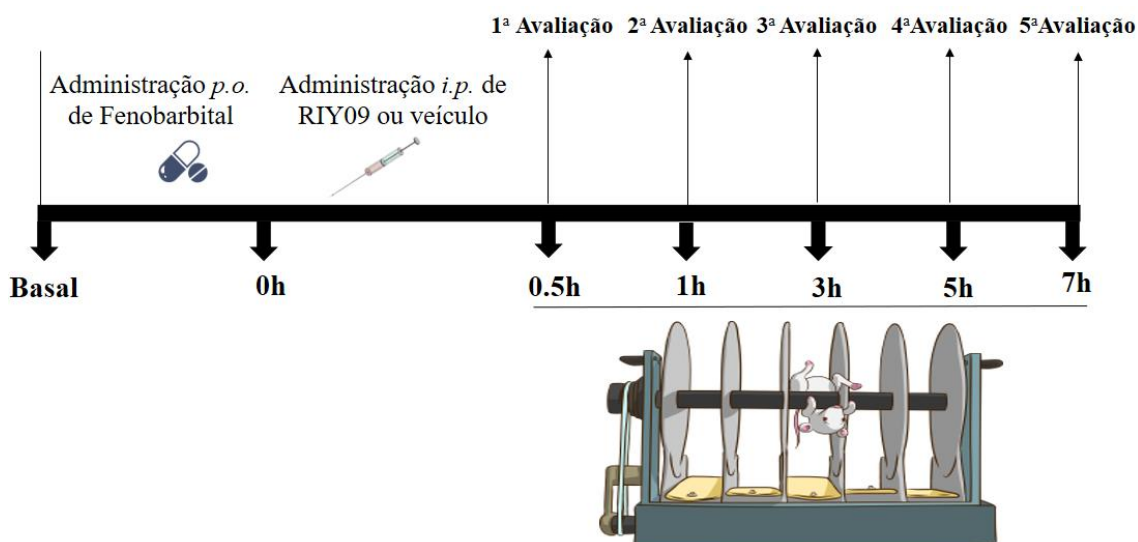


Figura 10. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 na coordenação motora dos animais.

4.8. Avaliação dos efeitos induzidos pelo RIY09 no edema de pata induzido por carragenina

Para a avaliação do volume de pata, foi usado o pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo. Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor

digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa, dessa forma, o valor do volume observado. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que os volumes basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. No dia do experimento, carragenina (400 μ g, 20 μ L) foi injetada 30 minutos após administração *i.p.* do composto RIY09 (50, 100 ou 150 mg/Kg), dexametasona (2 mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%). O volume da pata de cada animal foi avaliado 1, 3, 5 e 7h após a injeção do estímulo inflamatório (Fig. 11). Os resultados foram expressos como variação do volume da pata (μ L) em relação aos valores basais.

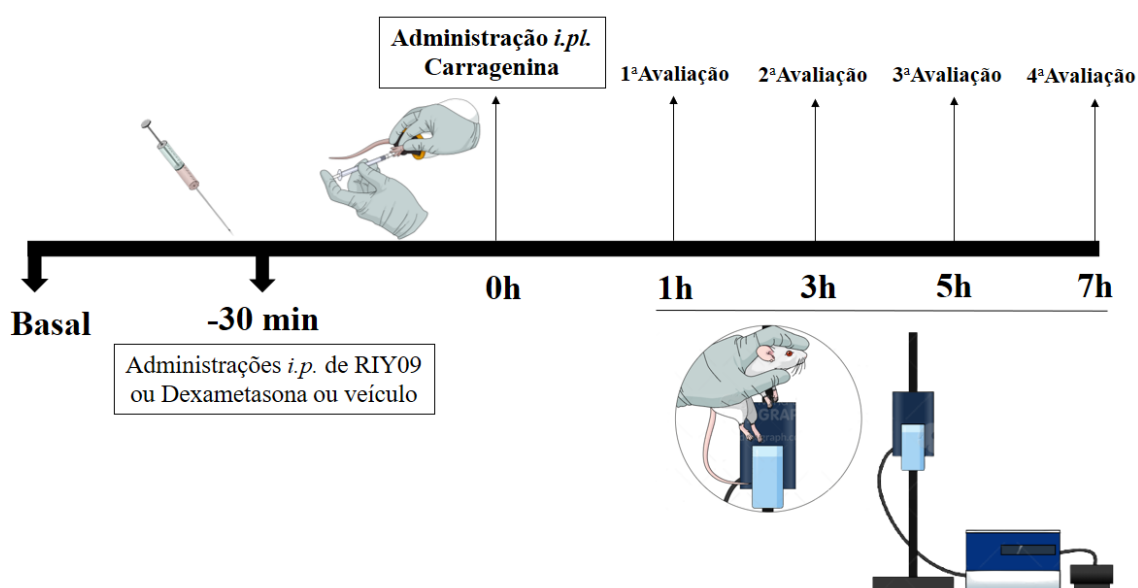


Figura 11. Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelo RIY09 sobre o edema de pata induzido por carragenina.

4.9 Avaliação da produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e CXCL-1, induzida por carragenina.

As concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e CXCL-1 no tecido da pata ipsilateral, foram determinadas utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, EUA). A carragenina (400 μ g, 20 μ L) foi injetada via *i.pl.*, 30 min após administração *i.p.* do composto RIY09 (150 mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (100 / 10mg/Kg, *i.p.*) e eutanasiados por deslocamento cervical após 5h de administração do composto ou veículo, e o tecido da pata foi removido. Após determinação das massas, os tecidos foram homogeneizados

em solução salina tamponada com fosfato contendo Tween-20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (0,1 mM), cloreto de benzametônio (0,1 mM), EDTA (10 mM), aprotinina A (2 mg/mL) e albumina de soro bovino (0,5%), seguida de centrifugação (20.000 rpm) durante 15 min a 4 °C. As amostras de sobrenadante foram armazenadas a -70 °C até a análise das concentrações das citocinas. Os resultados foram expressos em picogramas de citocinas por 100 mg do material coletado.

4.10 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O sedimento resultante após centrifugação do tecido homogeneizado, foi acrescido de 750 µL de solução de NaCl 0,2% gelado para cada 50 mg de tecido. Em seguida, foi adicionado NaCl 1,6% com glicose 5% gelado (750 µL para cada 50 mg de tecido). Uma nova homogeneização foi realizada e o homogenato foi armazenado a -70 °C até a realização do ensaio. Os homogenatos foram inicialmente foram congelados e descongelados três vezes em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas (10.000rpm) por 15min a 4 ° C e os sobrenadantes obtidos foram usados para o ensaio enzimático conforme descrito anteriormente por Melo *et al.* (2019). O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Nos primeiros dois poços, foram adicionados 25µL de tampão PBS (branco). Nos outros poços, foram adicionados, em duplicata, 25µL dos sobrenadantes. Após o preenchimento da placa com todas as amostras, foram adicionados 25µL da solução de 3,3',5,5',-tetrametilbenzidina (TMB; 3,8 mg/mL em DMSO) em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C por 5 min. Após esse intervalo, foram adicionados 100µL da solução de H₂O₂ em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C por 5 min. Para finalizar, foram adicionados 100 µL de H₂SO₄ em cada poço. A atividade da MPO foi calculada de acordo com a alteração da densidade óptica, avaliada em leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 450 nm.

4.11. Avaliação dos efeitos induzidos pelo composto RIY09 no modelo de DN induzida pelo paclitaxel

Anterior a administração do quimioterápico paclitaxel foi realizada a avaliação dos valores basais do limiar de retirada da pata dos animais. Em seguida, foram feitas quatro administrações *i.p.* de paclitaxel (2 mg/Kg) ou veículo (salina) em dias alternados (0, 2, 4 e 6 dias). A alodínia mecânica foi avaliada a cada dois dias, durante 7 dias. A atividade do composto RIY09 foi avaliada após o 7º dia de sensibilização com o quimioterápico. Os animais receberam uma administração *i.p.* de RIY09 nas doses de 50, 100 e 150

mg/Kg (Fig. 12). Os animais também foram tratados com pregabalina em dose única (30 mg/Kg, *p.o.*). A alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 h após a primeira administração do composto RIY09 ou de pregabalina.

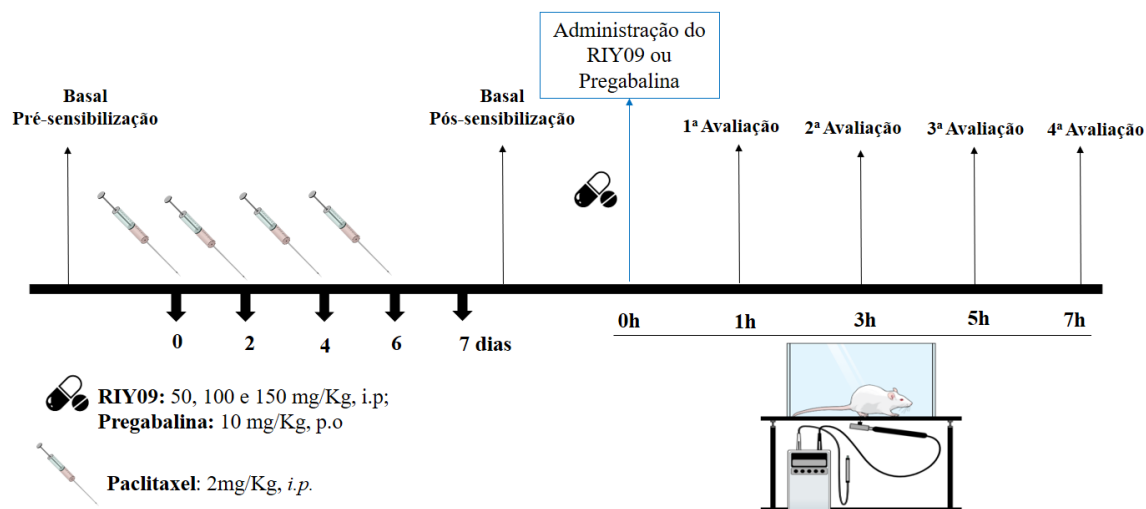


Figura 12. Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo RIY09 em modelo experimental de DN induzida pelo paclitaxel.

4.12. Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida e AM251 sobre a atividade antinociceptiva do composto RIY09 no modelo experimental de DN induzida pelo paclitaxel

Com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do composto RIY09 no modelo experimental de DN induzida pelo paclitaxel, foram utilizados antagonistas opioidérgico (naltrexona) e canabinoidérgico (AM251) e um bloqueador de canais K_{ATP} (glibenclamida). A naltrexona (5 e 10 mg/Kg, *i.p.*) e o AM251 (4 e 8 mg/Kg, *i.p.*) foram administrados 15 min antes da administração do RIY09 (150 mg/Kg, *i.p.*), enquanto a glibenclamida foi administrada *p.o.* nas doses 20 e 40 mg/Kg, em volume 8 mL/Kg, 30 min antes da administração do composto estudado (Fig. 13). O experimento foi realizado no sétimo dia após a primeira administração do quimioterápico paclitaxel. A alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 h após administração do composto.

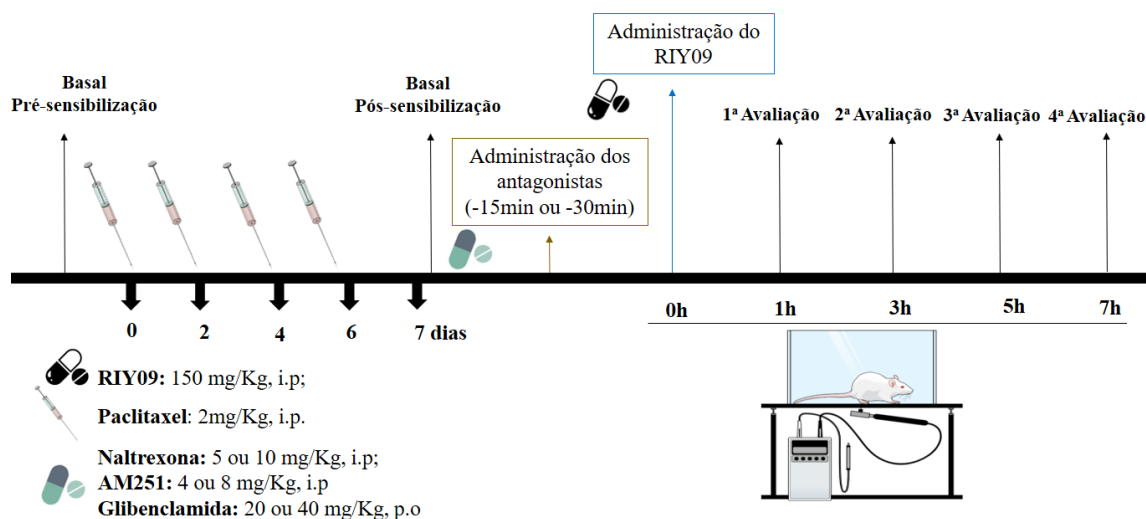


Figura 13. Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo composto RIY09 após tratamento prévio com naltrexona, AM251 ou glibenclamida, sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.

4.13. Avaliação do efeito induzido pelo composto RIY09 nas concentrações de TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β em estruturas do processamento nociceptivo no modelo de DN induzida por paclitaxel.

As concentrações de TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β foram determinadas em estruturas neuronais responsáveis pelo processamento nociceptivo como DRG (L3-L5) e tálamo, utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA). Para investigar o efeito induzido pelo composto sobre a produção de TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β no modelo experimental de DN induzida pelo paclitaxel, os animais foram tratados com o composto RIY09 (150 mg/Kg, *i.p.*) ou veículo (PEG 400 40%), no 7º dia após a primeira injeção de paclitaxel ou salina estéril (controle negativo). Os camundongos foram submetidos à eutanásia 5 h após a administração do composto ou veículo, sendo os DRG's e o tálamo removidos. A determinação da concentração das citocinas inflamatórias foi realizada conforme descrito anteriormente no item 4.9.

4.14. Avaliação da concentração plasmática de nitrito

Cinco horas após a administração *i.p.* do composto RIY09 (150mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%), os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina. Após a decapitação, uma amostra de sangue foi coletada de cada animal em um tubo heparinizado e imediatamente centrifugado a 2.000rpm por 20min a 4° C. Em seguida, as amostras do plasma foram transferidas para tubos plásticos e armazenadas a -70 ° C até a

análise. As amostras de plasma foram analisadas usando um procedimento baseado na reação de Griess (SUN *et al.*, 2003). Resumidamente, 60 μL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftiletenodiamina em 2,5% de ácido fosfórico) foram adicionados a 60 μL das amostras de plasma. Após 10min, as absorvâncias das amostras foram medidas a 540nm. Uma curva de calibração variando de 5 a 240 μM de nitrito de sódio foi preparada em BSA e medida simultaneamente para quantificar o nitrito nas amostras. Os resultados foram expressos em μM .

4.15. Análise estatísticas

Os resultados referentes aos modelos de avaliação da atividade antinociceptiva induzida por placa quente, atividade motora, produção de citocinas inflamatórias, MPO e concentração plasmática de NO, foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. Os resultados referentes aos modelos de alodínia mecânica e edema de pata foram analisados por meio de análise de variância de duas vias, seguida de teste de Bonferroni, exceto os resultados referentes à área sob a curva dos respectivos testes, as quais foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls ou teste t de Student. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos em comparações entre médias. O programa GraphPad Prism[®]5.0 (San Diego, CA, USA) foi usado para tais análises.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do composto RIY09 sobre a resposta nociceptiva induzida por calor

A exposição de camundongos à placa quente induziu uma resposta nociceptiva caracterizada por comportamentos indicativos de desconforto (lambida das patas ou saltos). A administração prévia (-30 min) *i.p.* do composto RIY09 (100 ou 150 mg/Kg), bem como a administração *p.o.* de dipirona (500 mg/Kg), usada como controle positivo, aumentaram a latência da resposta nociceptiva (Fig. 14).

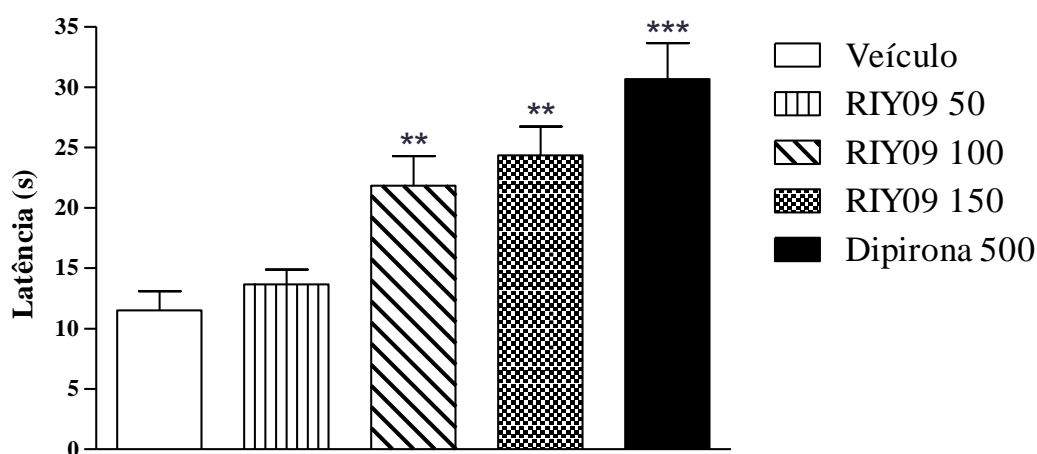


Figura 14. Efeito da pré-administração (30min) do composto RIY09 (50, 100 ou 150mg/Kg, *i.p.*), dipirona (500mg/Kg, *p.o.*) ou veículo (PEG 400 40%, *i.p.*) na resposta nociceptiva induzida pelo calor. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.2. Efeito do composto RIY09 sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina

Após observarmos a atividade do composto RIY09 em modelo de dor nociceptiva induzida por calor, investigamos seu efeito em modelo de dor inflamatória induzida por carragenina. A administração *i.pl.* de carragenina (400 μ g, 20 μ L) induziu alodínia mecânica acentuada e duradoura. A administração prévia (-30 min) *i.p.* da maior dose do composto RIY09 (150 mg/Kg) ou da dexametasona (2 mg/Kg), utilizada como controle positivo, diminuiu a alodínia mecânica nos tempos 1, 3, 5 e 7 h após a administração da carragenina. A dose intermediária do composto RIY09 (100 mg /Kg, *i.p.*) também exibiu atividade nos tempos 3 e 5 h, após a administração do estímulo inflamatório (Fig. 15).

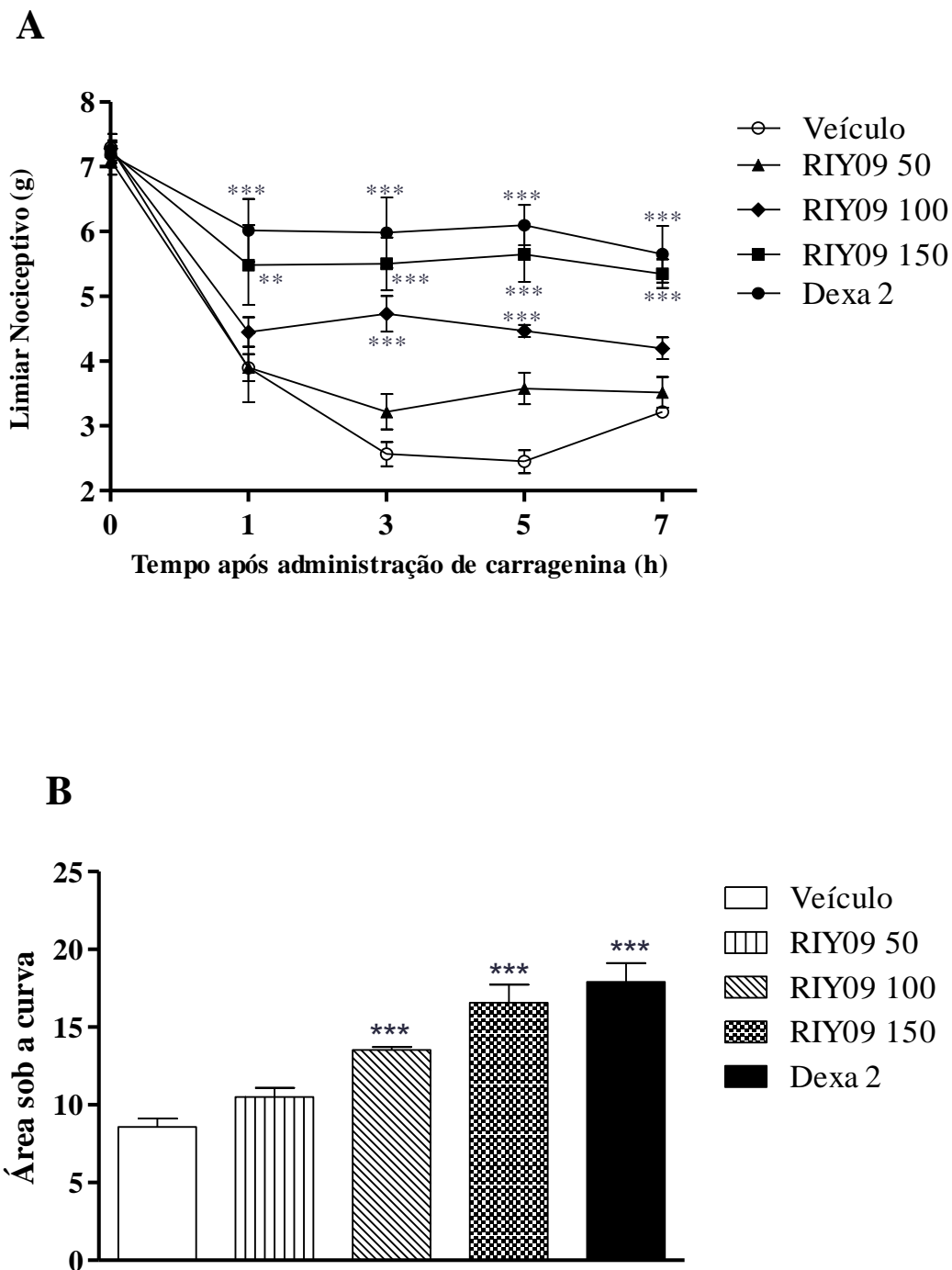


Figura 15. Efeito da administração prévia (-30 min) *i.p.* do composto RIY09 (50, 100 ou 150 mg/Kg), dexametasona (Dexa; 2 mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%) na alodínia mecânica induzida por administração *i.pl.* de carragenina (Cg; 400 µg). **A** representa o curso temporal e **B** representa a ASC. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.3 Efeito induzido pelo composto RIY09 sobre a coordenação motora

Para investigar se o efeito antinociceptivo induzido pelo composto RIY09 não é resultado de comprometimento da coordenação motora, foi avaliado o efeito induzido pelo composto sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante. Observamos que a coordenação motora dos animais não foi alterada nos tempos avaliados (0.5, 1, 3, 5 e 7 h) após a administração do composto RIY09 B (150 mg/Kg, *i.p.*). No entanto, o fenobarbital (50 mg/Kg, *p.o.*) reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais na haste girante (Fig. 16).

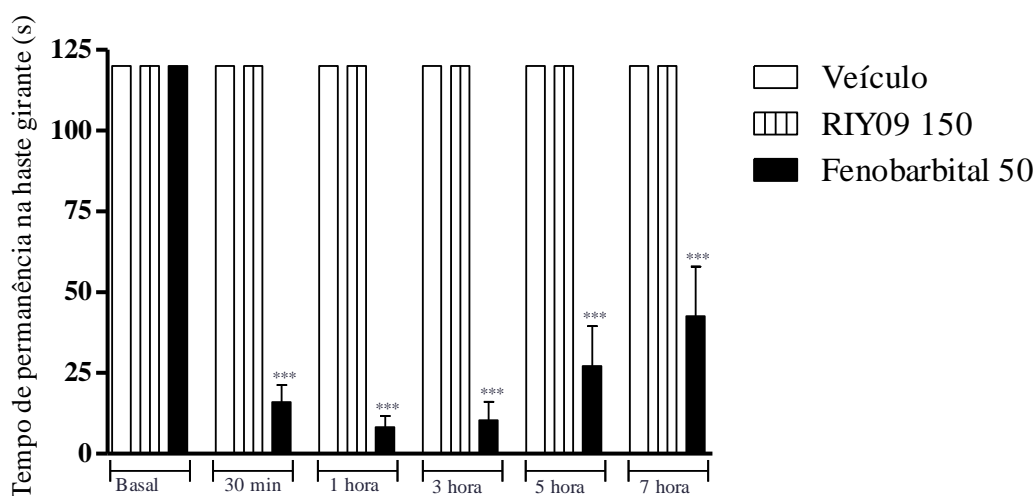


Figura 16. Efeito da administração prévia (-30min) do composto RIY09 (150mg/Kg, *i.p.*), fenobarbital (50mg/Kg, *p.o.*) ou veículo (PEG 400 40%, *i.p.*) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. *** indica diferença significativa em relação ao grupo do veículo ($p < 0,001$). $n = 6$.

5.4 Efeito do composto RIY09 sobre o edema de pata induzida por carragenina

A administração *i.pl.* da carragenina (400 μ g, 20 μ L), além de induzir alodínia mecânica, também induziu um edema de pata acentuado e duradouro. A administração prévia (-30 min) *i.p.* da maior dose (150mg /Kg) e a dose intermediária do composto RIY09 (100mg /Kg) ou da dexametasona (2mg/Kg), utilizada como controle positivo, diminuíram a formação de edema de pata nos tempos 3, 5 e 7h após a administração da carragenina. A menor dose avaliada do composto RIY09 (50mg /Kg, *i.p.*) também exibiu atividade anti-edematogênica nos tempos 5 e 7 h, após a administração do estímulo inflamatório (Fig. 17).

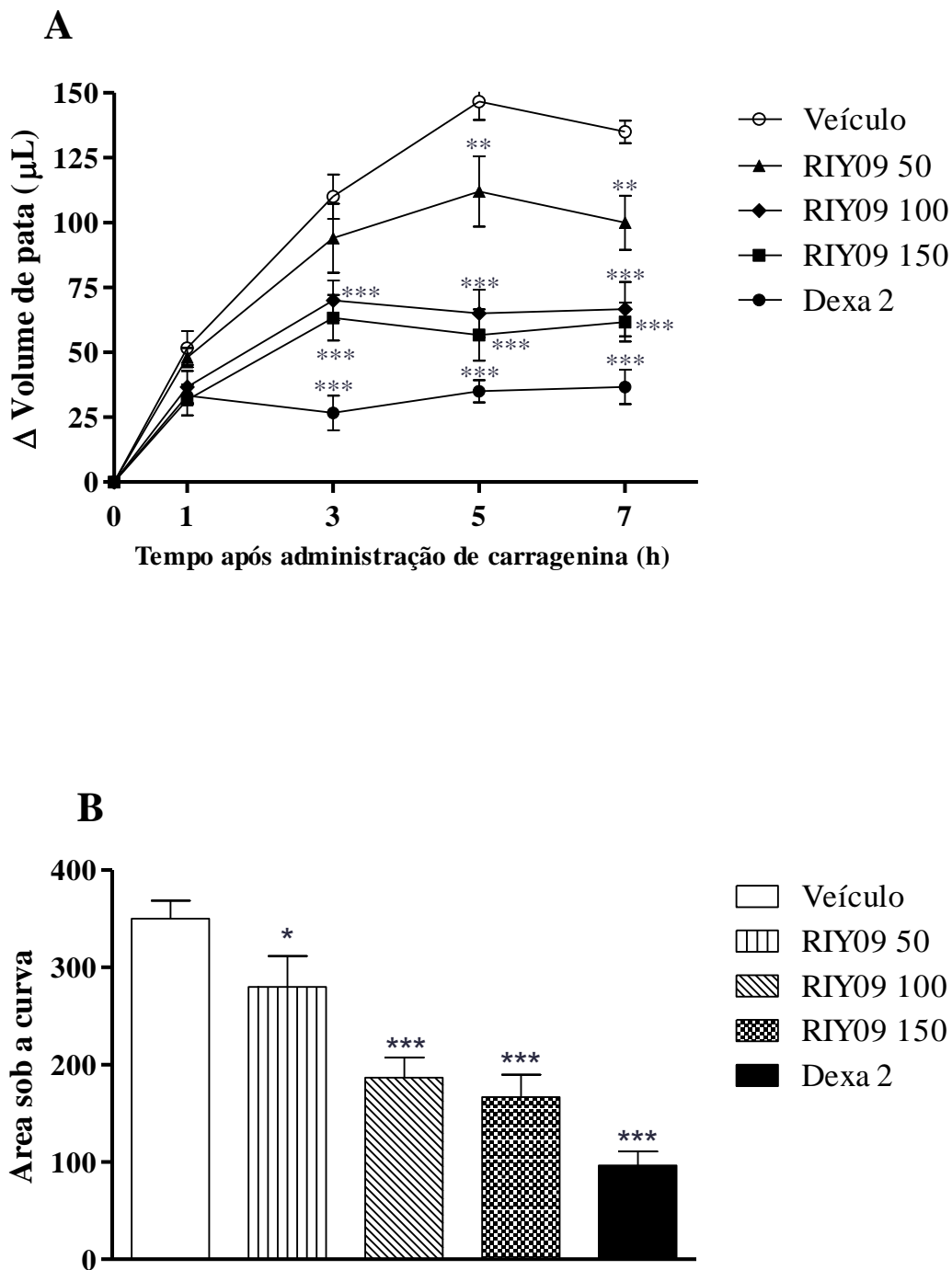


Figura 17. Efeito da administração prévia (-30 min) *i.p.* do composto RIY09 (50, 100 ou 150 mg/Kg), dexametasona (Dexa; 2 mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%) no edema da pata induzido pela administração *i.pl.* de carragenina (Cg; 400 μg). **A** representa o curso temporal e **B** representa a ASC. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.5 Efeitos induzidos pelo composto RIY09 sobre a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e CXCL-1 na pata.

Após cinco horas da administração *i.pl.* da carragenina (400 μ g, 20 μ L) houve um aumento das concentrações de IL-6, IL-1 β , TNF- α e CXCL-1 no tecido da pata (Fig. X). O composto RIY09 (150 mg/kg, -30min, *i.p.*) reduziu acentuadamente as concentrações de IL-6, IL-1 β , TNF- α e CXCL-1 (Fig. 18) no tecido da pata. Além disso, o tratamento com o composto RIY09 também proporcionou um aumento da concentração de IL-10 (Fig. 18).

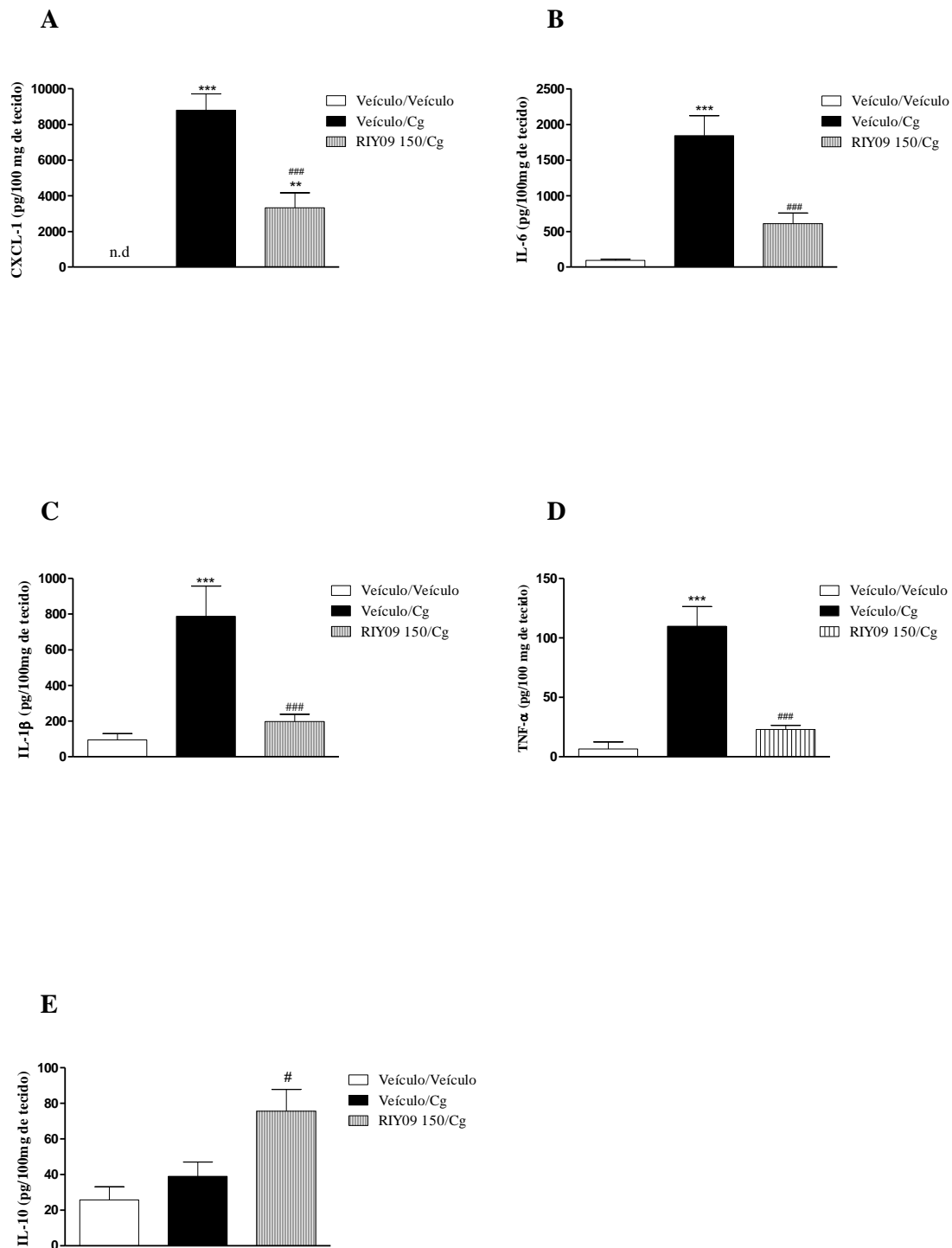


Figura 18. Efeito da administração prévia (-30 min) *i.p.* do composto RIY09 (150 mg/Kg) ou veículo (PEG 400, 40%) na produção de CXCL-1 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), TNF- α (D) e IL-10 (E) induzidas pela administração *i.pl.* de carragenina (Cg; 400 μ g). As concentrações das citocinas no tecido da pata foram avaliadas 5 h após a administração da carragenina. n.d: não detectável. *** indica diferença significativa em relação ao grupo Veículo/Veículo (PEG 400/Solução salina) ($p < 0,001$). # e ### indicam diferenças

significativas em relação ao grupo Veículo/Cg (PEG 400/Carragenina) ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.6 Efeitos induzidos pelo composto RIY09 sobre a atividade da MPO

Após cinco horas da administração *i.pl.* da carragenina (400 μ g, 20 μ L) houve um aumento da atividade da MPO no tecido da pata, indicando indiretamente um aumento do recrutamento de neutrófilos (Fig. 19). O composto RIY09 (150 mg/kg, -30min, *i.p.*) reduziu acentuadamente a atividade da enzima MPO.

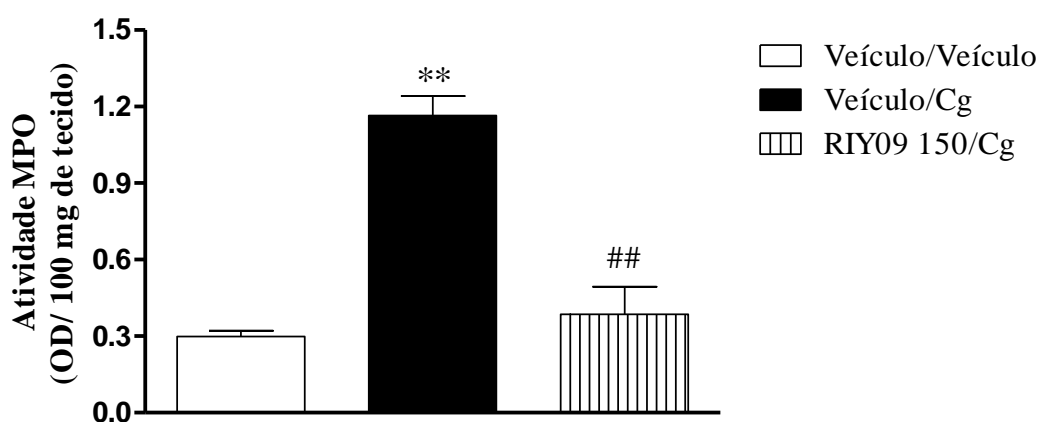


Figura 19. Efeito da administração prévia (-30 min) *i.p.* do composto RIY09 (150 mg/Kg) ou veículo (PEG 400 40%) na atividade de MPO induzida pela administração *i.pl.* de carragenina (Cg; 400 μ g). A atividade da MPO no tecido da pata foi avaliada 5 h após a administração de carragenina. ** indica diferença significativa em relação ao grupo Veículo/Veículo (PEG 400/Solução salina) ($p < 0,01$). ## indica diferença significativa em relação ao grupo Veículo/Cg (PEG 400/Carragenina) ($p < 0,01$). $n = 6$.

5.7. Efeito induzido pela RIY09 sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel

RIY09 (50, 100 e 150 mg/Kg) foi administrado *i.p.* no sétimo dia após a primeira administração de paclitaxel. Todas as doses do composto RIY09 estudadas (Fig. 20) atenuaram a alodínia mecânica induzida pelo quimioterápico quando comparadas com o grupo veículo. A menor dose (50 mg/Kg) atenuou a alodínia mecânica na 3^a e 5^a h avaliada. As demais doses (100 e 150 mg/Kg) reduziram a alodínia mecânica em todos os tempos avaliados. A maior dose (150 mg/Kg) apresentou melhor atividade antinociceptiva com seu efeito máximo na 5^a h avaliada. O veículo utilizado no estudo não afetou a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. Adicionalmente, observamos que a pregabalina (30 mg/Kg, *p.o.*) reduziu a alodínia mecânica em todos os tempos avaliados, com pico de atividade antinociceptiva na 5^a h.

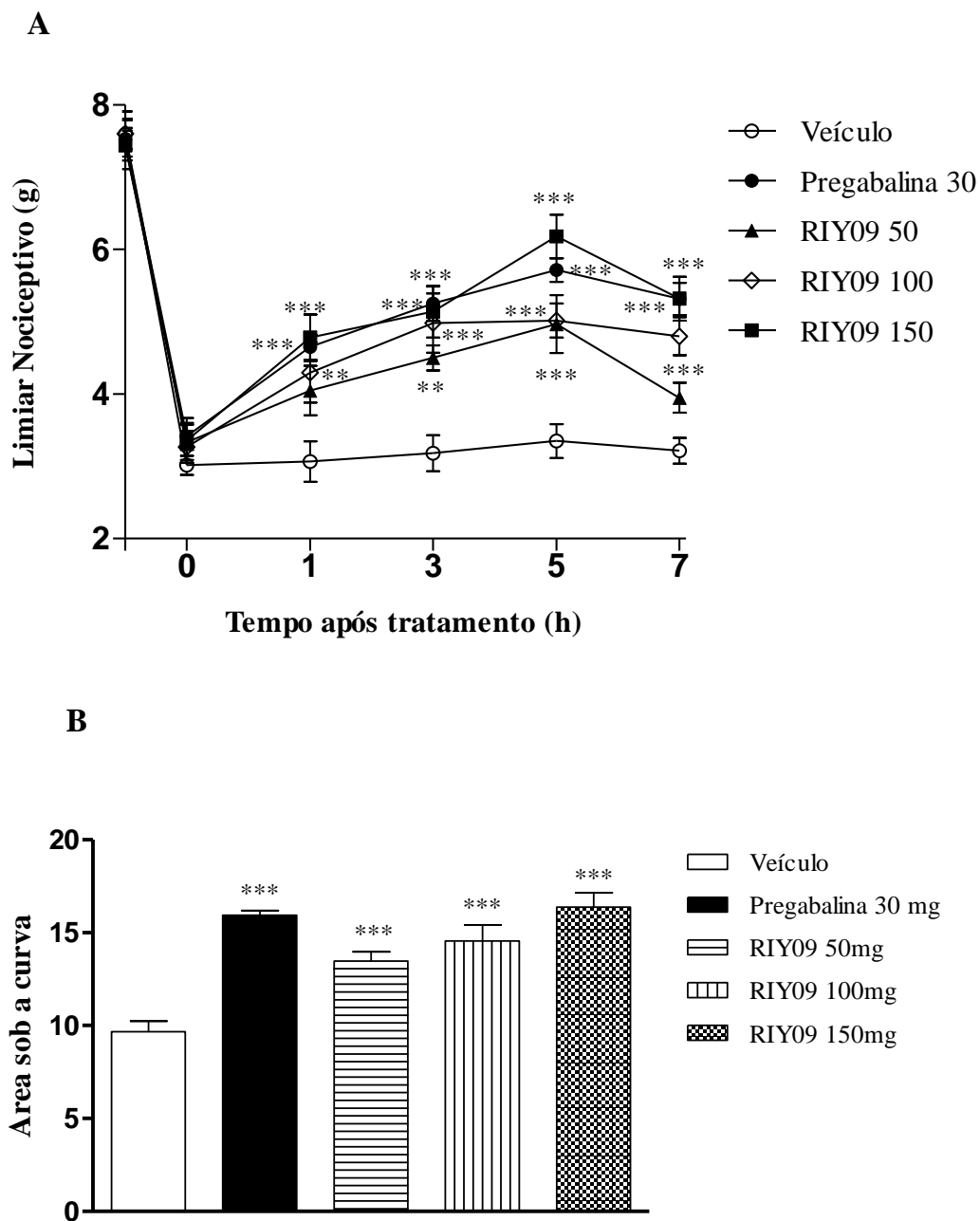


Figura 20. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, *i.p.*) ou pregabalina (30 mg/Kg, *p.o.*) sobre alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. **A** representa o curso temporal e **B** representa a ASC. ** e *** indicam diferenças significativas em relação ao grupo veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

5.8. Efeitos induzidos pela naltrexona, glibenclamida ou AM251 sobre a atividade antialod do RIY09

Para investigar os possíveis mecanismos que medeiam a atividade antinociceptiva do composto RIY09, um antagonista opioidérgico não -seletivo (naltrexona), um antagonista de receptor canabinoide (CB1) (AM251) e um bloqueador de canais para potássio ATP-dependente (glibenclamida) foram utilizados. Naltrexona e AM251 foram administradas 15 min antes, enquanto glibenclamida foi administrada 30 min antes da primeira administração do composto estudado. A alodínia mecânica foi induzida pelo paclitaxel, como abordado anteriormente, e avaliada 7 dias após a primeira administração do quimioterápico. A administração de RIY09 na dose de 150 mg/Kg, *i.p.* reduziu a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em todos ensaios realizados (Fig. 21, 22 e 23). A atividade antinociceptiva do composto RIY09 foi parcialmente atenuada pela administração prévia de naltrexona (10 mg/Kg, *i.p.*; Fig. 21) ou AM251 (4 e 8 mg/Kg, *i.p.*; Fig. 23), mas não pela administração prévia de glibenclamida (20 e 40 mg/Kg, *p.o.*; Fig. 22). Naltrexona (10 mg/Kg, *i.p.*), AM251 (8 mg/Kg, *i.p.*) ou glibenclamida (40 mg/Kg, *p.o.*) não alteraram a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.

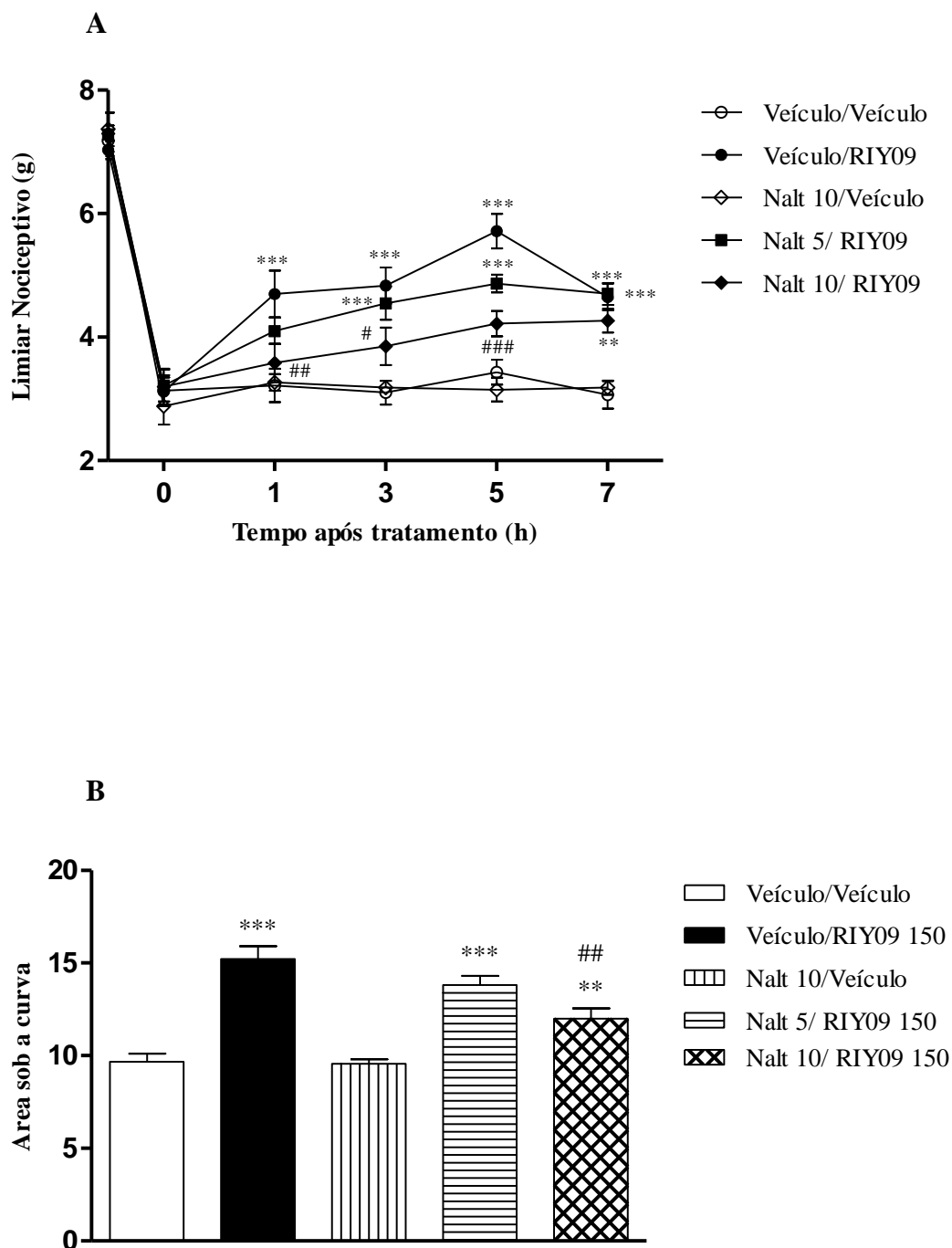


Figura 21. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em animais previamente (-15 min) tratados com naltrexona (Nalt; 5 ou 10 mg/Kg, i.p.). **A** representa o curso temporal e **B** representa a ASC. ** e *** indicam diferenças significativas em relação grupo Veículo/Veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). #, ## e ### indicam diferenças significativas em

relação ao grupo Veículo/Veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

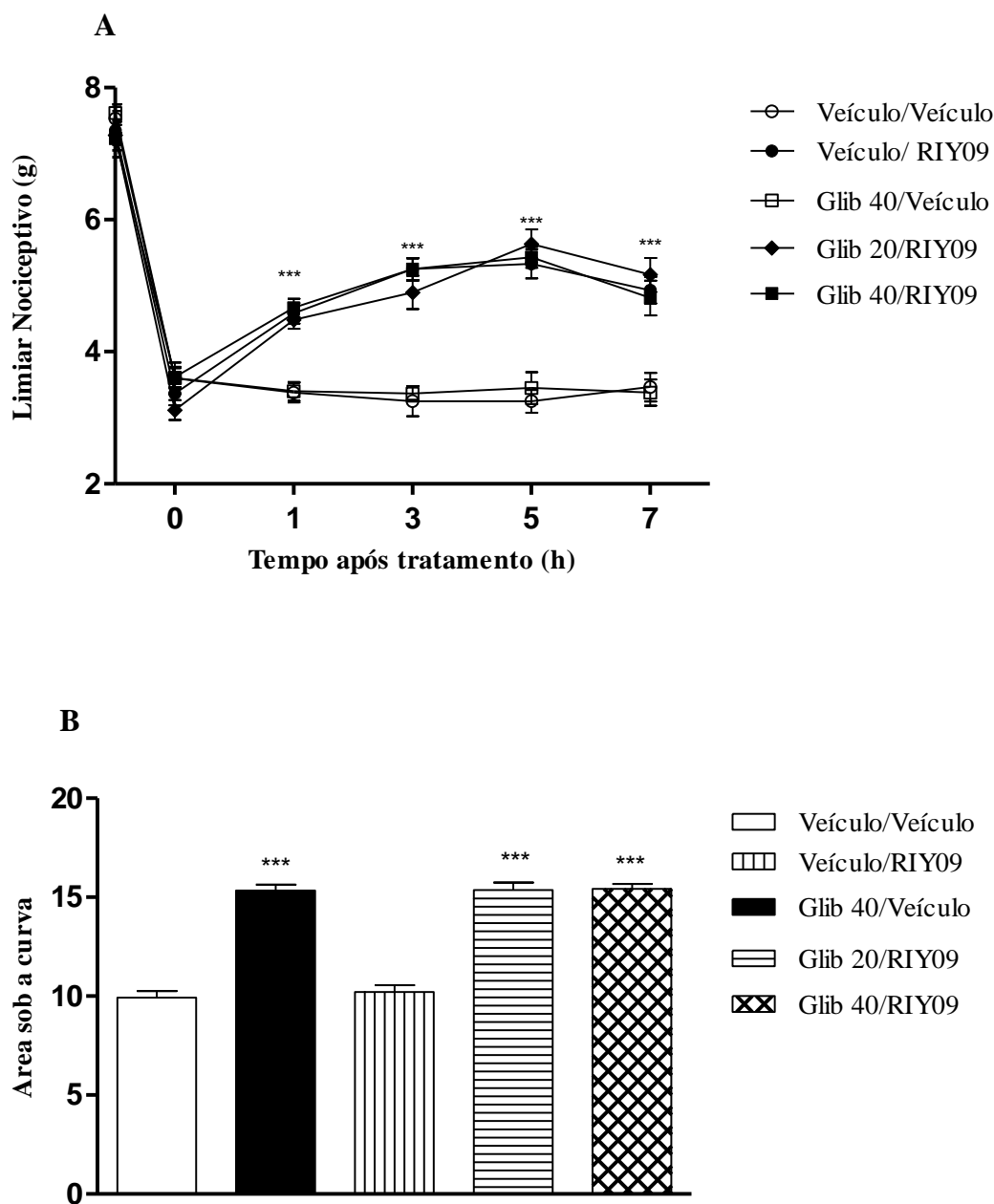


Figura 22. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, *i.p.*) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em animais previamente (-30 min) tratados com glibenclamida (Glib; 20 ou 40 mg/Kg, *p.o.*). **A** representa o curso temporal e **B** representa a ASC. *** indica diferença significativa em relação ao grupo Veículo/Veículo ($p < 0,001$).

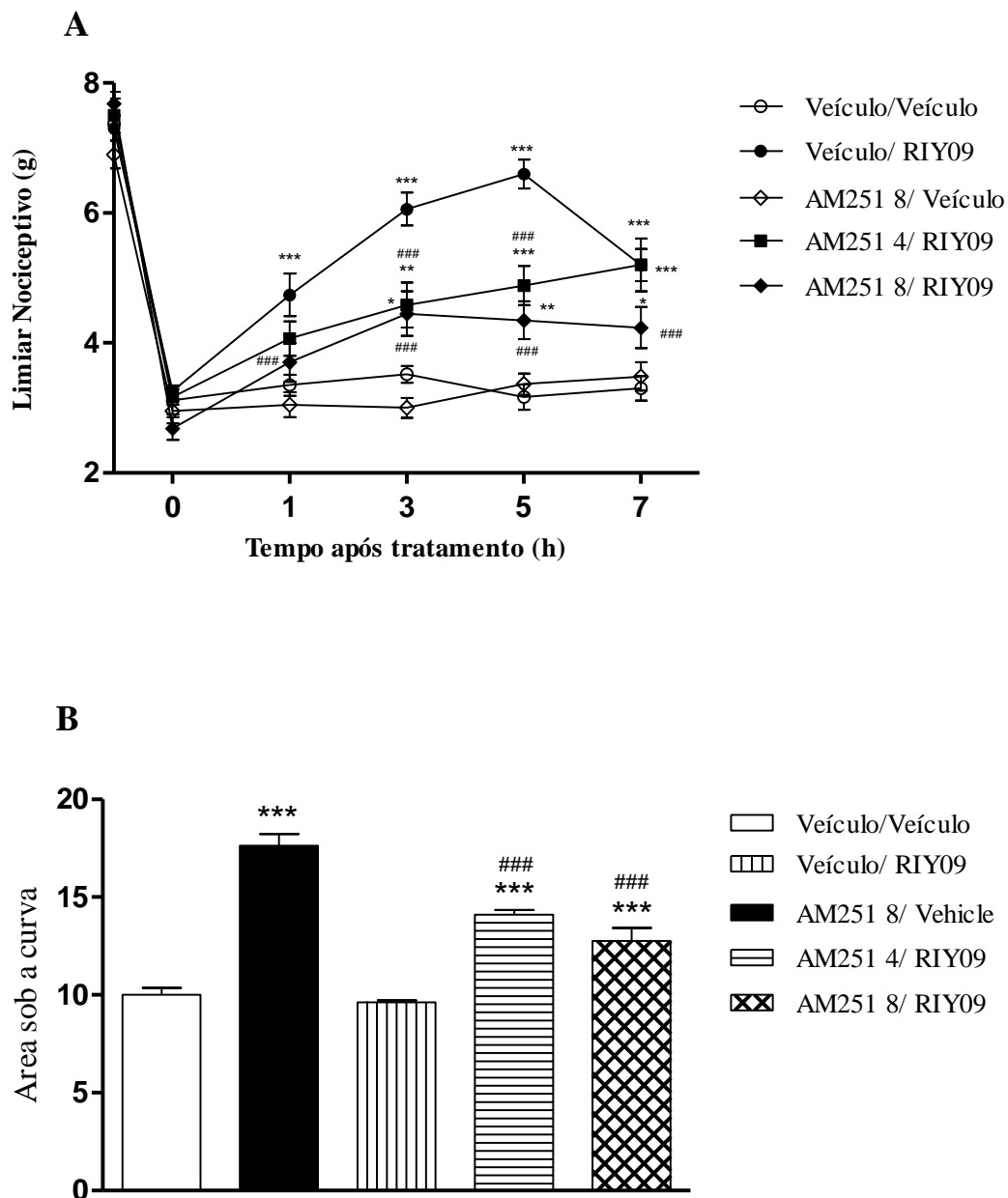


Figura 23. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, *i.p.*) sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel em animais previamente (-15 min) tratados com AM251 (AM251; 4 ou 8 mg/Kg, *i.p.*). **A** representa o curso temporal e **B** representa a ASC. *, **, *** indicam diferença significativa em relação ao grupo Veículo/Veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). ### indica diferenças significativas em relação ao grupo Veículo/RIY09 ($p < 0,001$). $n = 6$.

5.9. Efeitos induzidos pelo RIY09 sobre a produção de CXCL-1, TNF- α e IL-1 β nas estruturas DRG e tálamo

As concentrações de CXCL-1 (Fig. 24), TNF- α (Fig. 25) e IL-1 β (Fig. 26) nos DRG (L3-L5) e tálamo aumentaram após sete dias da primeira administração de paclitaxel em uma dose total administrada de 8mg/Kg, i.p. Os efeitos induzidos pelo RIY09 (150 mg/Kg, i.p.) sobre as concentrações de CXCL-1, TNF- α e IL-1 β foram avaliados na 5^a h após a administração do composto. Observamos que o RIY09 na maior dose estudada conseguiu reduzir significativamente as concentrações das citocinas inflamatórias nas estruturas do processamento nociceptivo DRG e tálamo.

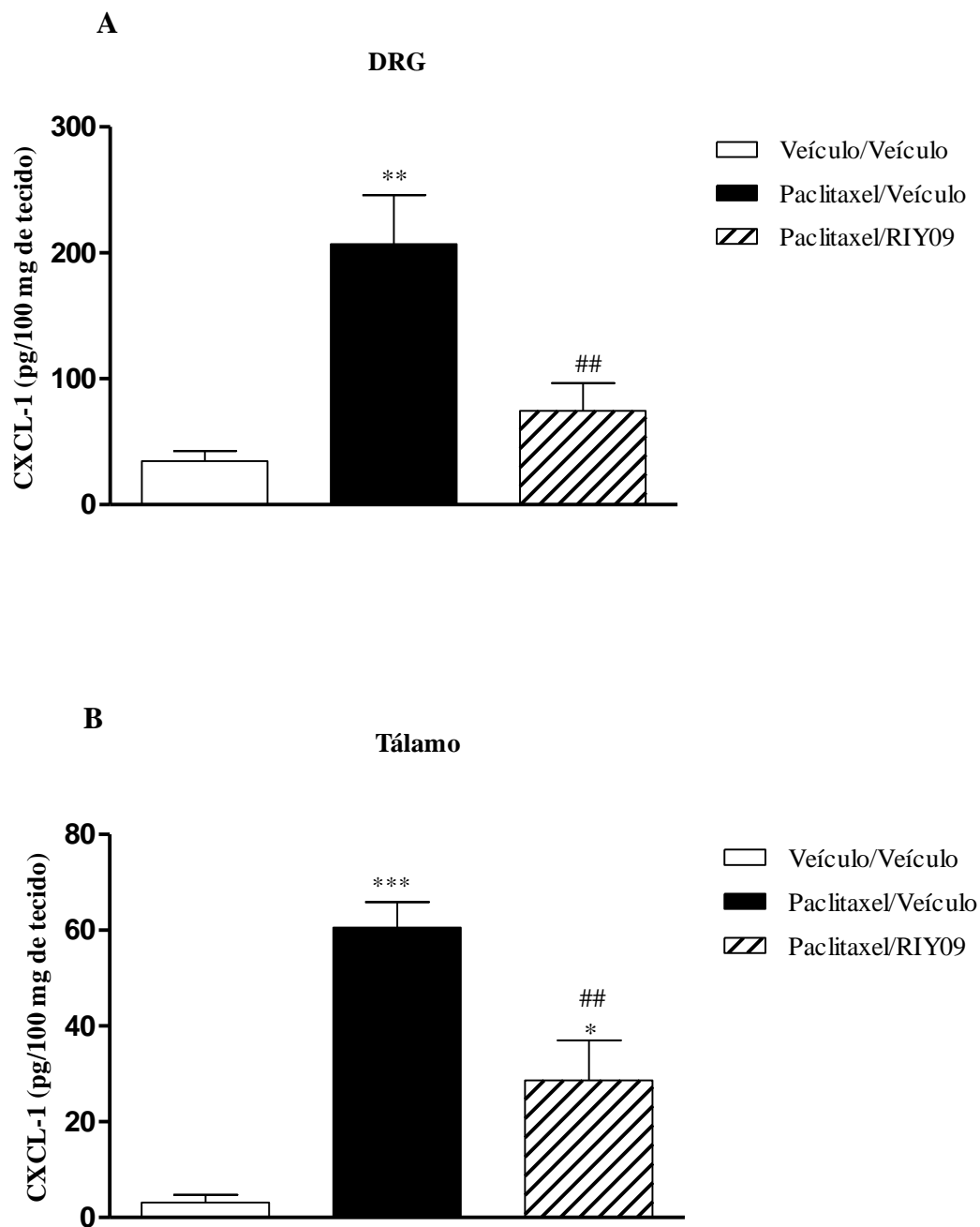


Figura 24. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, i.p.), sobre a produção de CXCL-1 nos DRG (A) e tálamo (B). *, ** e *** indicam diferenças significativas em relação ao grupo Veículo/Veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). ## indica diferença significativa em relação ao grupo Paclitaxel/Veículo ($p < 0,01$). $n = 6$.

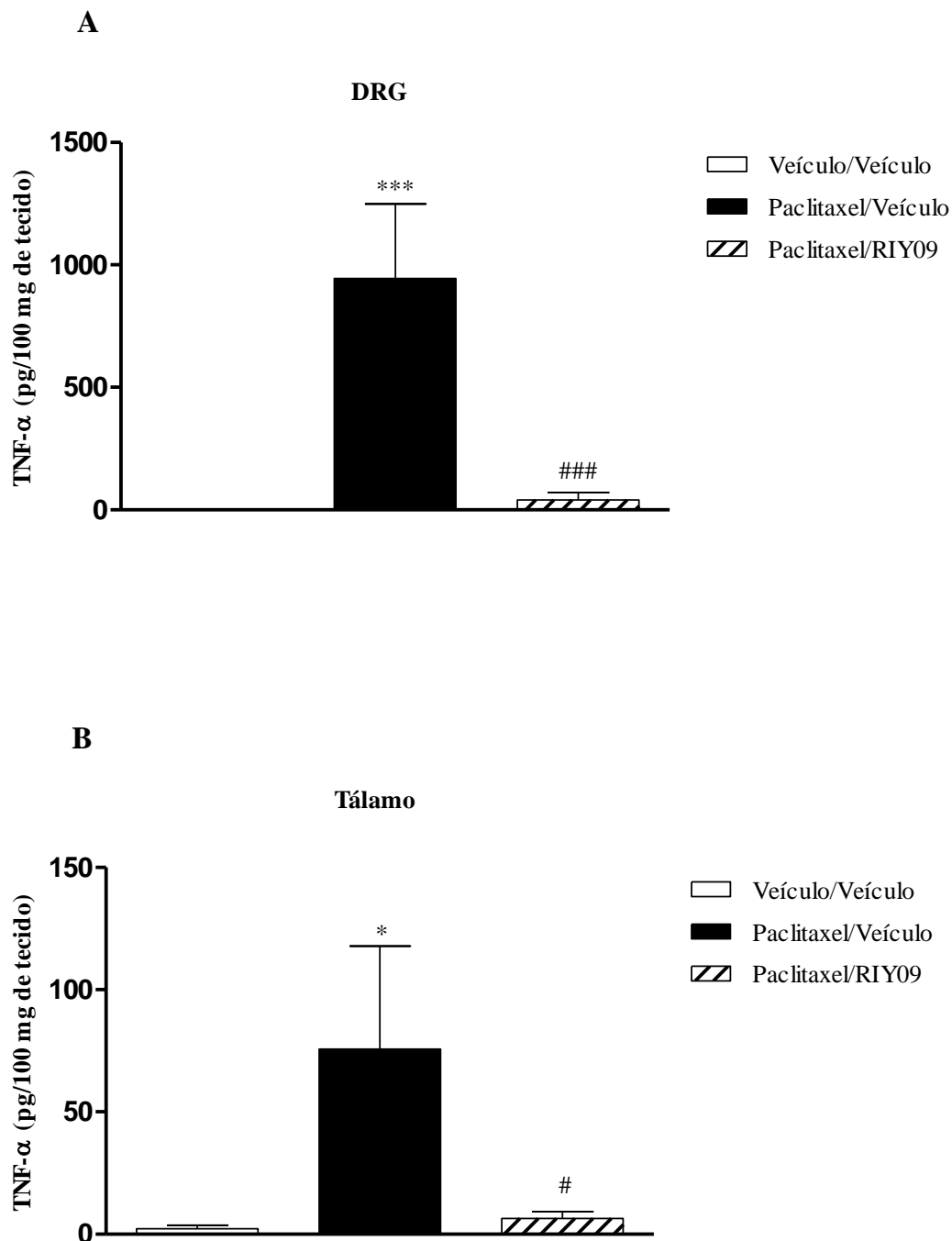


Figura 25. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, i.p.) sobre a produção de TNF- α nos DRG (A) e tálamo (B). * e *** indicam diferenças significativas em relação ao grupo Veículo/Veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). # e ### indicam diferenças significativas em relação ao grupo Paclitaxel/veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

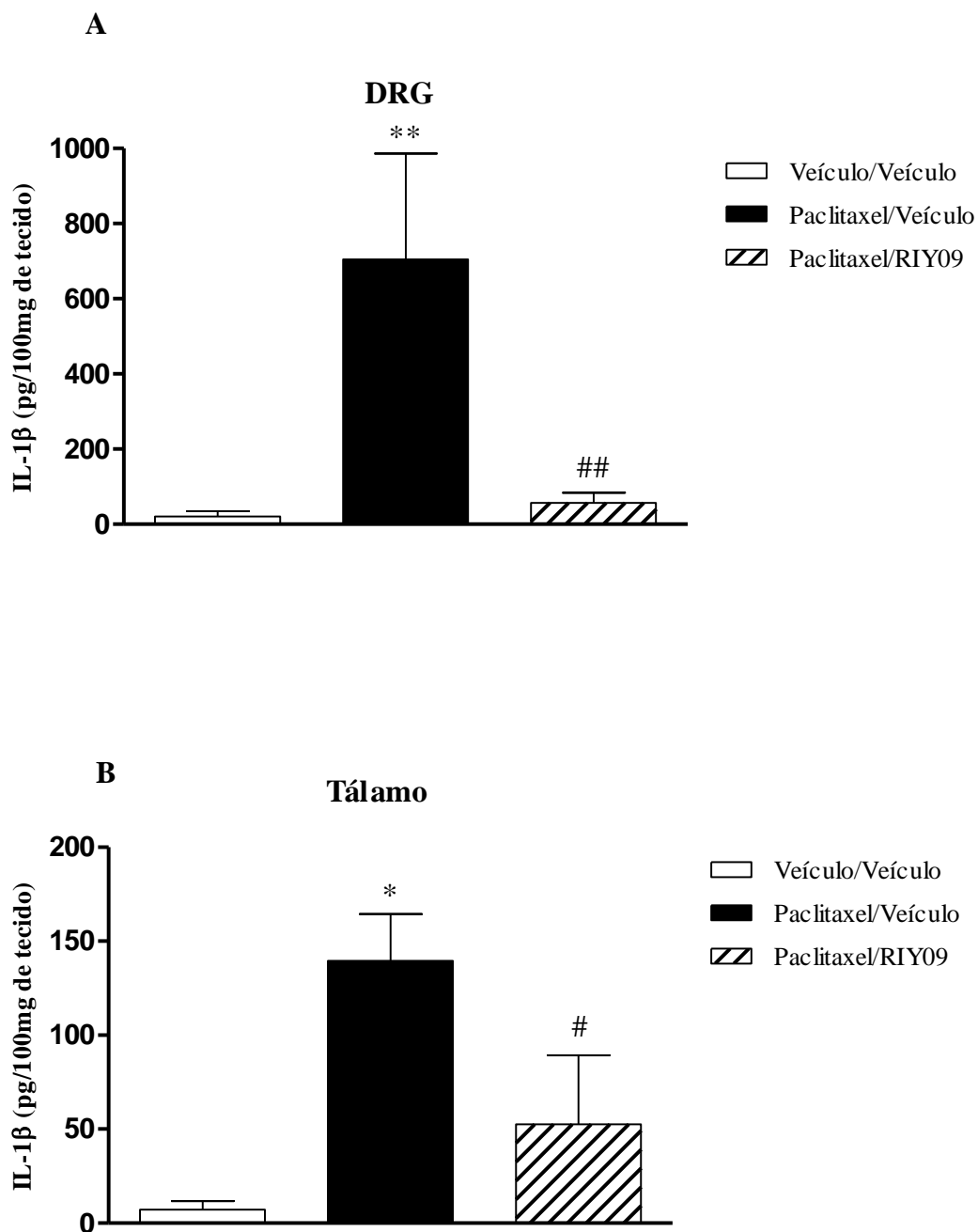


Figura 26. Efeito induzido pela administração de RIY09 (150 mg/Kg, i.p.) sobre a produção de IL-1 β nos DRG (A) e tálamo (B). * e ** indicam diferenças significativas em relação ao grupo Veículo/Veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). # e ## indicam diferenças significativas em relação ao grupo Paclitaxel/Veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n = 6$.

5.10 Efeito induzido pelo composto RIY09 na concentração plasmática de nitrito

A concentração de nitrito no plasma foi avaliada 5 h após administração *i.p.* do veículo (PEG 400 40%) ou do composto RIY09 (150 mg/Kg). Observamos aumento na concentração de nitrito plasmático (aproximadamente em 70 μM) após a administração do composto RIY09 em relação ao grupo controle (Fig. 22).

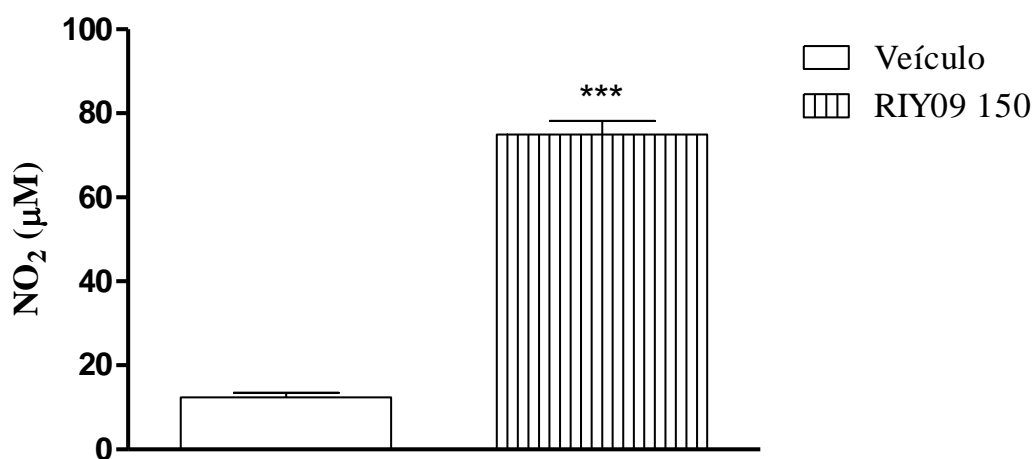


Figura 22. Concentrações plasmáticas de nitrito 5h após administração *i.p.* do composto RIY09 (150 mg /Kg) ou veículo (PEG 400 40%). *** indica diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,001$). $n = 7$.

6. DISCUSSÃO

Diante das limitações que os fármacos analgésicos e anti-inflamatórios apresentam, como baixa eficácia e segurança inadequada, investigações pré-clínicas e clínicas que tenham como objetivo identificar novas abordagens farmacoterapêuticas para o manejo de quadros dolorosos e inflamatórios tornam-se necessárias.

Diversas atividades relacionadas à administração de nitratos orgânicos ou substâncias doadoras de NO têm sido demonstradas (DUARTE *et al.*, 1990; KARLSSON *et al.*, 2009; WRITE *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2010). Considerando as atividades biológicas do NO, algumas linhas de pesquisa se concentraram na modulação dessas atividades, por meio do fornecimento desse mediador, através do desenho e síntese de compostos acoplados a um grupo doador de NO.

O papel antinociceptivo e anti-inflamatório do NO está elucidado em alguns modelos experimentais (DUARTE *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 1991; PRADO *et al.*, 2002; ROMERO *et al.*, 2011). A modificação estrutural de drogas anti-inflamatórias, como os AINEs e glicocorticóides, pela adição de uma fração liberadora de NO, resulta no aumento da eficácia dessas drogas e na diminuição das reações adversas causadas por elas (WALLACE *et al.* 1994; TURNBULL *et al.*, 2008; ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2003; TALLET *et al.*, 2002; FIORUCCI *et al.*, 2000; WALLACE *et al.*, 1999; DAVIES *et al.*, 1997; WALLACE *et al.* 1994). Outros estudos demonstram a participação da via dependente de NO na ação antinociceptiva de alguns neurotransmissores e fármacos como a acetilcolina (DUARTE *et al.*, 1990), morfina (FERREIRA *et al.*, 1991) e canabinoides (REIS *et al.*, 2009). Esses resultados fornecem subsídios adicionais para a investigação de novos compostos com estruturas simples que possam atuar, por meio da liberação de NO, com potencial efeito analgésico e antiinflamatório.

No presente estudo, investigamos as atividades do composto ácido 4-((nitrooxi)metil)-3-nitrobenzoico, denominado RIY09, em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação. O RIY09 apresentou, nas diferentes doses avaliadas e por via *i.p.*, atividade em modelos de dor inflamatória e edema e dor nociceptiva.

Primeiramente, observamos que o composto RIY09 aumentou acentuadamente a latência para a resposta nociceptiva exibida pelos animais no modelo de dor nociceptiva por placa

quente, e seu efeito foi semelhante ao apresentado pela dipirona. A atividade apresentada pelo RIY09 nesse modelo indica que ele pode inibir o processamento nociceptivo no sistema nervoso central (SNC) e/ou a ativação de nociceptores termossensíveis. Em modelos de dor nociceptiva, como a placa quente a resposta nociceptiva imediata apresentada pelos animais, como lambida das patas ou saltos, ocorre devido a uma ativação direta de nociceptores termossensíveis em um processamento central, sem envolvimento de células ou mediadores inflamatórios (LEBARS *et al.*, 2001; TOMINAGA *et al.*, 1998). Nesse modelo há ativação de receptores da família TRP que serão ativados pelo calor, que atua como estímulo nocivo (TOMINAGA, 2007). Esse resultado indica que possivelmente o composto RIY09 chega em concentrações satisfatórias no SNC. Outros estudos demonstraram que doadores de NO conhecidos, como nitroprussiato e morfolino-sidnonimina, também exibem atividade em modelos de dor nociceptiva (SOUSA & PRADO, 2001; XU *et al.*, 1995).

Posteriormente, utilizamos o modelo experimental de inflamação aguda induzida por carragenina para investigarmos as atividades do RIY09 sobre alodínia mecânica e o edema de pata. Demonstramos que o composto aumentou o limiar nociceptivo e foi capaz de reduzir o edema de pata dos animais sensibilizados com o estímulo inflamatório. Como a maior dose avaliada do composto não afetou o tempo de permanência dos animais no modelo de haste girante, é improvável que a inibição do comportamento nociceptivo nos modelos de dor seja devido ao relaxamento muscular ou comprometimento da coordenação motora.

Sabe-se que o NO periféricamente pode desempenhar papéis tanto pró-nociceptivos quanto antinociceptivos (CURY *et al.*, 2011). Alguns trabalhos mostram que após a administração *i.pl.* de carragenina, o NO pode exacerbar o processo inflamatório devido a liberação de PGE₂ e PGI₂ por ativação na fase inicial de COX-1 e posteriormente da COX-2, contribuindo para suas ações pro-nociceptivas (TORIYABE *et al.*, 2004; OMOTE *et al.*, 2001). Esse efeito possivelmente não ocorre com a administração do composto RIY09, por este apresentar acentuada atividade em modelo de dor inflamatória induzida por carragenina. Duarte *et al.*, (1990) demonstraram que a administração *i.pl.* de nitroprussiato de sódio (doador de NO) gera um efeito antinociceptivo em animais em um teste de hiperalgesia da pata com PGE₂, sugerindo que a ação antinociceptiva do NO depende de uma via de sinalização intracelular envolvendo a formação de GMP cíclico.

Assim, a ação antinociceptiva do NO depende de uma via de sinalização intracelular que inclui a formação de GMP cíclico, com posterior ativação de PKG e consequente abertura de canais de K^+ , causando hiperpolarização de neurônios nociceptivos (GOMES *et al.*, 2020; CURY *et al.*, 2011).

Também foi demonstrado que outros doadores de NO, como nitroprussiato, S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (FERNANDES *et al.*, 2002) e nicorandil (DUTRA *et al.*, 2013) inibem o edema inflamatório induzido por carragenina e outros estímulos, assim como, a sensibilização em um modelo de dor inflamatória. Análogos ftalimídicos, que também liberam NO, inibem o processamento nociceptivo (1ª fase) e reduziram a resposta inflamatória (2ª fase) em modelo experimental de dor induzida por formaldeído (GODIN *et al.*, 2015).

Demonstramos também que após a 5 h de administração *i.p.* do RIY09 houve aumento nas concentrações plasmáticas de nitrito, indicando que ele possivelmente libera NO, correlacionando-se com as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória apresentadas por este novo composto. Demonstramos, em um estudo eletroquímico (Braga *et al.* 2021), que a liberação de nitrato do composto RIY09 ocorre pela clivagem da ligação simples CH_2-ONO_2 e *in vivo*, o nitrato pode ser metabolizado em nitrito, seguido por redução em NO (LUNDBERG *et al.*, 2008).

Nossos resultados também indicam que as atividades do composto RIY09 nos modelos de dor inflamatória e edema induzidos por carragenina podem estar associadas a efeitos inibitórios no recrutamento de neutrófilos e na produção de mediadores pró-inflamatórios. Tanto a infiltração de neutrófilos quanto a produção de citocinas inflamatórias desempenham papéis importantes nos mecanismos que levam à formação do edema inflamatório e consequentemente a sensibilização da via nociceptiva (KLINKE *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2006; BRACK *et al.*, 2004). O composto RIY09 reduziu acentuadamente a atividade de MPO no tecido da pata, uma evidência indireta de um efeito inibidor no recrutamento de neutrófilos. Van Uffelen *et al.* (1996) demonstraram que a migração neutrofilica depende da concentração de NO em um modelo de migração de neutrófilos peritoneais de coelhos. Wanikiat *et al.* (1997) também demonstram esse efeito, onde demonstraram que altas concentrações de NO, após o tratamento com

compostos liberadores de NO, inibem o recrutamento de neutrófilos *in vitro*, enquanto em baixas concentrações, o NO pode gerar a ativação da migração de neutrófilos.

Além disso, o NO regula negativamente a secreção de neutrófilos (MAY *et al.*, 1991) e a expressão de moléculas de adesão (integrinas $\beta 2$) nessas células (BANICK *et al.*, 1997). Dal secco *et al.* (2003) também observaram que a produção de NO pela NOS constitutiva (cNOS) ou NOS induzível (iNOS) pode modular negativamente a migração de neutrófilos para locais inflamados, devido à diminuição da rolagem e adesão dessas células no endotélio.

A inibição *in vivo* do recrutamento de neutrófilos também foi demonstrada após a administração de doadores de NO, como nicorandil (MATSUI *et al.*, 2015) e nitroprussiato (LOPEZ-NEBLINA *et al.*, 1996). Esses mesmos doadores de NO também inibiram a produção de citocinas inflamatórias em um modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina (MATSUI *et al.*, 2015) e em pacientes sob reperfusão após cirurgia de revascularização do miocárdio (MASSOUDY *et al.*, 2000). A atividade da MPO também é reduzida em maior extensão pelos AINEs que são acoplados ao NO quando comparados aos seus percussores (KEEBLE & MOORE *et al.*, 2002).

Uma possível consequência da inibição do recrutamento de neutrófilos apresentada pelo RIY09 foi a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias avaliadas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e CXCL1) na pata sensibilizada com carragenina. Foi demonstrado que outros compostos que liberam NO diminuem a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e CXCL1 em modelo de edema de pata induzido por carragenina (GODIN *et al.*, 2014) e em modelo de inflamação articular induzida por injeção de mBSA (GODIN *et al.*, 2017). AINES (MINUZ *et al.*, 2001) e drogas antiinflamatórias esteroidais (PAUL-CLARK *et al.*, 2000) acopladas a NO mostram maior eficácia na redução de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , quando comparados com seus percussores. Deakin *et al.* (1995) demonstraram que a inibição da produção de NO está relacionada ao aumento da liberação de IL-6 em uma linha celular de macrófagos estimulada por LPS e IFN-gama. O NO participa da regulação de várias moléculas de sinalização intracelular incluindo a MAPK, JAK e NF-kB (KOBAYASHI, 2010). O NO pode inibir a ativação do NF-kB e também reduzir a expressão do gene da iNOS, ações que contribuiriam para a redução da

produção de citocinas pró-inflamatórias (KATSUYAMA *et al.*, 1998; MATTHEWS *et al.*, 1996; PENG *et al.*, 1995).

Paralelamente a redução de citocinas pró-inflamatórias, o composto RIY09 aumentou a concentração da citocina IL-10, uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel importante no controle das respostas imunes. A IL-10 pode atuar diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a resolução do processo inflamatório (SARAIVA & O'GARRA, 2010). Dessa forma, o aumento da concentração de IL-10 gerada pelo tratamento *i.p.* com o composto RIY09 contribui para sua atividade nos modelos de dor inflamatória e edema induzidos pela carragenina. O NO pode reagir com a guanilato ciclase solúvel produzindo maior produção de cGMP, aumentando a produção de IL-10, o que pode contribuir para o controle de processos inflamatórios (KOBAYASHI, 2010; BENBERNOU *et al.*, 1997).

Tendo em vista a baixa eficácia dos fármacos disponíveis para o manejo da DN e a dificuldade do manejo farmacoterápico dos pacientes que apresentam esta condição dolorosa durante o tratamento quimioterápico, avaliamos a resposta do composto RIY09 em modelo de DN induzida por paclitaxel. Para isso foram realizadas administrações repetidas de paclitaxel, de forma semelhante aos protocolos descritos pelo nosso grupo de pesquisa (BRAGA *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2018). Conforme estudos anteriores (BRAGA *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2018) padronizamos a avaliação dos efeitos pelo composto RIY09 no modelo de DN, bem como dos possíveis mecanismos de ação envolvidos, no sétimo dia após a primeira administração de paclitaxel, pois após esse período não ocorre uma grande variação da magnitude da alodínia mecânica até 14º dia de avaliação.

Como mencionado anteriormente, diversos estudos pré-clínicos exploraram o papel antinociceptivo do óxido nítrico em modelos de dor nociceptiva e inflamatória aguda, mas poucos avaliaram sua atividade em modelos de dor crônica como a DN induzida por paclitaxel. Todas as doses avaliadas do composto RIY09 apresentaram atividade antinociceptiva, sendo que a maior dose avaliada (150 mg/Kg) aumentou o limiar nociceptivo dos animais em todos os tempos avaliados. Além disso, também foi observado que a maior dose avaliada do composto apresentou atividade antinociceptiva

similar àquela da pregabalina, um anticonvulsivante empregado como primeira escolha para o tratamento de pacientes com DN.

Naik *et al.*, (2005) observaram que doadores de NO como nitroprussiato de sódio e S-nitroso-N-acetilpenicilamina potencializam a hiperalgesia e alodinia, apresentando um efeito pró-álgico em animais que apresentavam DN sensibilizados por CCI. Além disso, o grupo de pesquisa observou aumento nos níveis de nitrato e nitrito no nervo isquiático sugerindo uma regulação local do NO na manutenção da DN. Outros estudos também demonstraram que a nNOS participa do desenvolvimento da DN e sua inibição parece aumentar o limiar nociceptivo dos animais sensibilizados (LEE *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2015). Entretanto, nossos achados vão na contramão dessas informações, reforçando o papel dual do NO na nocicepção, por meio da sua atividade antinociceptiva em modelo de dor crônica como a DN induzida por paclitaxel. O efeito antinociceptivo do NO em modelo de DN induzida por paclitaxel também pode ocorrer após ativação da enzima nNOS no SNC, demonstrando a importância da atuação dessa enzima como potencial mecanismo analgésico (ZHANG *et al.*, 2019). Acredita-se que o NO concentra-se no corno dorsal da medula espinhal e exerce seu efeito antinociceptivo por meio da modulação da via descendente da dor por meio de interações com mecanismos noradrenérgicos e colinérgicos (MILLAN, 2002). A noradrenalina (NA) induz a ativação da NO sintase gerando liberação de NO no corno dorsal, sendo este o responsável por parte da ação antinociceptiva e pela própria liberação de NA e consequente desinibição da via descendente inibitória da dor (MILLAN, 2002).

Diversos são os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e na manutenção da DN causada por um agente quimioterápico (CAROZZI *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014). A sensibilização induzida pelo paclitaxel pode estar associada a uma variedade de alterações fisiológicas, como aumento de uma resposta inflamatória por meio da produção de mediadores inflamatórios e/ou por ativação de células gliais no corno dorsal da medula espinhal, uma anormalidade da transdução de estímulos decorrente de atividade alterada de canais iônicos (Nav, Kv e Ca²⁺), aumento da produção de ROS e uma inibição da via descendente da dor responsável pela modulação da ativação da via ascendente (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2015; SISIGNANO *et al.*, 2014; NICKEL *et al.*, 2012).

Assim, o presente estudo também investigou os possíveis mecanismos que poderiam contribuir para a atividade antinociceptiva do composto RIY09 no modelo de DN induzida pelo paclitaxel. A administração prévia de naltrexona atenuou parcialmente a atividade antialodínica do composto RIY09. Esse achado também é demonstrado por outro estudo, onde a administração prévia de naloxonazina, um antagonista dos receptores μ opioides, também reduziu a atividade antinociceptiva do NO produzido pela administração direta de L-arginina no córtex pré-frontal medial, em um modelo de DN induzida por lesão no nervo isquiático (RAISIAN *et al.*, 2022). A via opioidérgica também pode ser ativada pelo nicorandil, droga que aumenta a concentração de NO, justificando sua atividade antinociceptiva em modelos de dor inflamatória por carragenina, dor nociceptiva induzida por calor (DUTRA *et al.*, 2015) e modelo de DN induzida por paclitaxel (MORAIS *et al.*, 2018).

Quando liberados, os peptídeos opioides endógenos (β -endorfina, encefalinas e dinorfinas) interagem com receptores acoplados à proteína G transmembrana (receptores μ , delta e kappa). Após ativação do receptor opioide, ocorre inibição da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, redução da produção intracelular de adenosil monofosfato cíclico (AMPC), gerando fechamento dos canais para cálcio voltagem dependentes nas terminações pré-sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissores. A ativação de receptores opioides pós-sinápticos resulta na ativação de canais para K^+ , gerando efluxo desses íons e conseqüente hiperpolarização. Esses receptores também podem ser estimulados por opioides endógenos liberados por interneurônios locais no corno dorsal da medula espinhal, contribuindo para redução da transmissão nociceptiva. Dessa forma, a liberação de peptídeos opioides endógenos e, conseqüentemente, a estimulação dos receptores μ , inibe a transmissão sináptica na medula espinhal e tronco cerebral, o que contribui para menor acesso da informação nociceptiva ao tálamo e córtex cerebral e, conseqüentemente, menor experiência dolorosa (FORNASARI, 2017). O resultado do presente estudo indica que há uma contribuição da ativação desses mecanismos opioidérgicos para a atividade antinociceptiva do composto doador de NO RIY09. Não conseguimos afirmar se o composto RIY09 age diretamente em receptores opioides ou estimulam a liberação de peptídeos opioides endógenos, ações que poderiam contribuir para sua atividade antinociceptiva.

Evidências crescentes têm demonstrado a participação dos canais K_{ATP} no processamento nociceptivo (ZHU *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2014; ZOGA *et al.*, 2010; KAWANO *et al.*, 2009; SARANTOPOULOS *et al.*, 2003). Os canais K_{ATP} são formados pela combinação de duas proteínas: Kir6 e SUR (receptor de sulfonilureia). Esses canais são inibidos por altas concentrações de ATP, que interage com as subunidades Kir6, e são ativados quando a relação ADP/ATP aumenta, sendo que o ADP interage com as subunidades SUR (NICOHLS, 2006). Os canais K_{ATP} são expressos em neurônios sensoriais e têm papel importante no processamento nociceptivo. Em modelos de DN induzida por CCI, ocorre uma redução da expressão de canais K_{ATP} , o que pode contribuir para a sensibilização a estímulos nocivos (SARANTOPOULOS *et al.*, 2003). Zoga *et al.* (2010) também demonstraram que esses canais são regulados negativamente nos DRG e em células de Schwann após ligadura de nervos espinhais, contribuindo, dessa forma, para a sensibilização que ocorre em modelos de DN. A inibição dos canais K_{ATP} nos DRG leva à despolarização e, conseqüentemente, facilitação da neurotransmissão na via nociceptiva (KAWANO *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstraram o papel da ativação de canais K_{ATP} na atividade antinociceptiva de diversos fármacos analgésicos como morfina (RODRIGUES & DUARTE; 2000), Dipirona (ALVES & DUARTE, 2002), diclofenaco (ALVES *et al.*, 2004) e fentanil (RODRIGUES *et al.*, 2005). O NO também é capaz de ativar vários canais de K^+ , como K_{ATP} em diversos tecidos por meio da sinalização GMPC. A atividade antinociceptiva exercida por doador de NO foi reduzida pela administração de glibenclamida um bloqueador de canais K_{ATP} . (GOMES *et al.*, 2020; SACHS *et al.*, 2004). Estudos também mostram que os efeitos analgésicos da morfina e dipirona podem depender da regulação positiva de K_{ATP} por meio da estimulação da proteína quinase G (PKG), por ativação da via de sinalização arginina/NO/GMPC (SACHS *et al.*, 2004). Entretanto, os resultados do presente estudo indicam que a atividade antinociceptiva do composto RIY09 no modelo de DN induzida pelo paclitaxel parece não estar relacionada com a ativação de K_{ATP} , pois a administração prévia de glibenclamida, não atenuou a atividade desse doador de NO.

Por outro lado, o efeito antinociceptivo induzido pelo composto RIY09 no modelo de DN induzida pelo paclitaxel foi atenuado pela administração prévia de AM251, um antagonista de CB1. Já é bem elucidado a contribuição do sistema endocanabinoide no

processamento nociceptivo como em condições crônicas como a dor neuropática. Esse sistema em síntese é composto por receptores canabinoides acoplados à proteína G, CB1 e CB2, os endocanabinoides como por exemplo, anandamida e 2-araquidonoilglicerol, e as enzimas envolvidos em seu metabolismo, como ácido graxo amino hidrolase (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL). O sistema endocanabinoide pode atuar na modulação nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal regulando a transmissão nociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2021). Os receptores CB1 são amplamente expressos em neurônios do sistema nervoso central e periférico, sendo presentes em estruturas como fibras sensoriais pré-sinápticas e DRGs, possuindo uma grande contribuição na atividade antinociceptiva de drogas agonistas, em diversos modelos experimentais de dor (CAMPOS *et al.*, 2021; PERTWEE, 2001). Além disso, é descrito que a ativação do receptor CB1 desempenha um papel importante na atividade antinociceptiva de ligantes canabinóides em modelo experimental de dor neuropática (MEDEIROS *et al.*, 2020). Já receptores CB2 podem ser expressos em células como gliais (microglia e astrócitos) e células do sistema imune e sua ativação contribui para a ação antinociceptiva de agonistas por redução da hipersensibilidade inflamatória (CLAYTON *et al.*, 2022; CAMPOS *et al.*, 2021; HOSSAIN *et al.*, 2020). A ativação de receptores CB1 gera a inibição da adenilato ciclase e conseqüentemente redução de AMPc e bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes pré-sinápticos além de ativação de canais de K^+ gerando uma modulação da transmissão nociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2021; HOSSAIN *et al.*, 2020). Já a ativação de receptores CB2 inibe a adenilil ciclase, mas não bloqueia canais de Ca^{2+} ou ativa os canais de K^+ , desempenhando um papel importante na modulação imune (CRISTINO *et al.*, 2020; HOSSAIN *et al.*, 2020).

Há uma interação entre os receptores canabinoides precisamente CB1 e a NO sintase. A ativação de CB1 por agonistas canabinoides estimula a produção de NO, levando a ativação da proteína G_i , aumentando a atividade da nNOS e conseqüentemente diminuindo a ativação neuronal (CARNEY *et al.*, 2009). Além disso a ativação de CB1 por endocanabinoides como anantamida estimula a atividade e a expressão de NOS (MACCARRONE *et al.*, 2000). Receptores CB2 quando estimulados também podem ativar a via de sinalização periférica da NO/GMPc/PKG/ K_{ATP} , desencadeada por aumento da expressão NOS em DRGs, sendo esse o mecanismo responsável pela redução da alodinia mecânica em modelo de dor inflamatória crônica (NEGRETE *et al.*, 2011). Assim, demonstramos em nossos resultados que parte da atividade antinociceptiva do

composto RIY09 ocorre pelo seu envolvimento na via endocanabinoide, mas não sabemos se sua atuação ocorre diretamente em receptores CB1 ou indiretamente por meio da estimulação de liberação e/ou produção de endocanabinoides.

Em nosso estudo, também observamos que a administração de paclitaxel aumentou as concentrações dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL1- β e CXCL1 nos DRG e tálamo. Por outro lado, o tratamento com o composto RIY09 reduziu a concentração desses mediadores. Outros estudos demonstraram que o paclitaxel induz aumento das concentrações plasmáticas de diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias, bem como o aumento da sua expressão nos DRG, o que contribui para o desenvolvimento e a manutenção da DN induzida por esse agente quimioterápico (AL-MAZIDI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2012). A produção aumentada desses mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , provavelmente, está associada à infiltração de macrófagos nos DRG's (ZHANG *et al.* 2016; SCHOLZ & WOOLF, 2007). O tálamo é o principal local de projeção da via espinotalâmica e está envolvido no processamento da informação nociceptiva antes da transmissão para o córtex cerebral (AB AZIZ & AHMAD, 2006). O aumento das concentrações de citocinas, como TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β , no tálamo também parece estar envolvido no desenvolvimento de diferentes condições dolorosas, incluindo DN (BRAGA *et al.*, 2020; DEL-REY *et al.*, 2012; HESS *et al.*, 2011; APKARIAN *et al.*, 2006). Esse aumento pode estar relacionado com maior ativação de células microgliais no tálamo, o que contribui para hiperexcitabilidade neuronal (ZHAO *et al.*, 2007; BANATI *et al.*, 2001).

Partindo-se da observação que paclitaxel acumula-se principalmente nos DRGs (CAVALETTI *et al.*, 2000), induzindo um aumento da expressão e da concentração de citocinas inflamatórias (BRAGA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2012) nessas estruturas, os nossos resultados sugerem que os DRGs são importantes locais de atuação do composto RIY09, principalmente na redução de mediadores inflamatórios. Além disso demonstramos que há aumento de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e CXCL-1) em estruturas de processamento nociceptivo como o tálamo em modelo de DN induzida por paclitaxel. Esse achado já foi observado pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (BRAGA *et al.*, 2020) e em modelos de DN induzida por lesões de nervos (DEL-REY *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2007; APKARIAN *et al.*, 2006). No presente estudo, o tratamento com o composto RIY09 reduz a concentração de IL-1 β , TNF- α e

CXCL-1 no tálamo. Assim, a inibição da produção de citocinas inflamatórias no tálamo pode também representar um mecanismo importante que medeia a atividade antinociceptiva de doadores de NO como o composto RIY09. WU *et al.*, (2004) demonstraram que um derivado de gabapentina liberador de NO é capaz de inibir o TNF- α em um modelo de DN induzida por lesão. Nossos resultados, assim como os de WU *et al.*, (2004) reforçam o papel antinociceptivo e anti-inflamatório do NO na DN.

Os resultados do presente estudo indicam uma boa perspectiva da investigação do composto RIY09 como um candidato à fármaco para a farmacoterapia de quadros dolorosos e inflamatórios. Porém, a translação desses resultados pré-clínicos para ensaios clínicos é uma grande limitação, tendo em vista a diferença entre o elevado número de substâncias que são desenhadas e sintetizadas que apresentam atividade em modelos de dor e inflamação durante estudo pré-clínico e o número real de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios que são aprovados por órgãos reguladores. Em nosso estudo pretendemos expandir nossa investigação avaliando a atividade do composto RIY09 em outros modelos de inflamação crônica para uma melhor caracterização da sua atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, bem como aprofundar nos mecanismos envolvidos em sua atividade.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos que RIY09, um composto liberador de NO, apresenta atividades antinociceptiva e anti-inflamatória nos modelos experimentais avaliados. Essas atividades podem ser decorrentes da redução do recrutamento de neutrófilos e consequentemente da redução da produção de citocinas inflamatórias e/ou ao aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10. Além disso, parte da atividade antinociceptiva do composto RIY09 pode ocorrer por sua atuação em vias opioidérgicas e/ou endocanabinoidérgicas, mas não por ativação de canais K^+ _{ATP} sensíveis. Esses resultados reforçam o interesse na investigação de compostos doadores de NO como candidatos a fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, principalmente em condições dolorosas de difícil manejo clínico como a DN.

8. PERSPECTIVAS

Nossos resultados são importantes considerando a perspectiva do desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que os principais mecanismos envolvidos na ação de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios conhecidos incluem inibição da produção, liberação ou ação de mediadores inflamatórios. Estudos adicionais devem ser conduzidos para explorar o perfil de segurança e a atividade do RIY09 em outros modelos experimentais crônicos, assim como, elucidar melhor os mecanismos de ação envolvidos nas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Estudos que avaliem o perfil farmacocinético do composto RIY09 quando administrado por via *p.o.*, bem como, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto administrado por essa via também serão investigados.

9. MANUSCRITO PUBLICADO

Biomedicine & Pharmacotherapy 133 (2021) 110913



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopha

Original article

Electrochemical evidence of nitrate release from the nitrooxy compound 4-((nitrooxy) methyl)-3-nitrobenzoic acid and its antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice

Alysson Vinícius Braga^a, Roger Ryuler Lisboa da Silva^a, Ianny Bandeira Rodrigues^a, Gabriel Vitor de Lima Marques^a, Andre Felipe de Almeida Xavier^b, Anastacio Boane^b, Mayara Rodrigues Brandão de Paiva^a, Pedro Henrique Cavalcanti Franco^a, Felipe Fernandes Rodrigues^a, Ivo Souza Ferraz Melo^a, Armando da Silva Cunha Júnior^a, Isabela da Costa César^a, Marília Oliveira Fonseca Goulart^b, Renata Barbosa de Oliveira^a, Márcio de Matos Coelho^a, Renes Resende Machado^{a,*}

^a Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

4-((Nitrooxy) methyl)-3-nitrobenzoic acid
Nitric oxide
Nitrate
Pain
Inflammation
Cytokines

ABSTRACT

Considering the many biological activities of nitric oxide (NO), some lines of research focused on the modulation of these activities through the provision of this mediator by designing and synthesizing compounds coupled with an NO donor group. Thus, the objectives of the present study were to carry out an electrochemical investigation of the nitrooxy compound 4-((nitrooxy) methyl)-3-nitrobenzoic acid (**1**) and evaluate its activities and putative mechanisms in experimental models of pain and inflammation. Voltammetric studies performed in aprotic medium (mimetic of membranes) showed important electrochemical reduction mechanisms: nitroaromatic reduction, self-protonation, and finally reductive elimination, which leads to nitrate release. Systemic administration of the nitrooxy compound (**1**) inhibited the nociceptive response induced by heat and the tactile hypersensitivity and paw edema induced by carrageenan in mice. The activities in the models of inflammatory pain and edema were associated with reduced neutrophil recruitment and production of inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α and CXCL-1, and increased production of IL-10. Concluding, electrochemical analysis revealed unequivocally that electron transfer at the nitro group of the nitrooxy compound (**1**) results in the cleavage of the organic nitrate, potentially resulting in the generation of NO. This electrochemical mechanism may be compared to a biochemical electron-transfer mediated nitrate release that, by appropriate *in vivo* bioreduction (enzymatic or not) would lead to NO production. Compound (**1**) exhibits activities in models of inflammatory pain and edema that may be due to reduced recruitment of neutrophils and production of inflammatory cytokines and increased production of IL-10. These results reinforce the interest in the investigation of NO donor compounds as candidates for analgesic and anti-inflammatory drugs.

Acesso ao manuscrito completo: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110913>

10. REFERÊNCIAS

- AB AZIZ, C.B. & AHMAD, A.H. The role of the thalamus in modulating pain. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 13, p. 11-18, 2006.
- ABACIOĞLU, N.; TUNÇTAN, B.; ÇAKICI, I.; AKBULUT, E.; ULUDAĞ, O.; KANZIK, I. The role of L-arginine/nitric oxide pathway in the antinociceptive activity of pyridoxine in mouse. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 10, p. 832-838, 2001.
- ABRAMSON, S. B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis Research Therapy**, v. 10, p. 1-7, 2008.
- ALESSANDRI-HABER, N.; DINA, O.A.; YEH, J.J.; PARADA, C.A.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 4444–4452, 2004.
- AL-MAZIDI, S.; ALOTAIBI, M.; NEDJADI, T.; CHAUDHARY, A.; ALZOGHAIBI, M.; DJOUHRI, L. Blocking of cytokines signalling attenuates evoked and spontaneous neuropathic pain behaviours in the paclitaxel rat model of chemotherapy-induced neuropathy. **European Journal of Pain**, v. 22, p. 810-821, 2018.
- AL-SWAYEH, O.A.; CLIFFORD, R.H.; DEL SOLDATO, P.; MOORE, P.K. A comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. **British Journal of Pharmacology**, v.129, p.343–350, 2000a.
- AL-SWAYEH, O.A.; FUTTER, L.E.; CLIFFORD, R.H.; MOORE, P.K. Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p.1453–1456, 2000b.
- ALVES, A.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. **European Journal of Pharmacology**, v. 444, p. 47-52, 2002.
- ALVES, D.P.; TATSUO, M.A.F.; LEITE, R., DUARTE, I.D. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K + channels activation. **Life Sciences**, v. 74, p. 2577-2591, 2004.
- AMI, N.; OKAMOTO, K.; OSHIMA, H. Analgesic effect of magnetic stimulation on paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in mice. **Brain Research**, v. 1461 p. 24-29, 2012.
- APKARIAN, A.V.; LAVARELLO, S.; RANDOLF, A.; BERRA, H.H.; CHIALVO, D.R.; BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. Expression of IL- beta in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 407, p. 176—181, 2006.
- BALLY, M.; DENDUKURI, N.; RICH, B.; NADEAU, L.; HELIN-SALMIVAARA, A.; GARBE, E.; BROPHY, J.M. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real

world use: bayesian meta-analysis of individual patient data. **The BMJ**, v. 357, p. 1-12, 2017.

BANATI, R.B.; CAGININ, A.; BROOKS, D.J.; GUNN, R.N.; MYERS, R.; JONES, T.; BIRCH, R.; ANAND, P. Long-term trans-synaptic glial responses in the human thalamus after peripheral nerve injury. **NeuroReport**, v. 12, p. 3439–3442, 2001.

BANICK, P.D.; CHEN, Q.P.; XU, Y.A.; THOM, S.R. Nitric oxide inhibits neutrophil b2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. **Journal Cell Physiology**, v. 172, p. 12-24, 1997.

BARSANTE, M.M.; ROFFÊ, E.; YOKORO, C.M.; TAFURI, W.L.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; CASTRO, M.S.; TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **European Journal Pharmacology**, v.516, p. 282-289, 2005.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n.2, p. 267-284, 2009.

BASTOS, L.F.S.; COELHO, M.M. Drug repositioning: Playing dirty to kill pain. **CNS Drugs**, v. 28, p. 46-61, 2013.

BENBERNOU, N.; ESNAULT, S.; SHIN, H.C.K.; FEKKAR, H.; GUENOUNOU, G. Differential regulation of IFN- γ , IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. **Immunology**, v. 91, p. 361-368, 1997.

BOYETTE-DAVIS, J.A.; WALTERS, E.T.; DOUGHERTY, P.M. Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. **Pain Management**, v. 5, p. 285-296, 2015.

BRACK, A.; RITTNER, H.L.; MACHELSKA, H.; LEDER, K.; MOUSA, S.A.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, v. 112, p. 229-238, 2004.

BRAGA, A.V.; COSTA, S. O.A.M.; RODRIGUES, F.F. Thiamine, riboflavin, and nicotinamide inhibit paclitaxel-induced allodynia by reducing TNF- α and CXCL-1 in dorsal root ganglia and thalamus and activating ATP-sensitive potassium channels. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 201-2013, 2020.

BRAGA, A.V.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, I.; MARQUES, G.L.; XAVIER, A.F.; BOANE, A.; DE PAIVA, M. B.; FRANCO, P.H.; RODRIGUES, F.F.; MELO, I.F.; JÚNIOR, A.F.; CÉSAR, I.S.; GOULART, M. O.; OLIVEIRA, R. B. COELHO, M.M.; MACHADO, R.R. Electrochemical evidence of nitrate release from the nitrooxy

compound 4-((nitrooxy) methyl)-3-nitrobenzoic acid and its antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.133, p.1-11, 2021.

CAMPOS, R.M.P.; AGUIAR, A.F.L.; PAES-COLLI, Y.; TRINDADE, P.M.P.; FERREIRA, B.K.; DE MELO REIS, R.A.; SAMPAIO, L.S. Cannabinoid Therapeutics in Chronic Neuropathic Pain: From Animal Research to Human Treatment. **Frontiers Physiology**, v.12, 2021.

CARNEY, S.T.; LLOYD, M.L.; MACKINNON, S.E., NEWTON, D.C.; JONES, J.D.; HOWLETT, A.C.; NORFORD, D.C. Cannabinoid regulation of nitric oxide synthase I (nNOS) in neuronal cells. **Journay Neuroimmune Pharmacology**, v.4 ,n.3, p. 338-349, 2009.

CAROZZI, V.A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, v. 596, p. 90-107, 2015.

CASTELLI, M.S.; MCGONIGLE P.; HORNBY, P.J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Pharmacology Research & Perspectives**, v.7, n. 6, p. 1-11, 2019.

CATA, J.P.; WENG, H.R.; CHEN, J.H.; DOUGHERTY, P.M. Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. **Neuroscience**, v. 138, p.329-338, 2006.

CAVALETTI, G.; CAVALLETTI, E.; OGGIONI, N.; SOTTANI, C.; MINOIA, C.; D'INCALCI, M.; ZUCCHETTI M.; MARMIROLI, P.; TREDICI, G. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. **Neurotoxicology**, v. 21, p. 389-93, 2000.

CHAHINE, M. & O'LEARY, M.E. Regulation/modulation of sensory neuron sodium channels. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 221, p. 111-135, 2014.

CHEN, Y.; CHEN, L.; YEH, Y. WU, P.; CHEN, Y.; CHANG, L.; CHANG, J.; SHEN, M. Minoxidil is a potential neuroprotective drug for paclitaxel induced peripheral neuropathy. **Scientific Reports**, v.7, p.1-13, 2017.

CLANCY, R.M.; AMIN, A.R.; ABRAMSON, S.B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 41, n. 7, p.1141-1151, 1998.

CLAYTON, N.; MARSHALL, F.H.; BOUNTRA, C. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. **Pain**, v. 96, n. 3, p. 253-260, 2002.

COBOS, E.J.; GHASEMLOU, N.; ARALDI, D.; SEGAL, D.; DUONG, K.; WOOLF, C.J. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. **Pain**, v. 153, p. 876-884, 2012.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A.H.; YARNITSKY, D.; FREEMAN, R. TRUINI, A.; ATTAL, N.; FINNERUP, N. B.; ECCLESTON, C.; KALSO, E.; BENNETT, D.L.; DWORKIN, R.H.; RAJA, S.N. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, p.1-19, 2017.

COLUZZI, F.; TAYLOR, R.; PERGOLIZZI, J.V.; MATTIA, C.; RAFFA, F.B. Good clinical practice guide for opioids in pain management: the three Ts --- titration (trial), tweaking (tailoring), transition (tapering). **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 66, n.3, p.310-317, 2016.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 32, p. 1-32, 2009. CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Review Neurology**, v.16, p.9-29, 2020.

CUNHA, T.M.; CAMPOS, D. R.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W.A.; QUINTINO, M.F.; DIASA, M.; SCHIVOA, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALLA, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO/K_{ATP} signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, n. 2, p. 4442-4447, 2010.

CURY, Y., PICOLO, G., GUTIERREZ, V. P., FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, p.243–254, 2011.

DAL PIZZOLI, T.S.; FONTANELLA, A.T.; FERREIRA, M.B.; BERTOLDI, A.D.; BORGES, A.R.; MENGUE, S.S. Analgesic use among the Brazilian population: Results from the National Survey on Access, Use and Promotion of Rational Use of Medicines (PNAUM). **Plos one**, v. 14, n. 3, p.1-25, 2019.

DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 153-164, 2003.

DAVIES, N.M.; RØSETH, A.G.; APPLEYARD, C.B.; MCKNIGHT, W.; DEL SOLDATO, P.; CALIGNANO, A.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.11, p. 69–79, 1997.

DEAKIN, A.M.; PAYNE, A.N.; WHITTLE, B.J.; MONCADA, S. The modulation of IL-6 and TNF-alpha release by nitric oxide following stimulation of J774 cells with LPS and IFN-gamma. **Cytokine**, v.7, p. 408-416, 1995.

DEL-REY, A.; APKARIAN, A.V.; MARTINA, M.; BESEDOVSKY, H.O. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 β . **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1262, p. 101-107, 2012.

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**, v. 109, p. 132-142, 2004.

DUARTE, I.D.; FERREIRA, S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 221, n. 1, p. 171-174, 1992.

DUARTE, I.D.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway, **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 289– 293, 1990.

DUARTE, I.D.; SANTOS, R.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 217, n. 3, p. 225-7, 1992.

DURAND SOMMER, C. Serotonin in pain and pain control. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 21, p. 457-471, 2010.

DUTRA, M. M. G. B., GODIN, A. M., CÉSAR, I. C., NASCIMENTO Jr., E. B., MENEZES, R. R., FERREIRA, W., SOARES, D. G., SENIUK, J. G. T., ARAÚJO, D. P., BASTOS, L. F. S., PIANETTI, G. A., DE FÁTIMA, A., MACHADO, R. R., COELHO, M. M. Activity of nicorandil, a nicotinamide derivative with a nitrate group, in the experimental model of pain induced by formaldehyde in mice. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 106, p. 85-90, 2013.

DUTRA, M.M.G.B.; JÚNIOR, E.B.N.; GODIN, A.M.; BRITO, A.M.S.; MELO, I.S.F.; AUGUSTO, P.S.A.; RODRIGUES, F.F.; ARAÚJO, D.P.; FÁTIMA, A.; COELHO,

M.M.; MACHADO, R.R. Opioid pathways activation mediates the activity of nicorandil in experimental models of nociceptive and inflammatory pain. *European Journal of Pharmacology*, v. 768, p. 160 - 164, 2015.

FARDET, L.; FLAHAULT, A.; KETTANEH, A.; TIEV, K.P.; GÉNEREAU, T.; TOLÉ; DANO, C.; LEBBÉ, C.; CABANE, J. Corticosteroid-induced clinical adverse events: frequency, risk factors and patient's opinion. *British Journal of Dermatology*, v. 157, p. 142-148, 2007.

FEEHAN, K. T.; GILROY, D. W. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Molecular Medicine*, v. 25, n. 3, p.198-214, 2019.

FERNANDES, D.; SILVA-SANTOS, J.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels *Inflammation Research*, v. 51, n.8, p. 377-384, 2002.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *European Journal of Pharmacology*, v.201, p.121-122, 1991.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B.B.; FACCIOLI, L. H. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *European Journal of Pharmacology*, v.217, p.207-209, 1992.

FIORUCCI, S.; SANTUCCI, L.; CIRINO, G.; MENCARELLI, A.; FAMILIARI, L.; SOLDATO, P.D.; MORELLI, A. IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: new insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Journal Immunology*, v.165, p. 5245-5254, 2000.

FOKUNANG, C.N.; FOKUNANG, E.T.; FREDERICK, K.; NGAMENI, B.; NGADJUI, B. Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) in resource limited countries. *MOJ Toxicology*, v. 4, n. 1, p.5–13, 2018.

FORNASARI, D. Pharmacotherapy for neuropathic pain: A review. *Pain Therapy*, v.6, p.25-33, 2017.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 15, p. 551-567, 2016.

GARCIA-LARREA, L. The pathophysiology of neuropathic pain: Critical review of models and mechanisms. *Pain*, v. 43, p. 453-475, 2014.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, p. 532-545, 2015.

GODIN, A.M.; ARAÚJO, D.P.; CÉSAR, I.C.; MENEZES, R.R.; BRITO, A.M.; MELO, I.S.; COURA, G.M.; BASTOS, L.F.; ALMEIDA, M.O.; BYRRO, R.M.; MATSUI, T.C.; BATISTA, C.R.; PIANETTI, G.A.; DE FÁTIMA, Â.; MACHADO, R.R.; COELHO, M.M. Activities of 2-phthalimidethyl nitrate and 2-phthalimidethanol in the models of nociceptive response and edema induced by formaldehyde in mice and preliminary investigation of the underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 756, p. 59–66, 2015.

GODIN, A.M.; ARAÚJO, D.P.; MENEZES, R.R.; BRITO, A.M.; MELO, I.S.; COURA, G.M.; SOARES, D.G.; BASTOS, L.F.; AMARAL, F.A.; RIBEIRO, L.S.; BOFF, D.; SANTOS, J.R.; SANTOS, D.A.; TEIXEIRA, M.M.; DE FÁTIMA, Â.; MACHADO, R.R.; COELHO, M.M. Activities of 2-phthalimidethanol and 2-phthalimidethyl nitrate, phthalimide analogs devoid of the glutarimide moiety, in experimental models of inflammatory pain and edema. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 122, p. 291–298, 2014.

GODIN, A.M.; ARAÚJO, D.P.; MENEZES, R.R.; BRITO, A.M.; MELO, I.S.; COURA, G.M.E.; BASTOS, L.F.S.; AMARAL, F.A.; TEIXEIRA, M.M.; DE FÁTIMA, Â.; COELHO, M.M.; MACHADO, R.R. 2-Phthalimidethanol and 2-phthalimidethyl nitrate inhibit mechanical allodynia, neutrophil recruitment and cytokine and chemokine production in a murine model of articular inflammation. **Pharmacology Reports**, v.69, p.691-695, 2017.

GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, v. 16, p. 1248-1257, 2010.

GOMES F.I.F.; CUNHA F.Q.; CUNHA, T.M. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. **Biochemical Pharmacology**, v. 176, p.1-11, 2020.

GORABI, A.M.; KIAIE, N.; HAJIGHASEMI, S.; BANACH, M.; PENSON, P.E.; JAMIALAHMADI, T.; SAHEBKA, A. Statin-Induced Nitric Oxide Signaling: Mechanisms and Therapeutic Implications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, 2019.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behaviour**, v. 47, p. 963-991, 1990.

GROSSER, T.; RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Trends Pharmacology Sciences**, v.38, n.8, p.733-748, 2017.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HAMMACK, J. E.; MICHALACK, J.C.; LOPRINZI C.L.; SLOAN J.A.; NOVOTNY P.J.; SOORI, G.S.; TIRONA, M.T.; ROWLAND, K.M.; STELLA, P.J.; JOHNSON, J.A. Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cisplatin-induced peripheral neuropathy. **Pain**, v. 98, p. 195-203, 2002.

HANCOCK, C. M.; RIEGGER-KRUGH, C. Modulation of pain in osteoarthritis: the role of nitric oxide. *Clinical Journal of Pain*, v. 24, n. 4, p. 353-65, 2008.

HANSEL, T.T.; KROPSHOFER, H.; SINGER, K.; MITCHELL, J.A.; GEORGE, A.J.T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature Reviews**, v.9, p. 325–338, 2010.

HARA, T.; CHIBA, T.; ABE, K.; MAKABE, A.; IKENO, S.; KAWAKAMI, K.; UTSUNOMIVA, I.; HAMA, T.; TAQUCHI, K. Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. **Pain**, v. 154, p. 882-889, 2013.

HARDY, R. S.; RAZA, S.; COOPER, M. S. Therapeutic glucocorticoids: mechanisms of actions in rheumatic diseases. **Nature Reviews**, v. 16, p. 133-144, 2020.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. **Journal Pharmacology Pharmaceutical Sciences**, v.16, n.5, p.821-847, 2013.

HAWKEY, C.J.; JONES, J.I.; ATHERTON, C.; SKELLY, M.M.; BEBB, J.R., JONZON, B.; KARLSSON, P.; BJARNASON, I.T. Gastrointestinal safety of AZD3582, a cyclooxygenase inhibiting nitric oxide donator: proof of concept study in humans. **Gut**, v. 52, n.1, p.1537-1542, 2003.

HEDENMALM, K.; SPIGSET, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole). **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n4, 265-274, 2002.

HEHN, C.A.; BARON, R.; WOOLF, C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, v. 73, p. 638-652, 2012.

HERSHMAN, D. L. , LACCHETTI, C.; DWORKIN, R.H.; LAVOIE, E.M.; BLEEKER, J.; CAVALETTI, G.; CHAUHAN, C.; GAVIN, P.; LAVINO, A.; LUSTBERG, M.B.; PAICE, J.; SCHNEIDER, B.; SMITH, M.L.; SMITH, T.; TERSTRIEP, S.; WAGNER-JOHNSTON, N.; BAK, K.; LOPRINZI, C.L. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 1941-1967, 2014.

HERVERA, A.; LEÁNEZ, S.; NEGRETE, R.; POL, O. The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**, v. 380, p. 345-352, 2009.

HESS, A.; AXMANN, R.; RECH, J.; FINZEL, S.; HEINDL, C.; KREITZ, S.; SERGEEVA, M.; SAAKE, M.; GARCIA, M.; KOLLIAS, G.; STRAUB, R.H.; SPORNS, O.; DOERFLER, A. BRUNE, K.; SCHETT, G. Blockade of TNF α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 108, p. 3731-3736, 2011.

HOSSAIN,M.Z.; ANDO, H.; UNNO, S.; KITAGAWA, J. Targeting Peripherally Restricted Cannabinoid Receptor 1, Cannabinoid Receptor 2, and Endocannabinoid-Degrading Enzymes for the Treatment of Neuropathic Pain Including Neuropathic Orofacial Pain International of Journal Molecular Science, v. 21, 2020.

JACKSON, T.; THOMAS, S.; STABILE, V.; HAN, X.; SHOTWELL, M.; MCQUEEN, K. Prevalence of chronic pain in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 385, 2015.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 355-384, 2013.

KANAZAWA, T.; ENDO, T.; ARIMA, N.; IBARAKI, H.; TAKASHIMA, Y.; SETA, Y. Systemic delivery of small interfering RNA targeting nuclear factor κ B in mice with collagen-induced arthritis using arginine-histidine-cysteine based oligopeptidemodified polymer nanomicelles. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, p. 315-323, 2016.

KANY, S.; VOLLRATH, J.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-31, 2019.

KAUTIO, A. L.; HAANPÄÄ, M.; LEMINEN, A.; KALSO, E.; KAUTIAINEN, H.; SAARTO, T. Amitriptyline in the prevention of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. **Anticancer Research**, v. 29, p. 2601-2606, 2009.

KATSUYAMA, K.; SHICHIRI, M.; MARUMO, F.; HIRATA, Y. NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF- κ B activation by interfering with phosphorylation and degradation of I κ B- α . **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.18, p. 1796- 1802, 1998.

KARLSSON, J.; PIVODIC, A.; AGUIRRE, D.; SCHNITZER, T.J. Efficacy, safety, and tolerability of the cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donator naproxen in treating osteoarthritis of the hip or knee. **The Journal of Rheumatology**, v. 36, n.6, 2009.

KAWANO, T.; ZOGA, V.; KIMURA, M.; LIANG, M.; WU, H.; GEMES, G.; MCCALLUM, J.B.; KWOK, W.; HOGAN, Q.H.; SARANTOPOULOS, C.D. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons : action by direct S-nitrosylation. **Molecular pain**, v. 20, p.1–20, 2009 1–20.

KEEBLE, K.J.; MOORE, P.K. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 295–310, 2002.

KLINKE, A.; NUSSBAUM, C.; KUBALA, L.; FRIEDRICHS, K.; RUDOLPH, T.K.; RUDOLPH, V.; PAUST, H.J.; SCHRÖDER, C.; BENTEN, D.; LAU, D.; SZOCS, K.; FURTMÜLLER, P.G.; HEERINGA, P.; SYDOW, K.; DUCHSTEIN, H.J.; EHMKE, H.; SCHUMACHER, U.; MEINERTZ, T.; SPERANDIO, M.; BALDUS, S. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood**, v.117, p. 1350-1358, 2011.

KO, M.; HU, M.; HSIEH, Y.; LAN, C.; TSENG, T. Peptidergic intraepidermal nerve fibers in the skin contribute to the neuropathic pain in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Neuropeptides**, v. 48, p. 109-117, 2014.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal Leukocyte Biology**, v. 88, p.1157-1162, 2010.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation and disease susceptibility. **Cell**. v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015.

LEBARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2000.

LEE, W.H.; CAREY, L.M.; LI, L.L.; XU, Z., COURTNEY, M.J.; HOHMANN, A. ZLc002, a putative small-molecule inhibitor of nNOS interaction with NOS1AP, suppresses inflammatory nociception and chemotherapy-induced neuropathic pain and synergizes with paclitaxel to reduce tumor cell viability. **Molecular Pain**, v. 14, 2018.

LEE, W.H.; XU, Z.; Ashpole, N.; Hudmon N.; Kulkarni, p.; Ganesh A.; Hohmann, A. Small molecule inhibitors of PSD95-nNOS protein–protein interactions as novel analgesics. **Neuropharmacology**, v.97, p. 464-475, 2015.

LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease, **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 12, p. 140-146, 2007.

LIU, D.; AHMET, A.; WARD, L.; KRISHNAMOORTHY, P.; MANDELCORN, E. D.; LEIGH, R.; BROWN, J.P.; COHEN, A.; KIM, H. A practical guide to the monitoring

and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 9, n. 30, p. 1-25, 2013.

LOESER, J.D. & MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.
LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO-PEREYRA, L.H.; MIRMIRAN, R.; PAEZ-ROLLYS, A.J. Time dependence of Na-nitroprusside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney. **Transplantation**, v. 61, n. 2, p.179-183, 1996.

LU, T.; KATANO, D.; UTA, H.; FURUE, S. I. Rapid S -nitrosylation of actin by NO-generating donors and in inflammatory pain model mice. **Molecular pain**, v. 7, p. 1–13, 2011.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.7, p. 156-167, 2008.

LUTZ, M. Metamizole (Dipyrone) and the Liver: A Review of the Literature. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, n. 11, p.1433-1442, 2019.

MACCARRONE, M.; BARI, M.; LORENZON, T.; BISOGNO, T.; MARZO, V.; FINAZZI-AGRO, A. Anandamide Uptake by Human Endothelial Cells and Its Regulation by Nitric Oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.18, p. 13484–13492, 2000.

MARUPUDI, N.I.; HAN, J.E.; LI, K.W.; RENARD, V.M.; TYLER, B.M.; BREM, H. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, p. 609-621, 2007.

MATSUI, T. C.; COURA, G. M.; MELO, I. S.; BATISTA, C. R.; AUGUSTO, P. S.; GODIN, A. M.; ARAÚJO, D. P.; CÉSAR, I. C.; RIBEIRO, L. S.; SOUZA, D. G.; KLEIN, A.; DE FÁTIMA, A.; MACHADO, R. R.; COELHO, M. M. Nicorandil inhibits neutrophil recruitment in carrageenan-induced experimental pleurisy in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 769, p. 306-312, 2015.

MATERAZZI, S.; FUSI, C.; BENEMEI, S.; PEDRETTI, P.; PATAACCHINI, R.; NILIUS, B.; PRENEN J.; CREMINON, C.; GEPPETTI, P.; NASSINI, R. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **European Journal of Physiology**, v. 463, p. 561-569, 2012.

MATTHEWS, J. R.; BOTTING, C.H.; PANICO, M.; MORRIS, H.R.; HAY, R.T. inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. **Nucleic Acids** , v. 24, n. 12, p. 2236-42, 1996.

MASSOUDY, P.; ZAHLER, S.; FREYHOLDT, T.; HENZE, R.; BARANKAY, A.; BECKER, B.F.; BRAUN, S.L.; MEISNER, H. Sodium nitroprusside in patients with compromised left ventricular function undergoing coronary bypass: reduction of cardiac proinflammatory substances. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 119, p. 566-574, 2000.

MAY, G.R.; CROOK, P.; MOORE, P.K.; PAGE, C.P. The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. **British Journal of Pharmacology**, v. 102, p. 759-763, 1991.

MCCARBERG, B.; D'ARCY, Y.; PARSONS, B.; SADOSKY, A.; THORPE, A. Neuropathic pain: a narrative review of etiology, assessment, diagnosis, and treatment for primary care providers. **Current Medical Research Opinion**, v. 33, p. 1361-1369, 2017.

MEACHAM, K.; SHEPHERD, A.; MOHAPATRA, D.P.; HAROUTOUNIAN, S. Neuropathic pain: central vs. peripheral mechanisms. **Current Pain Headache Reports**, v. 6, p. 21-28, 2017.

MEDEIROS, P.; OLIVEIRA-SILVA, M.; NEGRINI-FERRARI, S.E., MEDEIROS, A.C.; COIMBRA, N. FREITAS, R.L. CB1-cannabinoid-, TRPV1-vanilloid- and NMDA-glutamatergic-receptor-signalling systems interact in the prelimbic cerebral cortex to control neuropathic pain symptoms. **Brain Research Bulletin**, v. 165, p. 118-128, 2020.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 144, n.6, p. 771-776, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MELO, I.S.F.; RODRIGUES, F.F.; COSTA, S.O.A.; BRAGA, A.V.; MORAIS, M.I.; VAZ, J.A.; NETO, L.S.; GALVÃO, I.; MODOLO, L.V.; AMARAL, F.A.; OLIVEIRA, R.B.; DE FÁTIMA, A.; COELHO, M.M.; MACHADO, R.R. 4-Methylbenzenecarbothioamide, a hydrogen sulfide donor, inhibits tumor necrosis factor- α and CXCL1 production and exhibits activity in models of pain and inflammation, **European Journal Pharmacology**, v.856, p.1-9, 2019.

MICKLE, A.D.; SHEPHERD, A.J.; MOHAPATRA, D.P. Nociceptive TRP channels: sensory detectors and transducers in multiple pain pathologies. **Pharmaceuticals**, v. 9, p. 1-26, 2016.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MINUZ, P.; DEGAN, M.; GAINO, S.; MENEGUZZI, A.; ZULIANI, V.; SANTONASTASO, C.L.; DEL SOLDATO, P.; LECHI, A. NCX4016 (NO-aspirin) has multiple inhibitory effects in LPS-stimulated human monocytes. **British Journal of Pharmacology**, v.34, p. 905–911, 2001.

MOILANEN, E.; VUORINEN, P.; KANKAANRANTA, H.; METSÄ-KETELÄ, T.; VAPAATALO, H. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. **British Journal Pharmacology**, v. 109, n. 3, p. 852-8, 1993.

MONTEIRO, E.C.A.; TRINDADE, J.M.F.; DUARTE, A.L.B.P.; CHAHADE, W.H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). *Temas de Reumatologia Clínica*, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MORAIS, M.I.; RODRIGUES, F.F.; COSTA, S.O.A.M.; GOULART, F.A., COSTA, F.C., MELO, I.S.F.; AUGUSTO, P.S.A.; DUTRA, M.M.G.B.; DE FÁTIMA, Â.; COELHO, M.M.; MACHADO, R.R. Nicorandil inhibits mechanical allodynia induced by paclitaxel by activating opioidergic and serotonergic mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 824, p. 108-114, 2018.

NAGAKURA, Y. Challenges in drug discovery for overcoming ‘dysfunctional pain’: an emerging category of chronic pain. **Drug Discovery**, v. 10, p. 1043-1045, 2015.

NAGY, G.; CLARK, J.M.; BUZÁS, E.I.; GORMAN, C.L.; COPE, A.P. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunology Letters**, v.111, p. 1-5, 2007.

NAIK, A.K; TANDAN, S.K.; KUMAR, D.; DUDHGAONKAR, S.P. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 530, p. 59-69, 2006.

NEGRETE, R.; HERVERA, A.; LEÁNEZ, S.; JESÚS, M.; MARTÍN-CAMPOS, O. The Antinociceptive Effects of JWH-015 in Chronic Inflammatory Pain Are Produced by Nitric Oxide-cGMP-PKG-KATP Pathway Activation Mediated by Opioids. **Plos one**, v.6, 2011.

NICKEL, F.T.; SEIFERT, F.; LANZ, S.; MAIHÖFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 81-91, 2012.

NICOHLS, C.G. K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature**, v. 440, p. 470-476, 2006.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. WHO guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. 172 p. 2012.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation, **Brain Research**, v. 912, p. 171–175, 2001.

PACHMAN, D.R.; BARTON, D.L.; WATSON, J. C., & Loprinzi, C. L. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, p. 377–387, 2011.

PARK, S. B.; GOLDSTEIN, D.; KRISHNAN, A.V.; LIN, C.S.; FRIEDLANDER, M.L.; CASSIDY, J.; KOLTZENBURG, M.; KIERNAN, M.C. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 419-437, 2013.

PAUL-CLARK, M.; DEL SOLDATO, P.; FIORUCCI, S.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. 21-NO-prednisolone is a novel nitric oxide releasing derivative of prednisolone with enhanced anti-inflammatory properties. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p.1345–1354, 2000.

PENG, H.B.; RAJAVASHISTH, T.B.; LIBBY, P.; LIAO, J.K. Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p.17050-17055, 1995.

PERTWEE, R.G. Cannabinoid receptors and pain **Progress Neurobiology**, v. 63, p. 569-611, 2001.

PESSOA, B.L.; ESCUDEIRO, G.; NASCIMENTO, O.J.M. Emerging treatments for neuropathic pain. **Current Pain Headache Reports**, v. 56, p. 1-9, 2015.

PIRLAMARLA, P.; BOND, R.M. FDA Labeling of NSAIDs: Review of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs in Cardiovascular Disease. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 26, n.8, p. 675-680, 2016.

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**, v. 94, p. 293-304, 2001.

POSSO, I.P.; PALMEIRA, C.C.A.; VIEIRA, E.B.M. Epidemiologia da dor neuropática. **Revista Dor**, v. 17, p. 11-14, 2016.

PRADO, W. A.; SCHIAVON, V.F.; CUNHA, F. Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 441, n. 1-2, p. 57-65, 2002.

RAJA, S.N.; CARR, D.B; COHEN, M.; FINNERUP, N. B.; FLOR, H.; GIBSON, S.; KEEFE, F.J.; MOGIL, J.S.; RINGKAMP, M.; SLUKA, K.A.; SONG, X.; STEVENS, B.; SULLIVAN, M.D.; TUTELMAN, P.R.; USHIDA, T.; VADER, K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p.1976-1982, 2020.

RAISIAN, D.; ERFANPARAST, A.; TAMADDONFARD, E.; SOLTANALINEJAD-TAGHIABAD, F. Medial prefrontal cortex nitric oxide modulates neuropathic pain

behavior through mu opioid receptors in rats, **Corean Journal of Pain**, v. 35, p. 413–422, 2022.

RAO, R. D.; MICHALAK, J.C.; SLOAN, J.A.; LOPRINZI, C.L.; SOORI, G.S.; NIKCEVICH, D.A.; WARNER, D.O.; NOVOTNY, P.; KUTTEH, L.A; WONG, G.Y. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial (N00C3). **Cancer**, v. 110, p. 2110-2118, 2007

REIS, G.M.; PACHECO, D.; PEREZ, A.C.; KLEIN, A.; RAMOS, A.M.; DUARTE, I.D. Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. **Life Sciences**, V.85, p. 351–356, 2009.

REYES-GIBBY, C.C.; MORROW, P.K.; BUZDAR, A.; SHETE, S. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy as a predictor of neuropathic pain in breast cancer patients previously treated with paclitaxel. **Pain**, v. 10, p. 1146-1150, 2009.

ROCHA, A.C.; FERNANDES, E.S.; QUINTÃO, N.L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 688-695, 2006.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, p. 94 - 105, 2007.

RODRIGUES, A. R.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p.110-114, 2000.

RODRIGUES, A.R.; CASTRO, M.S.; J.N.; FRANCISCHI, PEREZ, A.C.; DUARTE, I.D. Participation of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats. **Brazilian Journal of Medicine Biological Research**, v. 38,91-97, 2005.

ROMERO-SANDOVAL, E.A.; DEL SOLDATO, E.; HERRERO, H.F. The effects of sham and full spinalization on the antinociceptive effects of NCX-701 (nitroparacetamol) in monoarthritic rats. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 3, p.412-419, 2003.

ROMERO-SANDOVAL, E.A.; MAZARIO, J.; HOWAT, D.; HERRERO, J.F. NCX-701 (nitroparacetamol) is an effective antinociceptive agent in rat withdrawal reflexes and wind-up. **British Journal of Pharmacology**, v.135, n.6, p. 1556-1562, 2002.

ROMERO, T.R.L.; RESENDE, L.C.; DUARTE, I.D. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 4, p.431-435, 2011.2011.

RYAN, G.B; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **The American Journal of Pathology**, v. 86, n.1, p. 183-276, 1977.

RYMAN, J.T.; MEIBOHM, B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. **CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.**, v.6, n.9, p. 576–588, 2017.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, n.10, p.3680-3686, 2004.

SAIF, M.W.; SYRIGOS, K.; KALEY, K.; ISUFI, I. Role of pregabalin in treatment of oxaliplatin-induced sensory neuropathy. **Anticancer Research**, v. 30, p. 2927-2933, 2010.

SAMAD, T.A.; MOORE, K.A.; SAPIRSTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J.V.; WOOLF, C.J. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, p. 471-475, 2001.

SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.; VALÉRIO, D.A.R.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **British Journal of Pharmacology**, v.149, p. 14-22, 2006.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p.170-181, 2010.

SARANTOPOULOS, C.; MCCALLUM, B.; SAPUNAR, D. ATP-sensitive potassium channels in rat primary afferent neurons: The effect of neuropathic injury and gabapentin. **Neuroscience Letters**, v. 343, p. 185-189, 2003.

SCHOLZ, J. & WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, 1361-1368, 2007.

SCHUG, S.A.; GARRETT, W.R.; GILLESPIE, G. Opioid and non-opioid analgesics. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 17, n. 1, p. 91-110, 2003.

SCRIVO, R.; VASILE, M.; BARTOSIEWICZ, I.; VALESIN, G. Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. **Autoimmunity Reviews**, v.10, p. 369–374, 2011.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SPECIALI, J.G.; FLEMING, N.R.P.; FORTINI, I. Cefaleias primárias: dores disfuncionais. **Revista Dor**, v. 17, p. 72-74, 2016.

SHEPARD, M.; PHILLIPS, G.L.; THANOS, C.D.; FELDMANN, M. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. **Clinical. Medicine.**, v.17, n.3, p.220–232, 2017.

SHI, S.; KLOTZ, U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 233-252, 2008.

SISIGNANO, M.; BARON, R.; SCHOLICH, K.; GEISSLINGER, G. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, p. 694-707, 2014.

SMITH, E. M.; PANG, H.; CIRRINCIONE, C.; FLEISHMAN, S.; PASKETT, E.D.; AHLES, T.; BRESSLER, L.R.; FADUL, C.E.; KNOX, C.; LE-LINDGWISTER, N.; GILMAN, P.B.; SHAPIRO, C.L. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 309, p. 1359-1367, 2013.

SOLOMONO, D.H.; HUSNI, E.; LIBBY, P.A.; YEOMANS, N.D.; LINCOFF, M.; LYSCHER, T.F.; MENON, V.; BRENNAN, D.M.; WISNIEWSKI, L.M.; NISSEN, S.E.; BORER, J.S. The Risk of Major NSAID Toxicity with Celecoxib, Ibuprofen, or Naproxen: A Secondary Analysis of the PRECISION Trial. **The American Journal of Medicine**, v. 130, n.12, p.1415-1422, 2017.

SONG, I.H.; GOLD, R.; STRAUB, R.H.; BURMESTER, G.R.; BUTTGEREIT, F. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't active! **The Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 1199-1207, 2005.

SOUSA, A.M.; PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception, **Brain Research**, v. 897, p. 9–19, 2001.

SUGIMOTO, M.A.; SOUSA, L.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. Resolution of inflammation: what Controls its Onset? **Frontiers in Immunology**, v. 7, p.1-18, 2016.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v.3 p.276-284, 2003.

TEGEDER, I.; SCHMIDTKO, A.; NIEDERBERGER, E.; RUTH, P.; GEISSLINGER, G. Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. **Neuroscience Letters**, v. 332, n. 2, p.146-150, 2002.

TEIXEIRA, J.T.; ALMEIDA, D.B.; YENG, L.T. Conceito de dor neuropática aguda. O papel do nervi nervorum na distinção entre dores agudas nociceptiva e neuropática. **Revista Dor**, v. 17, p. 5-10, 2016.

THOMASSEN, M.J.; BUHROW, L.T.; CONNORS, M.J.; KANEKO, F.T., ERZURUM, S.C.; KAVURU, M.S. Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 17, n. 3, p.279-283, 1997.

TOMINAGA, M. The Role of TRP Channels in Thermosensation. In: LIEDTKE, W. B.; HELLER, S. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007, Cap. 20.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, p.531-543, 1998.

TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology**, v. 101, p. 983–990, 2004.

TREEDE, R.; RIEF, W.; BARKE, A.; AZIZ, Q.; BENETT, M.; BENOLIEL, R.; COHEN, M.; EVERS, S.; FINNERUP, N.; FIRST, M.; GIAMBERARDINO, M. A.; KAASA, S.; KOSEK, E.; LAVAND’HOMME, P.; NICHOLAS, M.; PERROT, S.; SCHOLZ, J.; SCHUG, S.; SMITH, B.H.; SVENSSON, P.; VLAEYEN, J.W.S.; WANG, S. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 156, p. 1003-1007, 2015.

TURNBULL, C.M.; MARCARINO, M.; SHELDRAKE, T.A.; LAZZARATO, L.; CENA, C.; FRUTTERO, R.; GASCO, G.; FOX, R.; MEGSON, I.L.; ROSSI, A.G. A novel hybrid aspirin-NO-releasing compound inhibits TNF α release from LPS-activated human monocytes and macrophages. **Journal Immunology**. v. 5, p.1-12, 2008.

VARDEH, D.; MANNION, R.J.; WOOLF, C.J. Toward a mechanism-based approach to pain diagnosis. **Pain**, v. 17, p. 50-69, 2016.

VASCONCELOS, F.H.; ARAÚJO, G.C. Prevalência de dor crônica no Brasil: estudo descritivo. **Brazilian Journal of Pain**, v. 2, p. 176-179, 2018.

VAN HECKE, O.; AUSTIN, S.K.; KHAN, R.A.; SMITH, B.H. Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, p. 654-662, 2014.

VAN UFFELEN, B.E.; DE KOSTER, B.M.; VAN DEN BROEK, P.J.; VAN STEVENINCK, J.; ELFERINK, J.G. Modulation of neutrophil migration by exogenous gaseous nitric oxide. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 94–100, 1996.

VAZ, Z.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304 - 312, 1996.

WALLACE, J.L.; MUSCARA, M.N.; MCKIGHT, W.; DICAY, M.; DEL SOLDATO, P.; CIRINO, G. *In vivo* antithrombotic effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative, NCX-4016. **Thrombosis Research**, v.93, p.43–50, 1999.

WALLACE, J.L.; REUTER, B.; CICALA, C.; MCKNIGHT, W.; GRISHAM, M.B.; CIRINO, G. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. **Gastroenterology**, v. 107, p.173–179, 1994.

WALTERS, K.M.; WOESSNER, K.M. An overview of nonsteroidal antiinflammatory drug reactions. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, p. 625-641, 2016.

WANG, X.M.; LEHKY, T.J.; BRELL, J.M.; DORSEY, S.G. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. **Cytokine**, v. 59, p. 3-9, 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*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2325–2327, 1971.

WANIKIAT, P.; WOODWARD, D.F.; ARMSTRONG, R.A. Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. **British Journal Pharmacology**, v.122, p. 1135-1145, 1997.

WHITE, W.B.; SCHNITZER, T.J.; FLEMING, R.; DUQUESROIX, B.; BEEKMAN, M. Effects of the cyclooxygenase inhibiting nitric oxide donor naproxen versus naproxen on systemic blood pressure in patients with osteoarthritis. **The American Journal of Cardiology**, v. 104, n. 6, p. 840-845, 2009.

WONGRAKPANICH, S.; WONGRAKPANICH, A.; MELHADO, K.; RANGASWAMI, J. Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging & Disease**, v. 9, n.1, p.143-150, 2018.

WOLF, S.; BARTON, D.; KOTTSCHADE, L.; GROTHEY, A.; LOPRINZI, C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 1507–1515, 2008.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, p. 441 - 451, 2004.

WU, W.; HAO, J.; ONGINI, E.; IMPAGNATIELLO, F.; PRESOTTO, C.; XU, X. A nitric oxide (NO)-releasing derivative of gabapentin, NCX 8001, alleviates neuropathic pain-like behavior after spinal cord and peripheral nerve injury. **British Journal of Pharmacology** v., 141, p. 65–74, 2004.

XIAO-GAO, J.; SHAO-RUI C.; XUE-HONG C.; LI L.; HUI-LIN P. Nitric oxide inhibits nociceptive transmission by differentially regulating glutamate and glycine release to spinal dorsal horn neurons. **Journal Biological Chemistry**, v. 286, n.38, p. 33190-33202, 2011.

XU, J.Y.; PIEPER, G.M.; TSENG, L.F. Activation of a NO-cyclic GMP system by NO donors potentiates beta-endorphin-induced antinociception in the mouse. **Pain**, v. 63, n. 3, p.377-383, 1995.

XU, S.; ZHOU, X.; YUAN, D.; XU, Y.; HE, P. Caveolin-1 scaffolding domain promotes leukocyte adhesion by reduced basal endothelial nitric oxide-mediated ICAM-1 phosphorylation in rat mesenteric venules. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 305, n. 10, p. 1484–1493, 2013.

YOUNG, D.V.; COCHRAN, E.D.; DHAWAN, V.; EARL, R.A.; ELLIS, J.L.; GARVEY, D.S.; JANERO, D.R.; KHANAPURE, S.P.; LETTS, L.G.; MELIM, T.L.; MURTY, M.G.; SHUMWAY, M.J.; WEY, S.J.; ZEMTSEVA, I.S.; SELIG, W.M. A comparison of the cyclooxygenase inhibitor-NO donors (CINOD), NMI-1182 and AZD3582, using in vitro biochemical and pharmacological methods. **Biochemical Pharmacology**, v.70, p.1343-1351, 2005.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHANG, H. LI, Y.; DE CARVALHO, M.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C.J.; ALBRECHT, P.J.; DOUGHERTY, P.M. Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of Pain**, v. 17, p. 775-86, 2016.

ZHANG, Y.; BREWER, A.L.; NELSON, J.T.; SMITH, P.T.; SHIRACHI, D.Y.; QUOCK, R. Hyperbaric oxygen produces a nitric oxide synthase-regulated anti-allodynic effect in rats with paclitaxel-induced neuropathic pain. **Brain Research**, v. 1711, p. 41-47, 2019.

ZHAO, P.; WAXMAN, S.G.; HAINS, B.C. Modulation of thalamic nociceptive processing after spinal cord injury through remote activation of thalamic microglia by cysteine cysteine chemokine ligand 21. **Journal of Neuroscience**, v.27, 8893-8902, 2007.

ZHU, H.; XU, J.; SHEN, K.; PANG, R.; WEI, X.; LIU, X. Bulleyaconitine A depresses neuropathic pain and potentiation at C-fiber synapses in spinal dorsal horn induced by paclitaxel in rats. **Experimental Neurology**, v. 273, p. 263-272, 2015.

ZILLIOX, L.A. Neuropathic pain. **Continuum**, v. 23, p. 512-532, 2017.

ZIMMER, Z.; FRASER, K.; GROL-PROKOPCZYK, H.; ZAJACOVA, A. A global study of pain prevalence across 52 countries: examining the role of country-level contextual factors, **Pain**, v. 163, n.1. p.1740-1750, 2022.

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

ZOGA, V.; KAWANO, T.; LIANG, M.Y.; BIENENGRAEBER, M.; WEIHRAUCH, D.; MCCALLUM, B.; GEMES, G.; HOGAN, Q.; SARANTOPOULOS, C. K_{ATP} channel subunits in rat dorsal root ganglia: alterations by painful axotomy. **Molecular Pain**, v. 26, p. 1-15, 2010.