Vanessa Pacciari Gutierrez

**Efeito antinociceptivo da crotalfina
sobre a dor óssea induzida pelo tumor
de Walker 256 em fêmur de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

Vanessa Pacciari Gutierrez

**Efeito antinociceptivo da crotalfina
sobre a dor óssea induzida pelo tumor
de Walker 256 em fêmur de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury

Versão original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Gutierrez, Vanessa Pacciari.

Efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a dor óssea induzida pelo tumor de Walker 256 em fêmur de ratos / Vanessa Pacciari Gutierrez.
-- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Dor.

Versão do título para o inglês: Antinociceptive effect of crotalphine in bone pain induced by Walker 256 tumor cells in femur rats.

1. Dor de câncer 2. Células do tumor de Walker 256 3. Crotalfina
4. Hiperálgia 5. Alodinia 6. Antinocicepção I. Cury, Profa. Dra. Yara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0215/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Pacciari Gutierrez.

Título da Tese: Efeito antinociceptivo da crotalina sobre a dor óssea induzida pelo tumor de Walker 256 em fêmur de ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Yara Cury.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **032** nas fls. **55** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Yara Cury, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Efeito antitumoral e antinociceptivo da crotoxina e do CNF 021.03 sobre um novo modelo de dor de câncer ósseo induzido em ratos"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Vanessa Pacciari Gutierrez e os pesquisadores Roger Chammas, Fabio Luiz Navarro Marques, Miriam Roseli Yoshie Okamoto, Ana Carolina Brandão de Campos F. Pinto, Rui Curi, Jarbas Arruda Bauer, Patrícia Brigatte**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **19.11.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de novembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito antitumoral e antinociceptivo da crotoxina e do CNF 021.03 sobre um novo modelo de dor de câncer ósseo induzido em ratos. - Indução do câncer ósseo pelas células do tumor de Walker 256", protocolo nº 437/07, sob a responsabilidade de Yara Cury e Vanessa Pacciari Gutierrez, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **12/12/2007**.

São Paulo, 13 de dezembro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Aos meus Pais,

Vocês me deram a vida e hoje de uma forma muito modesta retribuo dedicando um pequeno, mas significativo fragmento dela a vocês, não seria capaz de abrir meus olhos sem o apoio e o amor de vocês, obrigada por tudo e por serem e representarem a minha maior referência de vida, de respeito de honestidade e principalmente de AMOR...

Mãe e Pai vocês são detentores incondicionais dos meus melhores sentimentos! AMO MUITO...

Ao Eduardo ♥

Você tem o poder de surgir como um anjo em todas as horas mais aflitas... foi assim nos últimos 20 anos, preenchendo minha vida de alegria e acalmando meu coração. Dono das minhas melhores lembranças, meu melhor amigo, meu menino lindo... TE AMO ♥

Aos meus irmãos,

Sempre juntos em todos os momentos compartilhando nossa existência, existência essa, que seria infinitamente vazia se não fossem vocês a me completarem... Extensão de mim mesma em outra pessoa... Gla e Má, amo vocês...

A minha filha (postíça),

Você tem diversos nomes, cada um te chama de uma forma, Clara, Lhulis, pechuguinha...

Mas poderia chamar-se *FELICIDADE*.

CLARA, CLARIDADE da minha vida...

A minha Família Adotiva

Elô, minha sogra linda e loira e Jair meu pseudo-sogro mais que querido e amado.

Chicão meu amigo querido, além de ser o sogro mais lindo e fofo do mundo todo de novo e Rosa minha pseudo - sogra mais que querida.

Todos nós juntos formamos uma família linda... Obrigada por me fazem imensamente feliz ♥

Á Yara

Tantos anos se passaram... Tantos ensinamentos, sempre todos nós juntos.

Yara muito obrigada pela oportunidade de compartilhar esses anos dentro do NOSSO laboratório que sem dúvida é o mais ESPECIAL do mundo.

Aos meus Amigos

Tulis (Pat), minha loira mais querida e amada (ciumenta e muito possessiva), sua ajuda é essencial na minha vida, companheira de todos os momentos, amiga incondicional AMO. Dona do gato mais lindo do mundo ♥.

A minha amada loira, companheira de vida e trabalho Van Zambelli, por ser essa amiga sempre presente e por me presentear com essa família linda, Ceci, Alf, Julio e Pedro.... Amo vocês♥.

Inguinha, minha amada amiga, cúmplice de todas as horas, sem seus conselhos e amor tudo seria muito menos feliz. Sem falar no meu sobrinho lindo o Felipe..... Amo Muito ♥.

Ju, quantas coisas se passaram nesses anos e você sempre ao meu lado de forma tão especial, sua força é exemplo de vida a todos os que cruzam seu caminho... Obrigada pela colaboração neste trabalho e principalmente pela lição de amor e amizade que nos dá todos os dias! Amo você ♥ (sem falar no Charles não menos querido!).

Aninha, sempre tão amável e principalmente companheira nas aventuras com os nossos animaizinhos (incluindo nosso gambazinho), que São Francisco de Assis sempre esteja ao nosso lado... ♥

Samy, sempre presente contagiando a todos com sua alegria, obrigada por tudo...AMO ♥

Gi, querida, nossas infinitas conversas são sempre muito produtivas, obrigada por todos os nossos cafés e chás tão agradáveis e por todo carinho ♥.

Rô, minha amiga do coração e melhor companheira de viagens por esse mundo a fora ♥.

Cá, Maru, Camis, Lili, Kiko, Rê Dias, Wil, Mani, Lê Marcio..... Nossa família Butantan que nos remete a tantos momentos felizes. Muitos de vocês estão longe mas permanecem aqui em nos nossos pensamentos a todo momento ♥♥♥.

A nova geração de amigos muito queridos que entraram para nossa família do But's, César, amigo de todas as horas, Caru, sempre presente com seu carinho e Marli, grande amiga que nos ajuda a manter tudo em ordem ♥.

As minhas amigas Karen e Pri, nós estamos tão distantes fisicamente, mas tão perto de coração♥.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Juliana de Souza Carvalho (LEDS), fundamental suporte em todos os experimentos e discussões deste trabalho.
- ❖ Dra. Patrícia Brigatte, pela ajuda desde o início do projeto de pesquisa, pelas sugestões, pelo exame de qualificação colaborando de forma tão efetiva em todas as etapas.
- ❖ A Ana Carolina Fernandes (LEDS) pela ajuda em todos os momentos.
- ❖ Aos pesquisadores Dr. Fábio Navarro Marques, Artur Coutinho, funcionários, Silvana Prando, Mirian Okamoto e aluno Adriano Radin, do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas de São Paulo, pela essencial ajuda, onde foram realizadas as imagens e as discussões sobre os resultados obtidos no Micro PET SPECT CT.
- ❖ Aos técnicos, veterinários Dra. Silvana e Dra. Ana Carolina e aos alunos do Departamento de Radiologia do Hospital Veterinário da faculdade de medicina veterinária e zootecnia – USP/SP onde foram realizadas e analisadas as imagens radiográficas.
- ❖ Aos técnicos Clau, Sandroca, Tânia, Ju e Ana, alunos Zambelli, César, Caru, Lê Márcio, Lê Grecco, Julian, Felipe, Will, Luisa, Fran, Nath, Bia, e pesquisadores Yara e Gisele do Laboratório de Dor e Sinalização (LEDS) do Instituto Butantan.
- ❖ Aos técnicos Neuzitcha, Iracema, alunos, Bianca e pesquisadores, Samy, Rê Giorgi, Cristina, Marcelo, Ida do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.
- ❖ As secretárias do Instituto de Ciências Biomédicas – USP/SP, Selminha e Mônica.
- ❖ Departamento de Pós – Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas – USP/SP Celso e Luciana.
- ❖ As bibliotecárias do Instituto de Ciências Biomédicas – USP/SP, Monica e Eva.
- ❖ Ao Biotério Central do Instituto Butantan, em especial a Fátima, pelo fornecimento dos animais.

Agradeço ao apoio financeiro da FAPESP, pela bolsa de doutorado, Fundação Butantan e INCTTOX.

Este trabalho foi realizado no
Laboratório Especial de Dor e Sinalização
do Instituto Butantan

RESUMO

GUTIERREZ, V. P. **Efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a dor óssea induzida pelo tumor de Walker 256 em fêmur de ratos.** 2012. 140 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A Crotalfina (CRP), um peptídeo de 14 aminoácidos obtido do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, induz efeito antinociceptivo, de longa duração, mediado pela ativação de receptores opióides periféricos. Apesar destes dados, o efeito desse peptídeo sobre modelos experimentais de dor óssea não é ainda conhecido. No presente estudo, padronizamos um modelo experimental de dor óssea induzida pela administração de células do tumor de Walker 256 em fêmur de ratos e avaliamos o possível efeito antinociceptivo da crotalfina neste modelo. As alterações estruturais e metabólicas ósseas acarretadas pela injeção das células tumorais foram avaliadas por meio de imagens radiográficas, tomográficas e cintilográficas. As análises demonstraram a presença de processos osteolíticos difusos, destruição progressiva do tecido cortical ósseo e intensa atividade osteogênica. Ainda, foi detectado aumento de partes moles adjacentes ao osso, fenômeno observado em pacientes acometidos pelo câncer ósseo. As alterações ósseas estruturais e metabólicas observadas são compatíveis com a implantação das células tumorais no fêmur dos animais. Com o intuito de verificar possíveis focos metastáticos, analisamos histologicamente os órgãos dos animais e observamos a presença de células tumorais no pulmão, baço e no fígado dos animais. Os resultados sugerem que as células injetadas no fêmur podem migrar para outros órgãos, incluindo órgãos linfóides. Parâmetros fisiológicos como curva de sobrevida e evolução ponderal, além do consumo de água e ração foram também avaliados. Foi detectado óbito dos animais a partir do décimo oitavo dia após a inoculação das células e diminuição marcante da ingestão de alimento no décimo quarto. Neste período, houve diminuição da evolução ponderal dos animais. A presença de fenômenos nociceptivos foi caracterizada pela presença de hiperalgesia, alodinia e dor manifesta. Estes fenômenos foram observados a partir do primeiro dia após a inoculação das células, persistindo por todo o período de observação (14 dias). Drogas usualmente utilizadas no tratamento da dor óssea foram usadas como controle positivo (morfina, indometacina, gabapentina, ácido zoledrônico). Estes tratamentos inibiram parcialmente os fenômenos nociceptivos observados. Crotalfina, na dose de 8 µg/kg, *p.o.*, administrada no décimo quarto dia após a inoculação das células tumorais, bloqueou a hiperalgesia, alodinia e dor manifesta. Esse efeito antinociceptivo é de longa duração (2 dias), mediado pela ativação de receptores opióides do tipo *kappa* e *delta* periféricos. Não foi observado o desenvolvimento de tolerância após o tratamento prolongado com a crotalfina, diferentemente do observado para a morfina. Nossos resultados indicam que a inoculação das células tumorais causa alterações compatíveis com o desenvolvimento tumoral (intensa atividade osteogênica) e dor óssea (hiperalgesia, alodinia, dor manifesta). A crotalfina induz potente efeito antinociceptivo, de longa duração, confirmando o potencial terapêutico deste peptídeo.

Palavras-chave: Dor de câncer. Células do tumor de Walker 256. Crotalfina. Hiperalgesia. Alodinia. Dor manifesta. Antinocicepção.

ABSTRACT

GUTIERREZ, V. P. **Antinociceptive effect of crotalphine in bone pain induced by Walker 256 tumor cells into femoral cavity of rats.** 2012. 140 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Crotalphine (CRP), a 14 amino acid peptide obtained from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, induces a long-lasting antinociceptive effect mediated by activation of peripheral opioid receptors. Despite these data, the effect of CRP on bone pain induced by the injection of tumor cells was not evaluated yet. Therefore, the aim of the present work was to standardize a new rat model of bone pain induced by the injection of Walker 256 carcinoma cells into the femoral cavity of rats, and to characterize the antinociceptive effect of CRP in this model of bone pain. Structural and metabolic bone changes induced by tumor cell injection were assessed by radiography, tomography and scintigraphy techniques. The results showed the presence of a diffuse osteolytic processes, progressive destruction of cortical bone tissue and intense osteogenic activity. In addition, an increase of soft tissue adjacent to the bone was detected, being this phenomenon detected in patients with bone cancer. Moreover, hystopathological analysis of the lungs, spleen and liver of the rats showed the presence of tumor cells in these organs, indicating the occurrence of metastasis, also in lymphoid organs. Parameters such as survival rate, weight gain, water and food ingestion were also evaluated. Animal's death was detected from the eighteenth day after tumor cell inoculation. A marked decrease in food intake and a decrease in weight gain at the fourteenth day after tumor cell injection was also observed. Nociception induced by tumor cell inoculation was characterized by the presence of hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain. These phenomena were detected on day 1 after cell injection and lasted for all the observation period (14 days). Drugs commonly used for the treatment of bone pain were used as positive control (morphine, indomethacin, gabapentin, zoledronic acid). These treatments partially inhibited the nociceptive phenomena. Crotalphine (8 mg/kg, p.o.), administered on day fourteen after tumor cell inoculation, blocked hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain. This antinociceptive effect is a long-lasting effect, as it was detected for 2 days after treatment, and it is mediated by activation of peripheral κ - and δ - opioid receptors. Prolonged treatment with crotalphine (14 days) did not cause the development of tolerance to its antinociceptive effect. In contrast, prolonged administration of morphine caused the development of tolerance, detected on the 6th day of the treatment. Our results indicate that intrafemoral tumor cell inoculation causes bone changes compatible with tumor development (intense osteogenesis activity) and bone cancer pain (hyperalgesia, allodynia, spontaneous pain). Crotalphine induces a potent and long-lasting antinociceptive effect, confirming the therapeutic potential of this peptide.

Keywords: Bone pain, Walker 256 tumor cells, Cancer pain, Crotalphine, Hyperalgesia, Allodynia, Spontaneous pain, Antinociception.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – Anti-inflamatórios Não Esteroidais

ATP – Adenosina Trifosfato

Bp's – Bisfosfonatos

COX – Ciclo-oxigenase

CRP – Crotalina

CT – Tomografia Computadorizada

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DRG – Gânglio da raiz dorsal (Dorsal root ganglia)

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

FBP – Retroprojeção filtrada

FDG – Fluordesoxiglicose

GBq – Gigabequerel

GTP – Guanosina trifosfato

ICI 118,551 – $(\pm)$ -1-[2,3-(Dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol hydrochloride

ICI 174, 864 – N, N-diallyl-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu

IL 1 – Interleucina 1.

JTC 801 – N-(4-amino-2-methylquinolin-6-yl)-2-(4-ethylphenoxyethyl) benzamide hydrochloride

LE – Frequência de levantar.

LO – Frequência de locomoção

MAP quinases – Proteína-quinase ativada por mitógenos.

MDP – Metilenodifosfonato de Sódio

MPD – Membro Posterior Direito

MPE – Membro Posterior Esquerdo

NCT 2472 – Linhagem celular de sarcoma osteolítico

NGF – Fator de Crescimento Neural

NOR-BNI – nor-Binaltorphimine dihydrochloride

PD – Pata Direita

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PE – Pata Esquerda

PET – Tomografia por emissão de pósitrons

PGE₂ – Prostaglandina E₂

SPECT – Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (Single Photon Emission Computed Tomography)

TNF – Fator de Necrose tumoral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sequência de aminoácidos da Crotalina	23
Figura 2 - Desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia induzidas pela injeção das células do tumor de Walker 256	49
Figura 3 – Desenvolvimento de dor manifesta após a injeção das células do tumor de Walker 256	51
Figura 4 – Avaliação da quantidade de peso colocado sobre a pata dos animais após a injeção das células do tumor de Walker 256	52
Figura 5 – Efeito da osteotomia sobre o limiar nociceptivo (A) e a resposta à estimulação tátil (B) dos animais	54
Figura 6 – Efeito da osteotomia sobre a duração do tempo de lambida e levantamento da pata dos animais	55
Figura 7 - Efeito da injeção das células do tumor de Walker 256 sobre atividade geral dos ratos	57
Figura 8 – Imagem radiográfica obtida antes da inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos	60
Figura 9 – Alterações radiográficas obtidas 24 h após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos	61
Figura 10 – Alterações radiográficas obtidas 3 dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos	62
Figura 11 – Alterações radiográficas obtidas 7 dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos	63

Figura 12 – Alterações radiográficas obtidas 14 dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos	64
Figura 13- Corte axial (A) e tridimensional (B) da imagem tomográfica do animal 3 dias após a inoculação das células tumorais em fêmur de ratos	67
Figura 14- Corte axial (A) e tridimensional (B) da imagem tomográfica do animal 7 dias após a inoculação das células tumorais Walker 256 no fêmur de ratos	68
Figura 15 - Corte axial (A) e tridimensional (B) da imagem tomográfica do animal 7 dias após a inoculação das células tumorais Walker 256 no fêmur de ratos	69
Figura 16: Imagem SPECT (MDP - radiofármaco) 3, 7 e 14 dias após a inoculação das células tumorais	71
Figura 17: Alterações ósseas observadas por meio de cortes seccionais de imagens tomográficas (SPECT e CT) dos fêmures direito e esquerdo, utilizados para quantificação da captação relativa do ^{99m} Tc-MDP.....	73
Figura 18 – Corte axial e imagem tomográfica tridimensional do animal 14 dias após a inoculação das células tumorais	75
Figura 19 – Alterações histopatológicas no fêmur dos animais injetados com tumor de Walker 256	77
Figura 20 – Alterações histopatológicas da musculatura estriada esquelética adjacente ao fêmur	80
Figura 21 – Alterações histopatológicas de pulmão de rato	82
Figura 22 – Alterações histopatológicas do baço de ratos	85
Figura 23 – Alterações histopatológicas de fígado de rato	88

Figura 24 – Alterações histopatológicas do rim de rato	81
Figura 25 – Efeito da injeção de células do Tumor de Walker 256 sobre a sobrevivência, ingestão alimentar e hídrica e determinação da evolução ponderal	93
Figura 26 - Efeito da indometacina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela implantação das células tumorais no fêmur de ratos	96
Figura 27 - Efeito da morfina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela inoculação das células tumorais	99
Figura 28 - Efeito do tratamento diário, durante 14 dias, com gabapentina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela implantação das células tumorais	102
Figura 29- Efeito do tratamento com ácido zoledrônico sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelo câncer ósseo	105
Figura 30 - Efeito anti-hiperalgésico de diversas doses da crotalfina em animais submetidos à injeção das células tumorais	108
Figura 31 - Efeito antialodínico da crotalfina em animais submetidos à injeção das células do tumor de Walker 256	109
Figura 32- Efeito da crotalfina sobre o tempo de duração da lambida e levantamento da pata induzida pela injeção das células tumorais	110
Figura 33 - Duração do efeito anti-hiperalgésico e antialodínico da crotalfina em animais submetidos à injeção das células tumorais	111
Figura 34 - Duração do efeito da crotalfina sobre a duração do tempo de lambida e levantamento da pata induzida pela injeção das células tumorais	113

Figura 35 – Envolvimento de receptores <i>delta</i> e <i>kappa</i> opióides periféricos no efeito antinociceptivo da crotalina no modelo de câncer ósseo	115
Figura 36 – Efeito do tratamento a cada 2 dias, durante 15 dias, com a Crotalina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelo câncer ósseo	119
Figura 37 – Efeito do tratamento diário, durante 14 dias, com crotalina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelo câncer ósseo	120
Figura 38 – Alterações histopatológicas de cortes histológicos de fêmur de rato 14 dias após a administração das células tumorais	121

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	CROTALFINA	21
1.2	NEOPLASIA	23
1.3	NEOPLASIA ÓSSEA	26
1.4	CONTROLE DA DOR NEOPLÁSICA	29
1.5	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DE NEOPLASIA ÓSSEA	33
2	OBJETIVOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	ANIMAIS	37
3.2	PLANEJAMENTO GERAL	37
3.3	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256	38
3.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTAÇÃO PARA INJEÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS NO FÊMUR DE RATOS	39
3.5	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (MICROSCOPIA DE LUZ)	39
3.6	PROCEDIMENTO ANESTÉSICO PARA OS EXAMES DE IMAGEM	40
3.7	EXAME RADIOGRÁFICO	40
3.8	MICRO-PET-SPECT- CT	41
3.8.1	<i>Aquisição de imagens SPECT/CT</i>	41
3.8.2	<i>Aquisição de imagens PET/CT</i>	41
3.8.3	<i>Processamento de imagens SPECT/CT e PET/CT</i>	41
3.9	DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL	41
3.10	AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA	42
3.11	AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO	42
3.12	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOLOROSA	42
3.12.1	<i>Determinação da hiperalgesia</i>	42
3.12.2	<i>Determinação da alodinia</i>	43
3.12.3	<i>Avaliação de nocicepção manifesta</i>	43
3.12.4	<i>..... Avaliação da incapacitância</i>	44
3.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL DOS ANIMAIS	44
3.14	TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	45
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4	RESULTADOS	47

4.1 DETERMINAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA, ALODINIA, DOR MANIFESTA E INCAPACITÂNCIA APÓS INJEÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256 NA CAVIDADE INTRAMEDULAR DO FÊMUR DE RATOS	47
4.2 EFEITO DA OSTEOTOMIA SOBRE O LIMAR NOCICEPTIVO DOS ANIMAIS.....	53
4.3 EFEITO DA INJEÇÃO DO TUMOR DE WALKER 256 SOBRE A ATIVIDADE GERAL DOS ANIMAIS..	56
4.4 AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256 NO FÊMUR DE RATOS	58
4.4.1 Imagem Radiográfica.....	58
4.4.2 Imagens de PET, SPECT e CT da evolução do implante de células tumorais na região do fêmur de ratos	65
4.4.2.1 Imagem Tomográfica (Tomografia Computadorizada – CT)	66
4.4.2.2 Imagens de SPECT, PET e CT	70
4.4.3 Quantificação das imagens SPECT - Relação Fêmur Direito/Esquerdo	72
4.5 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	76
4.5.1 Alterações histopatológicas do fêmur dos animais injetados com tumor de Walker 256.....	76
4.5.2 Alterações histopatológicas na musculatura estriada esquelética adjacente ao fêmur dos animais injetados com tumor de Walker 256.....	79
4.5.3 Alterações histopatológicas do pulmão de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur.....	81
4.5.4 Alterações histopatológicas do baço de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur.....	84
4.5.5 Alterações histopatológicas do fígado de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur.....	87
4.5.6 Alterações histopatológicas do rim de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur.....	90
4.6 EFEITO DA INJEÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256 SOBRE A SOBREVIVÊNCIA, INGESTA ALIMENTAR E HÍDRICA E DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL	92
4.7 EFEITO DO TRATAMENTO COM FÁRMACOS ANALGÉSICOS SOBRE A NOCICEPÇÃO CAUSADA PELA IMPLANTAÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256 NO FÊMUR DE RATOS	95
4.8 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA CROTALFINA	107

<i>4.8.1 Efeito da crotalfina sobre a hiperalgesia, alodinia e dor manifesta induzidas pela injeção das células tumorais</i>	<i>107</i>
<i>4.8.2 Caracterização do tipo de receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo da crotalfina.....</i>	<i>114</i>
<i>4.8.3 Avaliação do desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo da crotalfina em modelo de dor óssea induzida pelas células do tumor de Walker 256.....</i>	<i>118</i>
5 DISCUSSÃO	122
6 CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

A crotalfina é um peptídeo de 14 aminoácidos, que induz potente atividade antinociceptiva (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012; KONNO et al., 2008), quando avaliada em diferentes modelos experimentais de dor aguda e crônica. Essa atividade é de longa duração e mediada pela ativação de receptores opióides periféricos (BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012; KONNO et al., 2008). Apesar desses dados, o possível efeito antinociceptivo da crotalfina em modelos de dor decorrente de neoplasias ósseas, não foi ainda investigado.

As neoplasias, incluindo as neoplasias ósseas, interferem com a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que provocam grande sofrimento e desconforto (BRASIL, 1991, 1998, 2001, 2011). Neste sentido, a dor é um sintoma comumente relatado, sendo muitas vezes severa e de difícil controle, acometendo cerca de 50% a 70% dos pacientes em todos os estágios da doença. No Brasil são relatados anualmente, cerca de 2.700 casos de neoplasias ósseas (BRASIL, 1991, 1998, 2001, 2011). Diante destes dados epidemiológicos, torna-se relevante o desenvolvimento de modelos experimentais que possam auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na gênese e controle desses processos patológicos, bem como no desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficazes no seu tratamento, incluindo no controle dos fenômenos nociceptivos característicos desse tipo de câncer.

1.1 Crotalfina

A crotalfina é um peptídeo sintético (Figura 1) produzido a partir da sequência do fator analgésico natural isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008). Este peptídeo possui massa molecular de 1534,6 g/mol e sequência de aminoácidos (<E F S P E N C Q G E S Q P C>) idêntica à cadeia γ da crotapotina, a subunidade não tóxica, não enzimática e acídica da crotoxina, a principal neurotoxina presente no veneno crotálico (AIRD et al., 1990; BON et al., 1989).

Este peptídeo apresenta potente e duradoura atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor aguda e crônica (BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012). Na hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2) em ratos, a crotalfina acarreta efeito antinociceptivo, quando administrada em baixas doses (0,008 a 0,2 μ g /kg), pelas vias sistêmica (oral e intravenosa) e subcutânea (intraplantar)

(KONNO et al., 2008). O efeito antinociceptivo da crotalfina é também observado no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e em modelos de dor crônica, como a dor neuropática decorrente da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008). Em todos os modelos, o efeito antinociceptivo da crotalfina é de longa duração, perdurando por até 3 dias nos modelos de nocicepção crônica e por até 5 dias nos modelos de hiperalgesia inflamatória.

Embora a estrutura química não se assemelhe com nenhum peptídeo opióide conhecido, os estudos realizados pelo nosso grupo indicam que a crotalfina apresenta efeito antinociceptivo do tipo opióide. Esta sugestão está baseada nos resultados experimentais mostrando a reversão do efeito antinociceptivo da crotalfina por antagonistas seletivos de receptores opióides do tipo κ e δ (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012; KONNO et al., 2008), administrados perifericamente da crotalfina incluem estudos *in vitro* demonstrando que, na vigência de sensibilização por PGE2 ou constrição do nervo isquiático de ratos, este peptídeo, da mesma forma que os agonistas opióides, alteram o estado conformacional dos receptores opióides presentes no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no nervo safeno isolado da pata de ratos, indicando a ativação destes receptores (ZAMBELLI, 2011). Estudos adicionais também demonstraram que a crotalfina ativa a via das MAP quinases (ERK1/2 e JNK) em neurônios do DRG, evento este que é dependente da pré-sensibilização com PGE2, da ativação do receptor opióide do tipo κ e da proteína quinase C ζ (ZAMBELLI, 2011). A crotalfina também apresenta outra característica comum aos fármacos opióides, ou seja, o seu efeito periférico, de longa duração, é detectado apenas na presença de inflamação ou lesão tecidual. Estes achados corroboram com dados da literatura que demonstram que os fármacos opióides possuem eficácia aumentada na vigência de inflamação (STEIN; LANG, 2009), decorrente do aumento da expressão de receptores opióides tanto em nervos periféricos quanto no DRG e na medula espinhal (CAHILL et al., 2003; ZAMBELLI, 2011).

Diferente dos fármacos opióides disponíveis na clínica, a crotalfina destaca-se pela ausência do desenvolvimento de tolerância ao efeito nociceptivo, após o uso prolongado (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008) e de alterações na motilidade gastrointestinal (RAE e CURY, comunicação pessoal), além de não induzir o desenvolvimento de hiperalgesia tardia (PEREIRA e CURY, comunicação pessoal) e alterações na atividade motora (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008). Estas características da crotalfina podem ser resultado da ausência de efeito deste peptídeo sobre o receptor opióide do tipo μ , pelo menos nas doses testadas e que apresentaram efeito antinociceptivo. De modo geral, os efeitos adversos observados com

opióides como a morfina, considerada o protótipo de fármaco opióide,, são atribuídos à ativação do receptor opióide do tipo μ (JONGKAMONWIWAT et al., 2003; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001)

É importante salientar que a crotalfina é efetiva em induzir antinocicepção em modelo de dor de câncer acarretado pela injeção intraplantar de células do tumor de Walker 256 em ratos (BRIGATTE et al., 2007). Neste modelo, a crotalfina, administrada por via oral, induz antinocicepção também de longa duração (2 dias), mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ e δ (BRIGATTE et al., 2012 submetido). Como mencionado anteriormente, apesar dos inúmeros efeitos da crotalfina frente a diversos tipos de modelos experimentais, incluindo modelos de dor crônica, não se conhece o efeito deste peptídeo sobre a dor óssea de origem neoplásica.

Figura 1 - Sequência de aminoácidos da Crotalfina

1.2 Neoplasia

Neoplasia significa “novo crescimento”. Classicamente, como proposto por Rupert Willis, em 1952 (ROBBINS; COTRAN, 2006) neoplasia é definida como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é excessivo e incoordenado, persistindo mesmo após o cessamento do estímulo desencadeador”. Câncer é o termo comum para todos os tumores malignos.

Clinicamente, as primeiras referências sobre neoplasias datam do ano de 1600 a. C., com a publicação de uma coletânea sobre doenças neoplásicas humanas. Hipócrates, na Grécia (400 a.C.) (BRENTANI, 2003c) foi quem primeiro descreveu a palavra “carcinos” e “carcinoma”, definindo o câncer como uma doença de mau prognóstico (BRENTANI, 2003c). Contudo, somente a partir do século XIX, os estudos sobre as neoplasias tornaram-se mais relevantes. Assim, Johannes Muller, em 1838 (SIRICA, 1989), mostrou que as neoplasias são caracterizadas pela presença de células anormais, sugerindo que adicionalmente às

observações clínicas dos pacientes, os tumores deveriam ser estudados histologicamente (SIRICA, 1989). Posteriormente, Rudolf Virchow, em 1863 postulou a doutrina da geração patológica das neoplasias, para explicar a origem do câncer (SIRICA, 1989; TAMOYO, 1987). Em 1914, Theodor Boveri propôs a teoria de que a célula tumoral origina-se de um tecido normal e as alterações que a caracterizam como células neoplásicas são inerentes à própria célula. Este mesmo pesquisador propôs ainda, por meio da teoria da mutação somática, que as neoplasias se originam de uma célula que apresenta alteração em seus cromossomos (MANCHESTER, 1995).

Estudos de biologia molecular têm mostrado que a origem do câncer está nas alterações moleculares que ocorrem nas células e que alterações genéticas determinam o desenvolvimento caracteristicamente desordenado das neoplasias (BRENTANI, 2003a; FURMANSKI et al., 1993). Atualmente, sabe-se que as alterações moleculares determinantes de uma neoplasia, ocorrem no DNA das células. Mutações na fita dupla hélice são detectadas, sendo estas alterações as responsáveis pela tumorigênese (BRENTANI, 2003e; ROCHA, 2003; SAMARA et al., 1992).

Classicamente, a neoplasia é dividida em benigna e maligna. A neoplasia benigna é aquela que não apresenta metástase. Este tipo de neoplasia só produz efeitos deletérios ao paciente caso bloqueie alguma passagem natural ou o suprimento de sangue a algum órgão vital, podendo tornar-se fatal quando se desenvolve na cavidade craniana ou intra-vertebral (por efeitos mecânicos), ou mesmo quando ocorre ulceração na pele ou mucosa intestinal, levando à hemorragia e infecções secundárias (BRENTANI, 2003a). Em geral, os tumores benignos podem ser removidos cirurgicamente, levando à cura do paciente. A neoplasia maligna caracteriza-se pelo crescimento descontrolado da massa tumoral, que pode vir a obstruir passagens naturais ou o suprimento sanguíneo para outros tecidos, e pela propriedade de se difundir e invadir outros órgãos (metástase). Essa difusão das células tumorais pode ocorrer via sistema linfático, circulação sanguínea ou por implante. O implante metastático tem a mesma propriedade invasiva, a mesma habilidade para sequestrar o suprimento sanguíneo e o mesmo crescimento descontrolado do tumor primário (GEIGER; PEEPER, 2009). O crescimento celular em um tecido, é um evento natural de alguns tipos celulares, com o objetivo de manter o equilíbrio entre células em crescimento, células diferenciadas e células mortas (HANNUN, 1993). O crescimento celular ocorre em várias etapas, iniciando-se pela sinalização celular e culminando com a mitose, a qual origina duas células filhas. São alguns tipos de proteínas responsáveis pelo controle bioquímico do crescimento celular: transdutores intracelulares do sinal, fatores de transcrição, fatores de crescimento e seus

receptores e ciclinas (ALEXANDRESCU et al., 2009; ALEXANDRESCU et al., 2008). Os fatores de crescimento iniciam a sinalização celular, podendo promover ou suprimir o crescimento celular (BRENTANI, 2003b). Fatores de crescimento mitogênico, tais como Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Neural (NGF) (ALEXANDRESCU et al., 2009; GRANÃ, 1995) promovem fosforilação e ativação de enzimas, como a fosfolipase C e o complexo proteína G. Estas proteínas são responsáveis pela transdução do sinal da membrana celular ao núcleo (MISHIMA et al., 2002; SAMARA et al., 1992). Uma vez ocorrida a sinalização, há ativação dos proto-oncogenes, tais como genes c-myc, c-fos e c-jun, os quais são importantes para a regulação da divisão celular. Estes genes agem como fatores de transcrição, regulando diretamente a expressão gênica (BRENTANI, 2003d; HEROLD et al., 2009). Em alguns casos, como por exemplo, no câncer de mama, há certa especificidade em relação aos fatores de crescimentos envolvidos na progressão tumoral (PATEL et al., 2011; PATEL et al., 2012)

Uma neoplasia se origina de um crescimento celular desordenado, provocado pela falta ou falha de proteínas que são responsáveis pelo controle da divisão celular. Este crescimento desordenado da célula não cessa, mesmo após a retirada do estímulo propagador. Além disso, a célula não responde aos estímulos regulatórios da proliferação celular. As mutações que ocorrem nos genes ou proto-oncogenes, transformando-os em oncogenes (genes cujos produtos estão associados com a transformação neoplásica), representam a principal causa de perda de responsividade da célula, promovendo instabilidade e alterações genéticas e, conseqüentemente, o desenvolvimento de tumores (BRENTANI, 2003d; ROBBINS; COTRAN, 2006). Estas mutações iniciam uma série de mudanças genéticas, que resultam no câncer, podendo ser gene-específica e tecido-específica (PEARSON, 1998). Uma vez transformados em oncogenes e, portanto, alterados, estes genes codificam proteínas também alteradas, ou seja, proteínas que apresentam deficiências em regular a divisão celular.

Várias linhagens de células tumorais são potencialmente capazes de crescer tanto na forma sólida como ascítica, dependendo do sítio onde são injetadas, do número de células administradas e da responsividade imunológica do hospedeiro (CULO et al., 1978). Os tumores sólidos são formados por dois compartimentos distintos, mas interdependentes: as próprias células tumorais (parênquima) e o estroma de sustentação, no qual estas células estão dispersas (ROBBINS; COTRAN, 2006). Todo tumor sólido, independente de sua origem ou tipo, requer o desenvolvimento do estroma, quando atinge o tamanho de 1 a 2 mm. Entre outros benefícios, o estroma proporciona a vascularização necessária para o suprimento de nutrientes, troca gasosa e eliminação de metabólitos (FOLKMAN, 1985).

A formação do estroma resulta da interação das células tumorais (e seus produtos) com diferentes sistemas do hospedeiro, particularmente a coagulação sanguínea e sistema fibrinolítico. Neste processo, vênulas e pequenas veias locais tornam-se altamente permeáveis, resultando em extravasamento de fibrinogênio e outras proteínas plasmáticas. Estas alterações acarretam a formação de gel de fibrina extracelular – estroma provisório. O estroma provisório também regula o influxo de macrófagos e, possivelmente, de outras células inflamatórias, ao mesmo tempo em que facilita a angiogênese e a migração de fibroblastos, componentes do estroma tumoral maduro – estroma de tecido conjuntivo (BARDOS et al., 1998; NAGY et al., 1989; NAGY et al., 1995). Em vários tumores, poucos dias após o transplante, ocorre angiogênese. A deposição de fibrina é uma característica regular do crescimento de tumores sólidos (BARDOS et al., 1998; NAGY et al., 1989, 1995). Ao contrário do tumor sólido, tumores ascíticos raramente tornam-se revestidos por um gel de fibrina e, como resultado, não tem estroma provisório. A injeção de células tumorais em cavidades, como a peritoneal, acarreta crescimento ascítico padrão, no qual células tumorais crescem como uma suspensão celular no fluido peritoneal, com aparente ausência do estroma conjuntivo. Assim, diferenças no metabolismo de fibrinogênio representam importante forma de distinção entre tumores sólidos e ascíticos (NAGY et al., 1995).

1.3 Neoplasia Óssea

As neoplasias ósseas são proliferações de células anormais nos ossos. Estas neoplasias podem ser não cancerosas (benignas) ou cancerosas (malignas). As neoplasias benignas são relativamente comuns, enquanto as malignas são raras. As neoplasias ósseas podem ser classificadas ainda, como primárias – tumores (benignos ou malignos) que se originam no próprio osso – ou metastáticas – cânceres originados em outros locais do corpo, os quais, a seguir, propagam-se ao osso. Há prevalência de tumores cancerosos primários em crianças, enquanto que em adultos, a incidência recai sobre tumores de origem metastática (HALVORSON et al., 2006).

Histologicamente, o tecido ósseo é constituído por células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e por material intercelular calcificado, a matriz óssea (ROBBINS; COTRAN, 2006). Osteócitos são células achatadas existentes no interior da matriz óssea, ocupando lacunas das quais partem canalículos. Estas células são essenciais para a manutenção da matriz óssea (ROBBINS; COTRAN, 2006). Outro tipo celular formador do tecido ósseo são os osteoblastos, responsáveis pela formação da parte orgânica da matriz óssea (colágeno e

proteoglicanos), localizados nas superfícies ósseas (ROBBINS; COTRAN, 2006). Os osteoclastos são células gigantes, móveis, extensamente ramificadas, com partes dilatadas que contém seis a cinquenta ou mais núcleos. Estes núcleos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo. A matriz óssea é constituída por uma parte orgânica e uma parte inorgânica. A parte orgânica consiste principalmente (95%) de fibras colágenas unidas entre si por pequena quantidade de substância fundamental amorfa (5%). A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea e é composta principalmente por íons cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita, além de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato, em pequenas quantidades (ROBBINS; COTRAN, 2006).

O mecanismo pelo qual uma neoplasia óssea se instala ainda não é bem estabelecido, porém, o crescimento neoplásico causa expansão do osso, havendo assim o rompimento do córtex e periósteo. A neoplasia caracteriza-se por lesão lítica, sem limite claramente definido e pela presença de osteogênese neoplásica, acarretando esclerose densa. A reação periosteal está frequentemente presente e tem aparência de "raios de sol" formando espículas ósseas, em ângulos retos com o eixo longitudinal do osso. Pode haver também o conhecido "triângulo de Codman", que representa o levantamento do periósteo, ocasionado pelo crescimento do tumor. A fosfatase alcalina é um marcador tumoral importante, uma vez que osteoblastos malignos liberam grande quantidade desta fosfatase. Há formação de tecido osteóide a partir das células malignas, com a presença de áreas de necrose e muitas mitoses atípicas (ROBBINS; COTRAN, 2006).

A dor é o sintoma mais comum da neoplasia óssea, sendo que cerca de 30 a 50% dos pacientes relatam dor moderada a severa e aproximadamente 75 a 95% dos pacientes com câncer ósseo em estágio avançado ou que apresentam metástase, tem a qualidade de vida alterada por fenômenos dolorosos (JIMENEZ-ANDRADE; MANTYH et al., 2010; MAO-YING et al., 2006)

As dores de câncer, em geral, são caracterizadas pela presença de hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor), alodinia (dor em resposta a estímulos não nocivos) e dor manifesta (REGAN; PENG, 2000).

A dor associada ao câncer pode ser causada pelo tumor primário ou suas metástases, pela terapia antineoplásica e/ou pelos métodos de investigação. O sofrimento dos doentes é produto da interação da percepção aversiva (dor) com a incapacidade física, isolamento social e familiar, preocupações financeiras e medo da mutilação e morte (PIMENTA et al., 1997).

Um dos mecanismos envolvidos na dor do câncer ósseo é a biossíntese de prostaglandinas, bem como a própria destruição óssea provocada pelo tumor (PIMENTA et

al., 1997). As prostaglandinas do tipo A e E estimulam células tumorais metastáticas. Além disso, há correlação entre a metástase óssea osteolítica e a ativação concomitante de osteoclastos e nociceptores (fibras A δ e C), tanto por prostaglandinas quanto por citocinas (PAYNE, 1997a)

Outro mecanismo proposto para a dor no câncer ósseo é a intensa atividade osteoclástica (CLOHISY; MANTYH, 2003; HALVORSON et al., 2006). Os osteoclastos são células multinucleadas de linhagem monocítica, sendo que estas células destroem o osso pela formação de um compartimento extracelular ácido decorrente de reabsorção óssea. Estas células, portanto, possuem papel significativo na perda óssea induzida pela neoplasia e contribuem para a etiologia da dor induzida pela neoplasia óssea (JIMENEZ ANDRADE; MANTYH, 2010; LIPTON et al., 2006). O compartimento extracelular ácido decorrente da reabsorção óssea osteoclástica, reduz o pH sensibiliza e/ou excita diretamente fibras sensitivas aferentes primárias no periósteo. Fatores de crescimento, citocinas, tais como IL 1, 6 e TNF e quimiocinas podem sensibilizar ou excitar estas fibras e/ou nociceptores (PATEL et al., 2011; PAYNE, 1997a; WOOLF et al., 1997). Ainda, a liberação de prótons induzida pelo tumor é particularmente importante na gênese da dor óssea acarretada pela neoplasia (JIMENEZ-ANDRADE; MANTYH et al., 2010). Estudos têm mostrado ainda, que as células tumorais secretam diversas substâncias nociceptivas, dentre elas, citocinas, fatores de crescimento epidermal e fatores de crescimento derivado de plaquetas, que excitam os nociceptores, provocando dor. Além disso, os macrófagos, que representam 20 a 30% das células em um processo neoplásico (MCBRIDE, 1986), secretam TNF, prostaglandinas, IL₁ e NGF que também excitam ou sensibilizam os neurônios aferentes primários (JIMENEZ ANDRADE; MANTYH, 2010). Além dos mecanismos descritos acima, a destruição óssea induzida pela neoplasia promove reorganização neuroquímica na medula espinhal, acarretando sensibilização central, observada frequentemente nos estágios dolorosos mais persistentes. Neste sentido, nos segmentos da medula espinhal que recebem impulsos provenientes da porção óssea acometida pela neoplasia, foi observado, em modelos experimentais, hipertrofia dos astrócitos e proteína cFOS em população de neurônios localizados em lâminas mais profundas da medula espinhal (SCHWEI et al., 1999). Estas alterações, em conjunto, estão envolvidas no aparecimento e na manutenção da dor proveniente da neoplasia óssea (HONORE et al., 2000; MANTYH et al., 2002). Além da dor, o crescimento do câncer ósseo induz hipercalcemia, anemia, aumento a susceptibilidade a infecções, fraturas esqueléticas, compressão e instabilidade medular, além de diminuição da mobilidade. Esses fatores em

conjunto, contribuem para diminuição do estado funcional, qualidade de vida e sobrevida do paciente (JIMENEZ ANDRADE; MANTYH, 2010; MANTYH et al., 2002)

1.4 Controle da dor neoplásica

A dor, nos estágios mais avançados do câncer, é um problema grave que interfere com a qualidade de vida dos pacientes, sendo a alodinia, hiperalgesia e dor manifesta os fatores preponderantes para a incapacitação destes pacientes (BRASIL, 1991, 1998, 2001, 2011). Portanto, o controle adequado e eficiente da dor de câncer, por meio do desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos, e a utilização de terapias alternativas tem sido preconizado. Neste sentido, é grande o interesse científico e médico na padronização de novos modelos animais de dor de câncer (PIMENTA et al., 1997; ROBBINS; COTRAN, 2006), para auxiliar na melhor compreensão dos fenômenos nociceptivos e no desenvolvimento de terapias analgésicas mais eficazes.

A terapêutica preferencial preconizada para o alívio da dor, é o tratamento do câncer em si, sempre que possível. Porém, o controle da dor pode exigir medidas adicionais, tais como cirurgias, radioterapia e quimioterapia (PIMENTA et al., 1997). O uso de medicamentos analgésicos, medidas de apoio psicoterápicas e fisioterápicas, bloqueios nervosos, secção de vias sensitivas e estimulação das vias supressoras da nocicepção, são complementares à terapêutica antineoplásica (BRASIL, 1991, 1998, 2001, 2011; BUGA; SARRIA, 2012).

Analgésicos, anti-inflamatórios não esteroidais, opióides fracos e opióides fortes, nesta sequência, são utilizados para o tratamento de dores de intensidade crescente. A estes analgésicos podem ser associadas drogas adjuvantes como, por exemplo, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes. O ácido acetilsalicílico, codeína e morfina são os analgésicos padrões desta proposta terapêutica (PIMENTA et al., 1997; BRASIL, 2001; VIELHABER; PORTENOY, 2002; WOOTTON, 2004). Os analgésicos opióides são os fármacos mais utilizados na terapêutica de câncer, dada a eficácia e efetividade destas drogas no controle da dor de câncer (VIELHABER; PORTENOY, 2002; WOOTTON, 2004). Muitos estudos sugerem que analgésicos opióides, além de aliviar a dor induzida pelo tumor, interferem com a progressão da doença. Contudo, os efeitos adversos, incluindo dependência física e principalmente, tolerância farmacológica, têm limitado a utilização desta classe de analgésicos (PORTENOY; LESAGE, 1999). Entre os opióides fracos, estão a codeína, dextropropoxifeno, diidrocodeína e tramadol. Os opióides fortes ou potentes são a

buprenorfina, diamorfina, fentanil, alfentanil, hidromorfona, metadona, oxicodona e morfina; (PORTENOY; LESAGE, 1999; TWYLCROSS; FAIRFIELD, 1992; WOOTTON, 2004). Apesar da existência de várias drogas com propriedades similares à morfina, não foi descrita ainda, outra substância clinicamente superior a este opióide no alívio da dor (REISINE et al., 1996)

Independente do tipo de dor, a ação analgésica dos opióides pode ser atribuída a: a) inibição da adenilatociclase; b) inibição indireta dos canais de cálcio; c) hiperpolarização por entrada de potássio nos neurônios (BRASIL, 1991, 1998, 2001, 2011). Adicionalmente, os opióides reduzem a liberação pré-sináptica de GABA (CALIGNANO et al., 2000; CHRISTIE et al., 2000). Apesar deste amplo mecanismo de ação, o uso contínuo de opióides induz ao aparecimento de efeitos adversos, o que representa um dos maiores problemas desta modalidade terapêutica. Dentre estes efeitos indesejáveis estão incluídos náuseas, prurido, vômitos, fadiga, constipação, depressão respiratória, tolerância, dependência e efeitos imunossupressores (DELLEMIJN et al., 1998; DWORKIN et al., 2003; TSAI; WON, 2001; YEAGER et al., 1995)

Atualmente, são conhecidas pelo menos cinco famílias de receptores opióides, os receptores *mu* (μ), *delta* (δ), *kappa* (κ), *epsilon* (ϵ) e *sigma* (σ). Uma sexta classe de receptores denominada nociceptina/orfanina FQ (receptores NOP), cujo ligante natural é a nociceptina, tem sido proposta como integrante da família dos receptores opióides (BARLOCCO et al., 2000). Os principais efeitos analgésicos dos opióides são mediados pelos receptores μ , κ e δ . A morfina, o protótipo dos analgésicos opióides, liga-se, preferencialmente, a receptores do tipo μ , porém, infusões crônicas ou tratamento com doses elevadas deste opióide, alteram sua seletividade pelos receptores μ , produzindo recrutamento de outros tipos de receptores (MELCHIORRI et al., 1992; NEGRI et al., 1993; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001)

Uma outra classe de drogas que têm sido atualmente empregada no tratamento de neoplasias ósseas são os bisfosfonatos (Bp's). Estes compostos são extensivamente utilizados no tratamento de várias doenças ósseas, destacando-se a doença de Paget (doença esquelética localizada, monostótica ou poliestótica, caracterizada por aumento da remodelação óssea, comprometendo principalmente vértebras, ossos longos, pélvis e crânio), a hipercalcemia maligna, a osteoporose e a doença metastática e osteolítica. Os BP's agem como inibidores da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (BERENSON, 1996; ERNST, D. S. et al., 1992; HORTOBAGYI et al., 1996; LOPEZ-OLIVO et al., 2012; PUROHIT et al., 1994). Os

bisfosfonatos formam uma classe de substâncias químicas que apresenta uma ligação fosfato-carbono-fosfato em sua estrutura. Os BP's são análogos químicos do ácido pirofosfórico, que no organismo se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. Os bisfosfonatos são seus análogos sintéticos, onde o átomo central de oxigênio é substituído por um de carbono. Essa modificação faz com que os BP's sejam mais resistentes à degradação enzimática e possuam uma meia-vida biológica maior, suficiente para influenciar o metabolismo ósseo (FERNANDES et al., 2005; LICATA, 1997; NYANGOGA et al., 2010). Os mecanismos pelos quais os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea incluem a inibição da formação e/ou do recrutamento de osteoclastos a partir de células precursoras imaturas (HUGHES et al., 1995), inibição da ativação de osteoclastos e inibição da atividade de osteoclastos maduros (DRAKE et al., 2008; HUGHES et al., 1995). Usualmente, o tempo de vida dos osteoclastos, estimado a partir de estudos histológicos, é de duas a quatro semanas *in vivo*, e de no máximo duas semanas *in vitro*. Os bisfosfonatos aumentam a apoptose de osteoclastos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, reduzindo este tempo de vida (HUGHES et al., 1995).

Os bisfosfonatos podem ser divididos em dois subgrupos, dependendo da presença ou não de nitrogênio. Pesquisas recentes sugerem que os primeiros bisfosfonatos usados clinicamente e não-aminados - etidronato e clodronato - são metabolizados em análogos citotóxicos de ATP (FRITH et al., 1997) sendo estes os responsáveis pela inibição da atividade dos osteoclastos. Por outro lado, os bisfosfonatos aminados, mais novos e potentes, como o pamidronato, ibandronato, alendronato e zoledronato, induzem apoptose de osteoclastos por inibir a enzima farnesildifosfato sintase, prevenindo a isoprenilação (principalmente a geranilgeranilação) de pequenas proteínas que se ligam a GTP, as quais são essenciais para o tráfego de vesículas e manutenção da integridade do citoesqueleto (HUGHES et al., 1995; JAGDEV; COLEMAN et al., 2001; JAGDEV; PUROHIT et al., 2001). A geranilgeranilação é a ligação de um lipídio de 20 carbonos (geranilgeranil) a certas proteínas, incluindo proteínas-G regulatórias chaves, tais como Rac, Rho, Cdc-42, e vários membros da família Rab. Este processo é necessário para ancorar essas proteínas na membrana plasmática ou em membranas intracelulares. A ausência dessa ancoragem resulta em bloqueio ou mudança de eventos sinalizadores que, em última instância, levam à indução das caspases, provavelmente caspase-3 e a apoptose (BENFORD et al., 2001; COXON et al., 1998; LUCKMAN et al., 1998; LUCKMAN et al., 2005).

Várias pesquisas têm demonstrado que os bisfosfonatos também exercem efeitos em outras células, além dos osteoclastos, incluindo células tumorais (FERNANDES et al., 2005).

Estudos *in vitro* têm mostrado que os bisfosfonatos têm ação citostática, induzem apoptose, inibem a adesão e a invasão de células tumorais, interferem no processo metastático, têm efeito na secreção de fatores de crescimento e citocinas e inibem a angiogênese tumoral. Apesar da caracterização dos efeitos dos bisfosfonatos *in vitro*, a caracterização da ação destes fármacos *in vivo* ainda é escassa (GREEN, 2000).

A neoplasia óssea é acompanhada de crescimento de células tumorais em tecidos moles adjacentes. Estudos tem mostrado que os bisfosfonatos inibem essa proliferação adjacente, contribuindo para o efeito antitumoral dessa classe de drogas (LIPTON, 2006a; b; LIPTON et al., 2006). Tem sido sugerido que este efeito tumoricida dos bisfosfonatos ocorre pela redução dos níveis circulantes do fator de crescimento endotelial vascular, o qual é um componente essencial no fenômeno de angiogênese (LIPTON et al., 2008). Estudos clínicos têm sido realizados com o intuito de determinar os efeitos dos bisfosfonatos na dor induzida pela neoplasia óssea, crescimento tumoral e a metástase advinda do câncer ósseo (JIMENEZ-ANDRADE; MANTYH et al., 2010; LOPEZ-OLIVO et al., 2012). Neste sentido, os bisfosfonatos tornaram-se importantes no tratamento de doenças ósseas, tanto benignas quanto malignas (LOPEZ-OLIVO et al., 2012). Esses fármacos são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Além disso, eles são utilizados no tratamento de metástases ósseas, uma vez que reduzem a quantidade e a taxa de complicações esqueléticas em cânceres em estágio avançados (BERENSON, 1996; HORTOBAGYI et al., 1996; LOPEZ-OLIVO et al., 2012). Estas substâncias também aliviam a dor óssea, com consequente aumento da qualidade de vida do paciente (ERNST, D. S. et al., 1992; PUROHIT et al., 1994)

O tratamento da dor de câncer ósseo inclui também a utilização conjunta de drogas não opióides e fármacos opióides. Esse tratamento pode ter efeito dose-excedente (dose-sparing effect), permitindo menores doses do medicamento opióide (BRASIL, 2011, 1991, 2001). Outro exemplo de tratamento adjuvante é a utilização de anti-inflamatórios não hormonais (AINH), que agem por inibição da via das ciclooxigenases (COX), inibindo a síntese de prostaglandinas (MOUEDDEN; MEERT, 2007). Estes fármacos são efetivos contra dor produzida por lesão lenta e prolongada no tecido (BRASIL, 1991, 1998, 2001, 2011). Tem sido descrito que a efetividade destes analgésicos é potenciada por opióides (SAITO et al., 2005).

Trabalhos recentes têm evidenciado a importância e a necessidade de desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de câncer ósseo. Neste sentido, agonistas canabinóides, particularmente de receptores canabinóides do tipo CB2, têm sido utilizado

experimentalmente no tratamento deste processo patológico. Os resultados tem mostrado que os agonistas canabinóides aliviam a dor, aumentam a sobrevida dos animais, além de melhorar a estrutura óssea e inibir o crescimento da célula tumoral (LOZANO-ONDOUA et al., 2012).

Ainda, com relação ao alívio da dor óssea, tem sido observado que a administração de drogas que inibem ou bloqueiam o fator de crescimento de nervo (NGF), diminuem a formação de neuroma e o “sprouting” de nervos característicos de câncer ósseo, favorecem a analgesia (BLOOM et al., 2011; JIMENEZ-ANDRADE; BLOOM et al., 2010).

1.5 Modelos experimentais para indução de neoplasia óssea

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos objetivando a compreensão da fisiopatologia do câncer ósseo, bem como o controle da dor neste tipo de neoplasia. Estes modelos, desenvolvidos em ratos e camundongos, são padronizados a partir da injeção intraóssea de diversas linhagens de células tumorais.

Uma grande variedade de linhagens celulares tem sido utilizada nestes estudos. Dentre estas linhagens, destacam-se o carcinoma de Walker 256, células de carcinoma mamário (MRMT-1), fibrossarcoma (2472), carcinoma mamário murino (4T1), hepatocarcinoma (HCa -1) e melanoma murino (B16) (JIMENEZ-ANDRADE; MANTYH, 2009; MAO-YING et al., 2006). Estes estudos têm favorecido a avaliação dos fenômenos nociceptivos que acompanham os processos de neoplasias ósseas e possibilitado a análise das alterações ósseas acarretadas pelo desenvolvimento da neoplasia. A análise destas alterações tem sido realizada por meio do uso de técnicas histopatológicas e radiográficas. Ainda, por meio de estudos imunohistoquímicos, as modificações neuroquímicas que ocorrem no corno dorsal da medula espinhal e o envolvimento das células da glia no processo nociceptivo ocasionado pela indução de câncer ósseo, têm sido determinados (HONORE et al., 2000; SCHWEI et al., 1999)

Schwei et al. (1999) desenvolveram o primeiro modelo murino de câncer ósseo, que contribuiu sobremaneira para a compressão da fisiopatologia deste tipo de câncer, além de propiciar o estudo de novos agentes terapêuticos para o seu controle. Neste estudo, o câncer ósseo foi obtido por meio da inoculação de células osteolíticas na região medular do fêmur de camundongos (SCHWEI et al., 1999). O confinamento do tumor no espaço medular do fêmur mimetiza as condições patológicas de pacientes com neoplasia óssea primária e metastática. A linhagem osteolítica utilizada neste estudo acarretou destruição óssea marcante (CLOHISY;

MANTYH, 2003). Além disso, estudos histopatológicos evidenciaram a similaridade encontrada entre o modelo proposto e a neoplasia óssea osteolítica observada em humanos (CLOHISY et al., 1995; SCHWEI et al., 1999). É importante salientar que neste modelo, foi observado, nos animais, alodinia, dor manifesta e comportamentos nociceptivos específicos e diretamente relacionados ao intenso processo da destruição óssea. Estes fenômenos são também observados em pacientes com neoplasia óssea. Nestes pacientes, os fenômenos dolorosos são descritos como episódios intermitentes de dor severa que ocorrem tanto espontaneamente, quanto devido a algum movimento da área óssea afetada, ou ainda, devido ao próprio peso do paciente (BON et al., 1989; CLOHISY; MANTYH, 2003; CLOHISY et al., 1995; HONORE et al., 2000; JIMENEZ-ANDRADE; MANTYH et al., 2010; LUGER et al., 2002; SCHWEI et al., 1999). Estudos experimentais mostraram ainda, que a injeção de células tumorais osteolíticas na tíbia, úmero e calcâneo de camundongos também induz lesão óssea, bem como o desenvolvimento de fenômenos nociceptivos relacionados ao câncer ósseo (JIMENEZ ANDRADE; MANTYH, 2010; MAO-YING et al., 2006).

Adicionalmente a estes modelos, Mao-Ying et al. (2006) propuseram um modelo de dor de câncer induzido pela injeção intramedular, na tíbia de ratas, de células do tumor de Walker 256 (MAO-YING et al., 2006). O carcinoma de Walker 256 é uma neoplasia espontânea de ratos, identificada na mama de uma rata albina prenhe, por George Walker, em 1928 (EARLE, 1935). O próprio investigador iniciou a manutenção do tumor, implantando-o em mamas de ratas. Desde então, o tumor têm sido mantido por transplantes sucessivos ou em culturas de células *in vitro*. O tumor de Walker 256 é capaz de se desenvolver na forma sólida ou ascítica e possui capacidade de disseminação, tanto por via linfática, como hematogênica, dependendo da via de inoculação (CARR et al., 1980; MATTOS et al., 1980). Desta forma, o tumor pode se desenvolver diferentes locais, como no cérebro (MORIOKA et al., 1992), cavidade peritoneal (ROSA et al., 1993), tecido subcutâneo (MARIA et al., 1994), muscular (SOARES et al., 1994), entre outros. As células deste tumor assemelham-se a leucócitos, fato este caracterizado com marcadores imunohistoquímicos de macrófagos (SIMPKINS et al., 1991), e comportam-se biologicamente como um linfoma/leucemia-simile. Durante seu crescimento, observa-se o surgimento, na massa tumoral, de infiltrado inflamatório, composto principalmente de células das linhagens monocítica (macrófagos), linfocítica, “natural killer” (NK) e granulocítica. Já na região das metástases, há maior incidência de células mononucleares (MORIOKA et al., 1992; SIMONY et al., 1991).

No modelo proposto por Mao-Ying et al., 2006, a injeção do tumor acarretou o desenvolvimento dos fenômenos nociceptivos característicos da dor de câncer ósseo.

Contudo, o efeito de drogas capazes de interferir com o desenvolvimento do tumor ou com os fenômenos nociceptivos, não foram investigados.

*

*

*

Como mencionado, a terapêutica usual para o controle da dor e regressão neoplásica óssea é ainda ineficaz, o que torna de extrema relevância o desenvolvimento de novos modelos experimentais para o estudo de câncer ósseo e de seu controle. Ainda, a descoberta de novos agentes terapêuticos para o controle da dor deste tipo de câncer tem sido objeto de intensas pesquisas experimentais.

Baseado nos dados mostrando que a crotalina induz potente efeito antinociceptivo, de longa duração, em diferentes modelos experimentais de dor aguda e crônica, torna-se importante a avaliação desta substância sobre a dor óssea induzida pela inoculação das células tumorais.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi padronizar um modelo de dor óssea induzido em ratos por meio da inoculação de células do tumor de Walker 256 na cavidade medular do fêmur dos animais e avaliar o efeito de diferentes substâncias, incluindo a crotalina, no controle da dor. Os objetivos específicos foram:

- a) Padronizar o modelo de dor de óssea, em ratos, acarretado pela injeção de células do tumor de Walker 256 no fêmur dos animais avaliando:
 - ✓ o desenvolvimento e progressão da neoplasia óssea;
 - ✓ os fenômenos nociceptivos (hiperalgesia, alodinia e dor espontânea) causados pela injeção das células tumorais;
 - ✓ o potencial de metastização do tumor;
- b) Avaliar o possível efeito antinociceptivo da crotalina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 160 a 180 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Estes animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} + 1$) e ciclo claro-escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA / Protocolo número 32 nas fls 55 do livro 02 – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan – CEUAB / Protocolo número 437/07. Todos os procedimentos obedeceram às normas propostas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983)

3.2 Planejamento geral

Para a padronização do modelo de dor óssea induzida pela implantação das células tumorais os animais foram injetados, por via intraóssea, com suspensões contendo células do carcinoma de Walker 256. A instalação dos fenômenos nociceptivos e a implantação do tumor foram analisadas em diversos períodos de tempo após a inoculação das células. Para a caracterização do desenvolvimento do tumor, foram realizadas análises histopatológicas, exame radiográfico, tomográfico e cintilografia óssea. Parâmetros como sobrevida, evolução ponderal e consumo de água e ração pelos animais foram também analisados. Uma vez que o a implantação das células no fêmur dos animais pode promover metástases, foi avaliada, neste estudo, por meio da análise histopatológica de diversos tecidos, a presença de células tumorais em outros órgãos, além do tecido ósseo.

Para avaliação da nocicepção causada pelo processo de implantação das células tumorais, foi investigada a presença de hiperalgesia, alodinia, dor manifesta e incapacitância. Para avaliar a contribuição da inflamação induzida pela injeção das células tumorais sobre a gênese dos fenômenos nociceptivos, foi utilizada a indometacina, inibidor da ciclooxigenase. Ainda, uma vez que drogas opióides são amplamente utilizadas para o controle da dor de câncer, foi analisado o efeito antinociceptivo da morfina neste modelo experimental de dor óssea. Foi também investigado o efeito antinociceptivo do zoledronato, um bisfosfonato usado

na clínica médica como inibidor da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, e da gabapentina, anticonvulsivante utilizado como analgésico em pacientes com câncer ósseo.

Para avaliação do efeito da crotalfina nesse modelo de dor óssea, o peptídeo foi administrado em diferentes doses, por via oral, no 14º dia após a implantação das células tumorais. Os mecanismos envolvidos no efeito da crotalfina foram investigados por meio da utilização de antagonistas seletivos de receptores opióides. Além disso, o possível desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo, após o tratamento prolongado com a crotalfina, foi também avaliado.

Ainda, uma vez que os métodos para avaliação da sensibilidade dolorosa presentemente utilizados, empregam resposta motora, tornou-se necessário a determinação da atividade geral dos animais por meio do teste do campo aberto, para avaliar o efeito da implantação das células.

3.3 Obtenção e manutenção das células do tumor de Walker 256

As células de tumor de Walker 256 foram cedidas pelo Prof. Dr. Rui Curi, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O animal portador do tumor foi eutanasiado e o tecido tumoral foi retirado, colocado em placa de Petri contendo salina 0,9%. Em seguida, o tumor foi cortado em partes menores e transferido para um béquer contendo salina. O material foi triturado com tesoura de corte fino, para fragmentação da massa tumoral. A seguir, este material foi filtrado em gaze e o líquido coletado em um béquer. Todos os procedimentos foram realizados em gelo. O material do béquer foi transferido para tubos de plástico de 50 mL e centrifugado a 4 °C, por 10 minutos, a 1200 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em salina 0,9%. Para contagem de células, a suspensão foi diluída (1:100) em salina. Uma alíquota (200 µL) foi retirada e colocada em um tubo de ensaio contendo 200 µL de corante azul de Tripan 1%. A viabilidade celular foi determinada por meio da contagem do número de células, em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer. Foram consideradas viáveis as células refringentes à luz. Foram utilizadas amostras que apresentaram viabilidade celular maior ou igual a 80%.

Após a contagem do número de células, um mL da suspensão, contendo 1×10^7 células, foi injetado, por via intraperitoneal, no flanco direito dos ratos, para obtenção de tumor líquido (ascite).

3.4 Procedimento cirúrgico para implantação para injeção das células tumorais no fêmur de ratos

Os animais foram anestesiados com isoflurano e o fêmur foi exposto, por meio de seção da pele e musculatura. Foi realizada osteotomia, com auxílio de agulha hipodérmica (27 g x 13 mm/ 13x4 diâmetro externo da agulha 0,40 mm). A seguir, as células do tumor de Walker 256 (4×10^6) foram injetadas no espaço intramedular ósseo, utilizando seringa Hamilton de 50 μ L. A osteotomia óssea foi restaurada com adesivo de etil-cianoacrilato e a incisão da musculatura e da pele foi suturada em camadas, com fio de seda (4-0). Foi utilizado como controle, o membro posterior direito dos animais, que foi submetido ao procedimento cirúrgico, sendo, porém, injetada apenas solução salina estéril. Outro grupo controle foi constituído por animais onde o membro posterior esquerdo foi submetido apenas à osteotomia sem administração das células. Neste experimento, o membro posterior contralateral direito (controle) não foi submetido à lesão óssea. É importante mencionar que este último grupo controle foi utilizado somente para verificação do possível efeito nociceptivo da osteotomia.

3.5 Análise Histopatológica (microscopia de luz)

Para as análises histopatológicas, os animais foram eutanasiados por saturação de gás carbônico, no 1º, 3º, 7º e 14º dias após a injeção das células tumorais ou solução salina estéril.

Os órgãos (baço, rins, pulmões, fígado e fêmur) e os fêmures foram removidos e fixados por 4 horas em solução de Boin. Com relação ao fêmur, após fixação em Boin, esses ossos foram imersos em solução de ácido fórmico 5%, por um período de 10 dias, para a descalcificação do material.

Após esta etapa, o material foi imerso em álcool, para desidratação dos tecidos. Os cortes foram inclusos em parafina. Este material foi cortado com navalha de aço (micrótomo) sendo realizada posteriormente, a montagem e coloração das lâminas. O material foi fixado em formol 10%, desidratado em álcool etílico, em concentrações crescentes (70% até álcool absoluto), diafanizado em xilol, impregnado por parafina líquida e, finalmente, incluído em parafina. Os blocos de parafina, de forma regular, foram cortados em micrótomo, obtendo-se cortes de 5 μ m de espessura, os quais foram então, corados pela hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

3.6 Procedimento anestésico para os exames de imagem

Para os procedimentos de radiografia e imagens no Micro-PET-SPECT- CT, os animais foram anestesiados com solução composta por xilazina, Anasedan® (VetBrands, Paulínia, SP., Brasil) 20 mg/mL e cloridrato de quetamina, Dopalen® (VetBrands, Paulínia, SP, Brasil) 100 mg/mL, na proporção de 1:1, na dose de 1 µL/g ou com mistura de 3 % de isoflurano em oxigênio.

3.7 Exame radiográfico

Os exames radiográficos foram realizados no Serviço de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Para o exame dos membros inferiores, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, no caso da projeção médiolateral direita, ou em decúbito lateral esquerdo, no caso da projeção médiolateral esquerda ou em decúbito dorsal, no caso da projeção crâniocaudal.

As técnicas radiográficas baseiam-se em métodos que relacionam a quilovoltagem e a miliamperagem-segundo com a espessura da região a ser radiografada. Os exames radiográficos foram realizados em aparelho de radiodiagnóstico, marca RAY-TEC, Brasil, modelo RT 500/125, de 500 mA e 125 kV, comando com sistema microprocessado, gerador retificado com silício em onda completa, mesa radiológica com grade antidifusora e *Bucky tipo recipromatic* ampola de Raios-X (TOSHIBA, Japão) de anodo giratório. A aquisição das imagens foi realizada através do sistema de radiografia computadorizada, utilizando-se da placa de imagem (IP Cassette type CC, FUJIFILM, Japão, 18 x 24cm). As imagens foram processadas por meio de leitora FUJIFILM - FCR Capsula X, FUJIFILM, Japão, e manipuladas digitalmente através do software do computador da estação de trabalho (CR - IR 348/CR - IR 346CL mainsoft-B V4.1.0001 Lite, FUJIFILM, Japão). As imagens foram enviadas via PACs (Synapse – FUJIFILM, Japão), que é um sistema que proporciona o armazenamento e comunicação de imagens geradas por equipamentos médicos, e foram analisadas por meio de monitor médico (Planar Systems, Inc, EUA) de alta definição.

3.8 Micro–PET-SPECT- CT

3.8.1 Aquisição de imagens SPECT/CT

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de 3 % de isoflurano em oxigênio e 74 MBq (2 mCi) do radiofármaco ^{99m}Tc -MDP, diluído em 100 μL de solução salina, foi administrado pela veia caudal dos animais. Duas horas após a administração do radiofármaco, os animais foram anestesiados e mantidos sob efeito da mistura de isoflurano, posicionado em decúbito ventral e as imagens foram adquiridas utilizando matrix 60x60 ou pinhole de 5 furos e 12×10^3 contagens/projeção. Posteriormente imagens tomográficas (CT) foram obtidas em campo de visão máximo de 9,3 x 9,7 cm. Todas as imagens foram adquiridas em equipamento Triumph Trimodality (Gamma Medica-Ideas Inc., Sherbrooke, Canadá).

3.8.2 Aquisição de imagens PET/CT

O processo inicial de manipulação dos animais foi idêntico ao descrito anteriormente, exceto que foram administrados 37MBq (1 mCi) do radiofármaco ^{18}F FDG e foram aguardados 60 minutos antes do início da aquisição da imagem, utilizando anel de detectores de 1536 detectores LYSO e LGSO, com dimensões de 2x2x12 mm^3 . Posteriormente imagens tomográficas (CT) foram obtidas em campo de visão máximo de 9,3 x 9,7 cm.

3.8.3 Processamento de imagens SPECT/CT e PET/CT

As imagens foram reconstruídas utilizando o método OSEM, com 5 e 20 iterações para o SPECT e PET, respectivamente. As 512 projeções adquiridas na tomografia computadorizada foram reconstruídas pelo método FBP (retroprojeção filtrada). As imagens passaram por processo de fusão com auxílio do software Osirix (EUA).

3.9 Determinação da Evolução Ponderal

Os animais foram pesados em balança específica com função animal, imediatamente antes da cirurgia e no 1º, 3º, 7º e 14º dias após a injeção das células tumorais ou de salina. É

importante salientar que um grupo controle adicional foi constituído por animais não tratados ou e não manipulados (naive).

3.10 Avaliação da sobrevida

Os animais injetados com as células do tumor de Walker 256 foram observados desde o momento da cirurgia para implantação das células tumorais, até o óbito espontâneo. O grupo controle foi composto por animais injetados com salina intraóssea.

3.11 Avaliação do Consumo de Água e Ração

Para esta avaliação os animais foram colocados individualmente, em gaiolas metabólicas, por um período de 24 h. Quinhentos gramas (500 g) de ração e 100 mL de água, para cada animal, foram colocados nas gaiolas. Após o período de 24 h, a ração presente na gaiola, foi pesada. Foi também determinado o volume de água consumido pelos animais, neste período.

3.12 Avaliação da sensibilidade dolorosa

3.12.1 Determinação da hiperalgesia

Para avaliação da hiperalgesia, foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (RANDALL; SELITTO, 1957) (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (1957).

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação.

Este teste foi aplicado antes e em diversos tempos após a injeção das células tumorais, na presença ou ausência dos diferentes tratamentos farmacológicos (item 3.14).

3.12.2 Determinação da alodinia

Foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado às patas do rato, segundo método descrito por Chaplan et al. (1994), modificado. Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas destes animais. Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Aesthesiometer Semmer-Weinstein, Stoelting Co., E.U.A). A calibração dos filamentos é definida como $\log_{10}$ (gramas x 10000), tendo os seguintes valores (o valor em gramas está entre parênteses): 3,61 (0,407 g); 3,84 (0,692 g); 4,08 (1,202 g); 4,17 (1,479 g); 4,31 (2,041 g); 4,56 (3,630 g); 4,74 (5,495g); 4,93 (8,511 g); 5,07 (11,749 g) e 5,18 (15,136 g). Cabe ressaltar que os filamentos com peso superior à 15,136 g não foram empregados nos estudos de alodinia. Os filamentos foram aplicados, um a um, perpendicularmente, sob a área plantar de ambas as patas posteriores, sendo mantidos por um período de 8 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 2,041 g. O filamento capaz de induzir a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para eliciar a resposta (100% de resposta). Na ausência de resposta ao filamento inicial (2,041 g), a apresentação dos filamentos foi realizada de forma ascendente, até a observação de duas respostas consecutivas para um mesmo filamento. O filamento capaz de induzir a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para induzir a resposta (100% de resposta) (CHAPLAN et al., 1994). Na ausência de resposta ao maior estímulo (15,135 g), este filamento foi considerado como valor de corte. Esta forma de apresentação dos filamentos minimiza o risco de habituação do animal à resposta (MILLIGAN et al., 2000). Os resultados foram representados pela média dos valores absolutos obtidos. (MILLIGAN et al., 2003).

Este teste foi aplicado antes e em diversos tempos após a injeção das células tumorais, na presença ou ausência dos diferentes tratamentos farmacológicos (Seção 3.14).

3.12.3 Avaliação de nocicepção manifesta

Os ratos foram observados para determinação de nocicepção manifesta, em diversos tempos após a injeção das células tumorais. Para a observação dos sinais que caracterizam esse fenômeno, os animais foram colocados, um a um, em uma caixa de plástico transparente. Após o período de habituação de 30 minutos, os ratos foram observados durante 10 minutos,

determinando-se a duração do tempo (em segundos) de lambida e de levantamento (“posição de guarda”) da pata. As atividades de lambida e levantamento da pata, realizadas como parte do comportamento normal de “grooming” dos animais, não foram consideradas.

3.12.4 Avaliação da incapacitância

Foi utilizado o teste de incapacitância (Linton Instrumentation, Norfolk, UK) para a determinação da distribuição do peso corpóreo dos animais. Este teste foi aplicado para verificar a incapacitância dos animais que foram injetados com as células do tumor de Walker 256. Neste teste, os animais permaneceram, durante o período de 5 segundos, sob uma plataforma ligada a um sensor, o qual mensura o peso distribuído entre as patas posteriores (direita e esquerda). O resultado é expresso como delta da diferença do peso medido entre a pata direita (injetada com solução salina estéril, controle) e esquerda (injetada com 4×10^6 células do tumor de Walker 256).

Os ratos foram adaptados, previamente, na plataforma, por um período de 5 dias antes do teste. Este teste foi aplicado antes e em diversos tempos após a injeção das células tumorais, na presença ou ausência dos diferentes tratamentos farmacológicos (Seção 3.14).

3.13 Avaliação da atividade geral dos animais

Uma vez que estudamos uma substância antinociceptiva, e que os métodos para avaliação da sensibilidade dolorosa presentemente utilizados, empregam uma resposta motora, torna-se necessário a determinação da atividade geral dos animais na dose determinada para os estudos, que foi a dose de 8 $\mu\text{g/kg}$ de crotalfina.

Para a avaliação da atividade geral dos ratos foi utilizado o método do Campo Aberto, de acordo com o proposto por Broadhurst (BROADHURST, 1960). O campo aberto consiste em uma arena de cartolina plastificada, com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 32,5 cm de altura e base circular de 97 cm de diâmetro, pintada de branco.

O chão da arena é subdividido em 19 regiões aproximadamente iguais, demarcadas por 3 circunferências concêntricas, intersectadas por segmentos de retas radiais.

Os animais foram colocados individualmente na arena e observados por um período de três minutos. Os parâmetros avaliados foram:

a) frequência de locomoção (LO): cada unidade de medida corresponde ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões do chão da arena;

b) frequência de levantar (LE): cada unidade de medida corresponde à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto.

3.14 Tratamentos Farmacológicos

✓ Para avaliar o envolvimento de prostanóides nos fenômenos nociceptivos induzidos pela injeção das células do tumor de Walker 256, foi utilizada a Indometacina (Sigma Aldrich. Co., EUA, 4 mg/kg, i.v.), inibidor da ciclooxigenase, dissolvida em TRIS e administrada 60 minutos antes da avaliação dos fenômenos nociceptivos, no 1º, 3º, 7º e 14º dia após a cirurgia. Esta dose foi baseada em estudos realizados anteriormente por nosso grupo, em modelo de dor neuropática (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008).

✓ Os opióides são amplamente utilizados na clínica médica, sendo também preconizados em casos de dor decorrente neoplasia ósseas (WOOTTON, 2004). Assim, como controle positivo e também para melhor caracterizar o presente modelo de indução de dor óssea, foi utilizada Morfina (sulfato de morfina, Protequim Brasil, 5,0 mg/kg, s.c.), dissolvida em solução salina estéril e injetada 60 minutos antes da avaliação da sensibilidade dolorosa, no 14º após a cirurgia. A dose utilizada foi baseada em ensaios preliminares (curva dose resposta), que demonstrou ser esta dose efetiva neste modelo e que não causava alterações locomotoras (teste do campo aberto).

✓

Ainda, para melhor caracterizar o modelo presentemente padronizado, foram utilizados outros fármacos usualmente empregados na clínica médica para o alívio da dor de câncer ósseo, que estão descritos a seguir:

- Gabapentina (Sigma Chem. Co., USA, 200 mg/kg, p.o.) dissolvida em solução salina estéril e injetada 60 minutos antes da avaliação da sensibilidade dolorosa, diariamente por um período de 14 dias. A dose presentemente utilizada foi baseada em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo e demonstraram efetividade do fármaco em modelos de dor crônica (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; JIMENEZ ANDRADE; MANTYH, 2010).

- Ácido Zoledrônico (Eurofarma, Brasil, 78 µg/kg por via endovenosa) dissolvido em solução salina estéril e utilizado imediatamente após a diluição no momento da cirurgia para injeção das células tumorais (NYANGOGA et al., 2010).

✓ Para avaliar o efeito antinociceptivo da Crotalfina, nesse modelo de dor óssea, este peptídeo, dissolvido em solução salina estéril, foi administrado, em diferentes doses, por via oral. As doses de crotalfina presentemente utilizadas estiveram baseadas em dados anteriores obtidas por nosso grupo, em modelos de dor aguda e crônica (BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; KONNO et al., 2008).

Para caracterizar o tipo de receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo da crotalfina, foram utilizados os seguintes antagonistas:

- CTOP (Sigma Aldrich, CO., EUA), antagonista específico de receptor *mu*, dissolvido em água destilada e administrado por via i.pl. (20 µg/pata), imediatamente após a crotalfina.
- nor-BNI (Sigma Aldrich, CO., EUA), antagonista específico de receptor *kappa*, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. (50 µg/pata), imediatamente após a crotalfina. Este teste foi aplicado antes e em diversos tempos após a injeção das células tumorais, na presença ou ausência dos diferentes tratamentos farmacológicos (item 3.14).
- ICI 174, 864 (Sigma Aldrich, CO., EUA), antagonista específico de receptores *delta*, dissolvido em água destilada e administrado por via i.pl. (10 µg/pata), imediatamente após a crotalfina.

As doses utilizadas dos antagonistas foram baseadas em dados da literatura ou em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, utilizando agonistas seletivos destes receptores como controles positivos, mostrando a capacidade destas doses de antagonistas em reverter a analgesia induzida pelos respectivos agonistas (ORTIZ et al., 2002; PICOLO et al., 2000; YONEHARA; TAKIUCHI, 1997)

Os grupos controles foram constituídos por animais tratados com o veículo utilizado para a diluição das drogas.

3.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (SNEDECOR et al., 1946) associada ao teste de Tukey (SOKAL; ROHLF, 1981), para comparação de mais de duas médias. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação do desenvolvimento de hiperalgesia, alodinia, dor manifesta e incapacitância após injeção das células do tumor de Walker 256 na cavidade intramedular do fêmur de ratos

Inicialmente, com o intuito de padronizar o número de células a serem injetadas, os animais foram submetidos à osteotomia e as células do tumor de Walker 256 foram administradas, em diferentes concentrações, no fêmur esquerdo dos ratos. Como controle, foi utilizada salina injetada no fêmur direito dos animais. A injeção das células do tumor de Walker 256 nas concentrações de 4×10^2 , 4×10^3 , 4×10^4 em 3 μL de solução salina estéril não alterou o limiar nociceptivo dos animais durante todo o período de observação (Figura 2A). Por outro lado, estas células tumorais, na concentração de 4×10^5 e 4×10^6 em 3 μL de solução salina estéril acarretaram diminuição do limiar nociceptivo, em relação à medida inicial (Figura 2A), caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. Os animais injetados com solução salina na pata direita (controle – Figura 2B) não apresentaram alteração significativa do limiar nociceptivo, durante todo o período de observação. Além disso, a injeção das células tumorais (4×10^5 e 4×10^6) induziu diminuição significativa na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta de retirada da pata, quando comparado à medida inicial (Figura 2C), caracterizando o fenômeno de alodinia. Ambos os fenômenos foram detectados na 24ª hora após a cirurgia, persistindo pelo menos até o 14º dia do pós-operatório. É interessante ressaltar que o fenômeno de alodinia mecânica foi observado tanto na pata ipsilateral (pata esquerda, Fig. 2C), quanto na pata contralateral (pata direita, Fig. 2D) à injeção das células tumorais, caracterizando o fenômeno descrito como “mirror image pain”. Baseado nos resultados obtidos, foi escolhida a concentração de $4 \times 10^6/3 \mu\text{L}$ para a realização dos demais procedimentos experimentais.

A injeção das células tumorais causou ainda, aumento significativo da duração do tempo (em segundos) de lambida (Figura 3A) e de levantamento (Figura 3B) da pata, durante todo o período de observação, quando comparado aos valores observados na pata contralateral (controle - salina), caracterizando o fenômeno de dor manifesta.

Além da avaliação dos fenômenos descritos acima, foi também investigada a presença do fenômeno de incapacitância (Figura 4). Nesse teste, a quantidade de peso (g) colocado sobre a pata dos animais foi mensurada, e os resultados apresentados como pelo delta de

distribuição dos pesos sobre as patas, sendo $\text{delta} = \text{Peso suportado na pata direita} - \text{Peso suportado na pata esquerda}$. Os resultados mostraram que a partir do 7º dia após a injeção das células tumorais, há aumento significativo no valor do delta, indicando que os animais se apoiam menos (colocam menos peso) na pata esquerda injetada com as células tumorais, em relação à pata direita (controle). É importante ressaltar também que os animais que sentem dor ao ambular tendem a apoiar-se na pata que não apresenta o processo patológico.

Figura 2 - Desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia induzidas pela injeção das células do tumor de Walker 256

C

D

As células tumorais foram injetadas, em diferentes concentrações, no fêmur esquerdo dos ratos. O fêmur direito foi injetado com 3 μ L de salina (controle). O limiar nociceptivo foi determinado pelo teste de pressão de patas e está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A e B). O limiar de resposta ao estímulo tátil foi determinado utilizando os filamentos de von Frey e está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (C e D). As medidas foram realizadas antes (tempo 0) e 1, 3, 7 e 14 dias após a injeção no fêmur das células tumorais. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (tempo 0). (PD) = pata direita, (PE) = pata esquerda.

Figura 3 – Desenvolvimento de dor manifesta após a injeção das células do tumor de Walker 256

As células tumorais foram injetadas, em diferentes concentrações, no fêmur esquerdo dos ratos. O fêmur direito foi injetado com 3 μ L de salina (controle). A dor manifesta foi mensurada pelo tempo (em segundos) de duração da lambida (A) e levantamento (B) das patas, durante um período de 10 minutos de observação, antes (tempo 0) e 1, 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o controle.

Figura 4 – Avaliação da quantidade de peso colocado sobre a pata dos animais após a injeção das células do tumor de Walker 256

Os animais foram injetados com células tumorais no fêmur esquerdo (4×10^6 células em 3 μL de salina). O fêmur direito, injetado com salina, foi considerado como controle. A quantidade de peso colocado sobre a pata dos animais foi mensurada pelo delta de distribuição dos pesos das patas (g), onde $\text{Delta} = \text{Peso suportado na pata direita} - \text{Peso suportado na pata esquerda}$. O teste foi aplicado antes (tempo 0) e 1, 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. Os resultados estão expressos como $\text{média} \pm \text{e.p.m.}$ de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (tempo 0), # por comparação com a medida do 7º dia.

4.2 Efeito da osteotomia sobre o limiar nociceptivo dos animais

Uma vez que a administração das células tumorais no fêmur dos animais envolve o procedimento de osteotomia, verificamos o possível efeito desse procedimento, *per se*, sobre o limiar nociceptivo dos animais. Neste estudo, foi avaliado o efeito da osteotomia sobre a resposta dos animais ao estímulo nociceptivo mecânico (teste de pressão de pata) e à estimulação tátil (filamentos de Von Frey). Os resultados mostraram que a osteotomia não acarretou, em ambos os testes, alterações significativas no limiar de resposta dos animais, quando comparado aos valores basais obtidos antes da cirurgia (Figura 5A e B), durante todo o período de observação. Adicionalmente, a osteotomia não acarretou o aparecimento de dor manifesta (Figura 6A e B). Como controle, foi utilizado o membro posterior direito, submetido aos mesmos procedimentos que o fêmur esquerdo, porém, sem manipulação do osso. Os resultados mostraram que este procedimento não acarretou alteração nos parâmetros avaliados (Figuras 5 e 6).

Figura 5 – Efeito da osteotomia sobre o limiar nociceptivo (A) e a resposta à estimulação tátil (B) dos animais

A

B

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B). As medidas foram realizadas antes (tempo 0) e 1, 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. A pata direita dos animais (falso-operadas) constituiu o grupo controle. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo.

Figura 6 – Efeito da osteotomia sobre a duração do tempo de lambida e levantamento da pata dos animais

A

B

Os animais foram submetidos à osteotomia na pata esquerda. A pata direita dos animais (falso-operadas) constitui o grupo controle. O possível desenvolvimento de dor manifesta foi mensurado pelo tempo (em segundos, seg) de duração da lambida (A) e levantamento (B) das patas, durante um período de 10 minutos de observação, antes (tempo 0) e 1, 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo.

4.3 Efeito da injeção do tumor de Walker 256 sobre a atividade geral dos animais

Nesse estudo, foi também investigado o efeito da injeção das células tumorais (4×10^6 células) sobre a atividade geral dos animais, utilizando o teste do Campo Aberto. Esse teste foi aplicado no 14º dia após a injeção das células tumorais. Nossos resultados mostraram que houve diminuição significativa das frequências de levantamento (Figura 7A) e de locomoção (Figura 7B) dos animais, quando comparado aos animais injetados com salina (controle). Neste ensaio, foi utilizado um grupo controle adicional constituído por animais não manipulados (naive). Não foram detectadas diferenças significativas na frequência de levantamento e locomoção entre o grupo de animais injetados com salina no fêmur e os animais naive, indicando que a osteotomia não interfere, *per se*, com a atividade locomotora.

Figura 7 - Efeito da injeção das células do tumor de Walker 256 sobre atividade geral dos ratos

A

B

As frequências de Levantar (A) e Locomoção (B) foram avaliadas no Campo Aberto, por um período de 10 minutos de observação, 14 dias após a injeção das células tumorais no fêmur esquerdo (4×10^6 células em 3 μ L de salina) dos ratos. O grupo controle foi composto por animais que foram injetados com salina e animais naive, nas mesmas condições experimentais. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo salina e animais naive.

4.4 Avaliação da implantação de células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos

Para estas avaliações, os animais foram injetados com 4×10^6 células tumorais em 3 μ L de solução salina estéril. As células tumorais sempre foram injetadas no fêmur da pata esquerda e a pata contralateral direita, injetada com o mesmo volume de salina estéril, foi usada como controle. A implantação das células tumorais foi avaliada em diferentes tempos após a inoculação das células, por meio de exames de imagem, descritos a seguir.

4.4.1 Imagem Radiográfica

Imagens digitalizadas foram obtidas de radiografias em projeção ventro – dorsal, da região da coxa e crânio - caudal dos membros pélvicos (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12). As imagens foram obtidas antes (Figura 8) e 1, 3, 7 e 14 dias (Figura 9, 10, 11 e 12, respectivamente) após a inoculação das células do tumor de Walker 256.

A Figura 8 representa as imagens radiológicas obtidas antes da injeção das células tumorais e mostra que não há alterações radiográficas dignas de nota, tanto no membro posterior esquerdo, como no membro posterior direito.

Podemos observar que no 1º dia após a inoculação das células tumorais (Figura 9), não são detectadas alterações radiográficas dignas de nota, no membro posterior direito, membro que foi injetado com solução salina estéril. Por outro lado, no membro posterior esquerdo, inoculado com as células do tumor de Walker 256, podemos observar a ocorrência de discreto aumento de volume de partes moles (musculatura esquelética adjacente ao fêmur), com área de pequenas coleções gasosas craniais, que podem ser justificadas pela manipulação da área durante a cirurgia para inoculação das células tumorais, porém, sem comprometimento ósseo evidente.

A Figura 10 representa exame radiológico obtido no 3º dia após a inoculação das células do tumor de Walker 256. Podemos observar aumento moderado do volume de partes moles, com área de abaulamento contendo coleção gasosa em tecido subcutâneo, na face lateroproximal da região do fêmur. Pode ser observada, ainda, discreta reação periosteal lisa na face lateral do terço medioproximal da diáfise do fêmur. O membro posterior direito, injetado com solução salina estéril, não apresentou alterações radiográficas dignas de nota.

A avaliação da implantação das células do tumor de Walker 256, no 7º dia após a inoculação das células tumorais está representada na Figura 11. A figura representa o exame obtido no membro posterior direito, injetado com salina (controle) e mostra que não há

alterações radiográficas dignas de nota. Já a análise do membro posterior esquerdo, injetado com as células tumorais, mostra moderado aumento de volume de partes moles, com área de abaulamento contendo coleção gasosa em tecido subcutâneo na face lateroproximal da região do fêmur. Ainda, é observada pequena reação periosteal lisa com halo de esclerose principalmente em face cranio lateral do terço medioproximal da diáfise do fêmur.

A Figura 12 mostra a avaliação da implantação das células do tumor de Walker 256 no 14º dia após sua inoculação. A figura representa o exame obtido no membro posterior direito, injetado com salina (controle) e mostra que não há alterações radiográficas dignas de nota. Já a análise do membro posterior esquerdo, injetado com as células tumorais, mostra acentuado aumento de volume de partes moles na extensão do membro e principalmente junto a região do fêmur esquerdo. Pode ser observado, ainda, processo osteolítico difuso, com adelgaçamento das corticais e reação periosteal exuberante expansiva e lisa em terço medioproximal da diáfise do fêmur. Área extensa de coleção gasosa em tecido subcutâneo, com superfície irregular das partes moles na face lateral da região do fêmur.

Figura 8 – Imagem radiográfica obtida antes da inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos

Membro Posterior Direito (MPD)

Membro Posterior Esquerdo (MPE)

Representação radiográfica do fêmur esquerdo e direito antes da inoculação das células do tumor de Walker 256. Membro Posterior Direito (MPD) = Sem alterações radiográficas dignas de nota; Membro Posterior Esquerdo (MPE) = Sem alterações radiográficas dignas de nota.

Figura 9 – Alterações radiográficas obtidas 24 h após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos

Membro Posterior Direito (MPD)

Membro Posterior Esquerdo (MPE)

As células tumorais (4×10^6 células em 3 μL de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais. Salina, injetada no fêmur direito, nas mesmas condições experimentais, foi utilizada como controle. Representação radiográfica do fêmur esquerdo e direito, Membro Posterior Direito (MPD) = Sem alterações radiográficas dignas de nota; Membro Posterior Esquerdo (MPE) = Discreto aumento de volume de partes moles junto à região do fêmur esquerdo, com área de pequenas coleções gasosas craniais, sem comprometimento ósseo evidente (indicado pela seta →)

Figura 10 – Alterações radiográficas obtidas 3 dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos.

Membro Posterior Direito (MPD)

Membro Posterior Esquerdo (MPE)

As células tumorais (4×10^6 células em 3 μ L de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais. Salina, injetada no fêmur direito, nas mesmas condições experimentais, foi utilizada como controle. Membro Posterior Direito (MPD) = Sem alterações radiográficas dignas de nota; Membro Posterior Esquerdo (MPE) = Aumento moderado de volume de partes moles, com área de abaulamento contendo coleção gasosa em tecido subcutâneo na face lateroproximal da região do fêmur (indicada pela seta ➡). Discreta reação periosteal e lisa em face lateral do terço medioproximal da diáfise do fêmur.

Figura 11 – Alterações radiográficas obtidas 7 dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos

Membro Posterior Direito (MPD)

Membro Posterior Esquerdo (MPE)

As células tumorais (4×10^6 células em 3 μL de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais. Salina, injetada no fêmur direito, nas mesmas condições experimentais, foi utilizada como controle. Membro Posterior Direito (MPD) = Sem alterações radiográficas dignas de nota; Membro Posterior Esquerdo (MPE) = Moderado aumento de volume de partes moles com área de abaulamento contendo coleção gasosa em tecido subcutâneo na face lateroproximal da região do fêmur, reação periosteal lisa com halo de esclerose principalmente em face craniolateral do terço medioproximal da diáfise do fêmur (indicado pela seta).

Figura 12 – Alterações radiográficas obtidas 14 dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos

Membro Posterior Direito (MPD)

Membro Posterior Esquerdo (MPE)

As células tumorais (4×10^6 células em 3 μL de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais. Salina, injetada no fêmur direito, nas mesmas condições experimentais, foi utilizada como controle. Membro Posterior Direito (MPD) = Sem alterações radiográficas dignas de nota; Membro Posterior Esquerdo (MPE) = Acentuado aumento de volume de partes moles na extensão do membro e principalmente junto a região do fêmur esquerdo (indicado pela seta ➡). Processo osteolítico difuso, com adelgaçamento das corticais e reação periosteal expansiva e lisa em terço medioproximal da diáfise do fêmur. Área extensa de coleção gasosa em tecido subcutâneo com superfície irregular das partes moles na face lateral da região do fêmur.

4.4.2 Imagens de PET, SPECT e CT da evolução do implante de células tumorais na região do fêmur de ratos

As imagens tomográficas utilizando radioisótopos e por raio-X, foram obtidas em equipamento híbrido que incorpora as tecnologias de SPECT (single photon emission computer tomography / tomografia computadorizada por emissão de fóton único), PET (pósitron emission tomography / tomografia por emissão de pósitrons) e CT (computer tomography / tomografia computadorizada), de tal modo que as imagens de PT e CT podem ser fusionadas, o mesmo ocorrendo para SPECT e CT.

As imagens de CT, realizadas no 3º dia após inoculação das células, mostraram pequena descontinuidade pontual da cortical óssea na região de inoculação do tumor área irregular com alteração da atenuação na musculatura posterior da coxa (Figura 13). No 7º dia, a imagem apresenta persistência de descontinuidade do local de inoculação concomitante ao aumento de volume do fêmur e de partes moles circunjacentes (coxa), com discreto afinamento e heterogeneidade da cortical óssea na região posterior do mesmo (Figura 14). Já no 14º podemos observar padrão insuflativo do fêmur, com destruição da cortical óssea e importante componente tumoral em partes moles (Figura 15), determinando importante aumento do volume de partes moles da coxa, indicativo de que as células tumorais expandiram-se (comparado com o fêmur direito-controle).

4.4.2.1 Imagem Tomográfica (Tomografia Computadorizada – CT)

As imagens da CT realizadas no 3º dia após inoculação das células, mostraram pequena descontinuidade pontual da cortical óssea na região de inoculação do tumor, área irregular com alteração da atenuação na musculatura posterior da coxa (Figura 13). No 7º dia, a imagem apresenta persistência de descontinuidade do local de inoculação concomitante ao aumento de volume do fêmur e de partes moles circunjacentes (coxa), com discreto afinamento e heterogeneidade da cortical óssea na região posterior do mesmo (Figura 14). No 14º após a inoculação das células tumorais, é possível observar padrão insuflativo do fêmur, com destruição da cortical óssea e componente tumoral em partes moles (Figura 15), determinando importante aumento do volume de partes moles da coxa (comparado ao fêmur direito - controle)

Figura 13- Corte axial (A) do fêmur na altura do local de injeção das células e reconstrução tridimensional (B) da imagem tomográfica do rato no 3º dia após a inoculação das células tumorais

As células tumorais (4×10^6 células em 3 μ L de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais. **Painel A** – A imagem obtida no 3º dia após a inoculação das células do tumor de Walker 256, demonstra pequena descontinuidade pontual da cortical óssea na região de inoculação do tumor → / área irregular com alteração da atenuação na musculatura posterior da coxa. **Painel B** – o corte tridimensional demonstra pequena descontinuidade pontual da cortical óssea na região de inoculação do tumor indicada pela seta (→).

Figura 14 - Corte axial (A) do fêmur na altura do local de injeção das células e reconstrução tridimensional (B) da imagem tomográfica do rato no 7º dia após a inoculação das células tumorais

As células tumorais (4×10^6 células em 3 μL de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais. A imagem obtida no 7º dia após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos, demonstra persistência do local de inoculação $\rightarrow$. Aumento de volume do fêmur e de partes moles circunjacentes (coxa), com discreto afilamento e heterogeneidade da cortical óssea na região posterior do mesmo $\rightarrow$ (Painel A). O Painel B demonstra aumento de volume do fêmur esquerdo.

Figura 15 - Corte axial (A) do fêmur na altura do local de injeção das células e reconstrução tridimensional (B) da imagem tomográfica do rato no 14º dia após a inoculação das células tumorais

A imagem obtida no 14º dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células em 3 μL de salina) no fêmur esquerdo dos animais, mostram padrão insuflativo do fêmur (indicado pela seta azul $\rightarrow$), com destruição da cortical óssea (indicado pelas setas vermelhas $\rightarrow$) e importante componente tumoral em partes moles, determinando aumento do volume de partes moles da coxa (comparando o fêmur esquerdo com o fêmur direito na figura). O Painel B mostra padrão insuflativo do fêmur, com destruição da cortical óssea $\rightarrow$.

4.4.2.2 Imagens de SPECT, PET e CT

As imagens cintilográficas (SPECT) foram realizadas após a aquisição da imagem da CT (Figura 16). Estas imagens foram realizadas 2 horas após a administração do ^{99m}Tc -MDP, período no qual ocorre a maior captação do radiofármaco na estrutura óssea e maior eliminação do material não captado. Entre o 3º e 7º dias após implante tumoral, observamos aumento na incorporação do radiofármaco na região afetada pela injeção das células do tumor de Walker 256 (Painel A, B e C), concordante com o padrão de lesão óssea observado nas imagens da CT, confirmando a intensa atividade osteogênica no sítio de destruição óssea. Todavia, aos 14 dias da inoculação das células, a captação do ^{99m}Tc -MDP no osso é irregular, em função da destruição da matriz óssea (aspecto lítico à CT) e possível diminuição do fluxo sanguíneo e aporte do radiofármaco (Painel D).

Figura 16: Imagens de SPECT da reconstrução tridimensional da captação de ^{99m}Tc -MDP nos 3°, 7° e 14° dias após a inoculação das células tumorais

Imagens da progressão da infiltração do tumor, na região do fêmur esquerdo de ratos, aos: (A) 3°, (C) 7° e (D) 14° dias após o implante de células tumorais de Walker 256 ($3\ \mu\text{L} - 4 \times 10^6$ células), expressa pelo aumento da concentração de ^{99m}Tc -MDP entre o 3 e 7 dias, e sinais claros de degradação da matriz óssea na área da inoculação do tumor aos 14 dias. Imagem (B) apresenta o local da injeção das células tumorais.

4.4.3 Quantificação das imagens SPECT - Relação Fêmur Direito/Esquerdo

Além da análise visual, a utilização de radiofármacos permite quantificar, de modo relativo, a concentração do produto que foi incorporado na região onde foi inoculado o tumor, bem como, a captação no osso contralateral (fêmur direito - controle) (Figura 17).

Figura 17 - Alterações ósseas observadas por meio de cortes seccionais de imagens tomográficas (SPECT e CT) dos fêmures direito e esquerdo, utilizados para quantificação da captação relativa do ^{99m}Tc -MDP

Imagens da CT, fusão SPECT/CT e SPECT dos fêmures direito (D) e esquerdo (E), no 3º, 7º e 14º dias após a inoculação das células tumorais (4×10^6 células em $3 \mu\text{L}$ de salina), utilizadas para quantificação da captação do ^{99m}Tc -MDP, utilizando a ROI (área de interesse) desenhada de forma circular (imagem central). Relação Fêmur Direito/ Esquerdo - 3º dia = 1,61 contagem/5 minutos; 7º dia = 2,52 contagem/5 minutos; 14º dia = 4,88 contagem/5 minutos.

O estudo PET também foi realizado após a CT, com imagens obtidas 60 minutos após a administração da ^{18}F FDG (Figura 18). Aos 14 dias da inoculação, nota-se captação difusa e heterogênea na periferia do osso e formação expansiva em partes moles.

A área de captação da ^{18}F FDG corresponde a região de lise na CT e inclui parte da lesão que é hipocaptante no SPECT com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP.

Figura 18 – Corte axial (A) do fêmur na altura do local de injeção das células e reconstrução tridimensional (B) da imagem tomográfica da captação da ^{18}F FDG do rato no 14º dia após a inoculação das células tumorais

Painel A - A imagem do corte axial do fêmur esquerdo, no 14º dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células em 3 μL de salina), apresenta captação difusa e heterogênea da ^{18}F FDG na periferia, formação expansiva em partes moles. Importante área central com hipocaptção com gás no seu interior (indicativo de necrose tumoral central $\rightarrow$). Painel B - Imagem tridimensional da captação da ^{18}F FDG em partes moles, 14 dias após a inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur esquerdo dos animais.

4.5 Análises Histopatológicas

As análises foram realizadas em tecidos do fêmur e musculatura adjacente, obtidas 14 dias após a injeção das células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células em 3 μL) no fêmur esquerdo dos animais. O grupo controle foi composto por animais injetados com 3 μL de solução salina estéril no fêmur esquerdo. Ainda, uma vez que as células do tumor de Walker são células extremamente invasivas e capazes de crescer em diversos tipos de tecidos (BRIGATE et al., 2005; BRIGATTE, 2006), avaliamos presentemente, possíveis focos de metástase nos pulmões, baço, fígado e rins dos animais, 14 dias após a inoculação das células.

4.5.1 Alterações histopatológicas do fêmur dos animais injetados com tumor de Walker 256

A fotomicrografia apresentada na Figura 19 (Painel A) representa um corte histológico de fêmur de um rato injetado com solução salina estéril (3 μL , controle) na cavidade medular do fêmur direito. Nesta figura podemos observar tecido ósseo, cartilaginoso e medula óssea hematogênica preservados, sem alterações dignas de nota. O Painel B representa uma fotomicrografia de corte histológico de fêmur de rato do grupo que recebeu inóculo de células de tumor de Walker (4×10^6 células – 3 μL). Podemos observar nesta figura, o crescimento de células tumorais e necrose do tecido ósseo. O Painel C representa em detalhe, o painel B, onde é possível observar as células tumorais permeando o tecido ósseo.

Figura 19 - Alterações histopatológicas no fêmur de rato

A

B

C

Painel A - Fotomicrografia de corte histológico de fêmur de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção, inócuo com solução salina estéril (3 μ L) no fêmur, sem alterações histológicas dignas de nota H&E, 4X. **Painel B** - Fotomicrografia de corte histológico de fêmur de um rato do grupo que recebeu inócuo de células de tumor de Walker no fêmur (4×10^6 células – 3 μ L) obtido 14 dias após a injeção. $\Rightarrow$ Em detalhe observar crescimento de células tumorais e necrose do tecido ósseo. H&E, 4X. **Painel C** - Fotomicrografia de corte histológico de fêmur de um rato do grupo que recebeu inócuo de células de tumor de Walker no fêmur (4×10^6 células – 3 μ L) obtido 14 dias após a injeção. Observar crescimento de células tumorais na cavidade medular, e lise óssea. $\Rightarrow$ H&E, 10X.

4.5.2 Alterações histopatológicas na musculatura estriada esquelética adjacente ao fêmur dos animais injetados com tumor de Walker 256

A fotomicrografia apresentada na Figura 20 (Painel A) representa corte histológico de musculatura estriada esquelética adjacente ao fêmur de rato do grupo que recebeu, 14 dias antes, injeção de células de tumor de Walker. Nesta figura podemos observar intensa invasão tumoral na musculatura esquelética adjacente ao fêmur inoculado com as células tumorais indicando que o tumor se infiltrou para as partes moles adjacentes (musculatura esquelética). O painel B representa em detalhe a fotomicrografia do Painel A.

Figura 20 – Alterações histopatológicas da musculatura estriada esquelética adjacente ao fêmur de rato

A

B

Painel A - Fotomicrografia de corte histológico de musculatura estriada esquelética adjacente ao fêmur de um rato do grupo que recebeu injeção de células de tumor de Walker no fêmur (4×10^6 células em 3 μ L de salina) obtido 14 dias após a injeção. $\Rightarrow$ Observar intensa invasão tumoral. H&E, 4X.
Painel B – Destaque da fotomicrografia anterior. $\Rightarrow$ Observar intensa invasão tumoral H&E, 10X.

4.5.3 Alterações histopatológicas do pulmão de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur

A fotomicrografia apresentada na Figura 21 (Painel A) representa corte histológico de pulmão de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 µL, controle) na cavidade medular do fêmur. A injeção de solução salina estéril não interferiu com a morfologia regular óssea, demonstrada pela ausência de alterações histológicas dignas de nota. O Painel B que representa fotomicrografia de corte histológico de pulmão de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células em 3 µL) no fêmur, 14 dias antes da coleta do tecido. Nota-se a presença de células tumorais na parede dos bronquíolos, indicando metastização. Ainda, é possível observar células degeneradas na luz bronquiolar. Em detalhe no Painel C, podemos observar as células metastáticas do tumor de Walker no tecido pulmonar. Nota-se a presença células arredondadas ou ovaladas, pleomórficas, com nucléolo (s) evidentes. Algumas células são vistas invadindo a parede de uma arteríola.

Figura 21 – Alterações histopatológicas de pulmão de rato

A

B

C

Painel A - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 μ L) no fêmur. Observar ausência de alterações dignas de nota. H&E, 4X. **Painel B** - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 no fêmur (4×10^6 células em 3 μ L de salina) 14 dias após a injeção. $\Leftarrow$ Observar presença de metástase de células do tumor de Walker, que envolvem a parede de um bronquíolo. $\Rightarrow$ Presença de células degeneradas na luz broquiolar. H&E, 4X. **Painel C** - Detalhe das células metastáticas no pulmão de rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 no fêmur (4×10^6 células – 3 μ L) 14 dias após a injeção. Trata-se de células arredondadas ou ovaladas, pleomórficas, com nucléolo(s) evidente (s). Algumas células são vistas invadindo a parede de uma arteríola (H&E, 10x).

4.5.4 Alterações histopatológicas do baço de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur

A fotomicrografia apresentada na Figura 22 (Painel A) representa fotomicrografia de corte histológico do baço - polpa branca, de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 μ L, controle) na cavidade medular do fêmur. As análises mostram que a injeção de solução salina intrafemural não interferiu com a morfologia do baço dos animais. O Painel B representa fotomicrografia de corte histológico do baço polpa branca, de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células – 3 μ L) no fêmur, 14 dias antes. Nesta fotomicrografia podemos observar intensa hiperplasia de tecido linfóide tanto de áreas contendo linfócitos T, como áreas contendo linfócitos B. O Painel C mostra em detalhe, a fotomicrografia de corte histológico do baço - polpa branca, de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256, 14 dias antes. Nesta fotomicrografia podemos observar intensa hiperplasia de tecido linfóide, e presença de infiltração de células tumorais, caracterizando metástase para este órgão.

Figura 22 – Alterações histopatológicas do baço de ratos

A

B

C

Painel A - Fotomicrografia de corte histológico do baço, polpa branca, de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 μ L) no fêmur. Sem alterações morfológicas dignas de nota. H&E, 10X. **Painel B** – Fotomicrografia de corte histológico do baço, polpa branca, de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 no fêmur (4×10^6 células - 3 μ L) 14 dias após a injeção. Observar intensa hiperplasia de tecido linfóide tanto de áreas contendo linfócitos T, (seta ↶), como áreas contendo linfócitos B (seta ↷). H&E, 4X. **Painel C** - Fotomicrografia de corte histológico do baço, polpa branca, de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 no fêmur (4×10^6 células - 3 μ L) 14 dias após a injeção. ➡ Observar intensa hiperplasia de tecido linfóide, e presença de infiltração de células tumorais. H&E, 10X.

4.5.5 Alterações histopatológicas do fígado de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur

A fotomicrografia apresentada na Figura 23 (Painel A) representa fotomicrografia de corte histológico do fígado de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 µL, controle) na cavidade medular do fêmur. Podemos observar que a injeção de solução salina estéril não provocou alterações histológicas dignas de nota. No Painel B, representativo de fotomicrografia de corte histológico do baço de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células/3 µL salina) no fêmur, 14 dias antes da coleta dos tecidos, podemos observar discreta proliferação de ductos biliares, além de congestão. Observa-se a presença de células tumorais próximo ao espaço porta hepático. No Painel C podemos observar alguns focos metastáticos.

Figura 23 – Alterações histopatológicas de fígado de rato

A

B

C

Painel A - Fotomicrografia de corte histológico do fígado de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 μ L) no fêmur. Observar ausência de alterações histológicas dignas de nota. H&E, 4X. **Painel B** - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 no fêmur (4×10^6 células – 3 μ L) 14 dias após a injeção. Foram observados focos metastáticos próximo ao espaço porta hepático. H&E, 20X. **Painel C** - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 no fêmur (4×10^6 células – 3 μ L) 14 dias após a injeção. Foram observados focos metastáticos (setas). H&E, 10X.

4.5.6 Alterações histopatológicas do rim de ratos injetados com tumor de Walker 256 no fêmur

A fotomicrografia apresentada na Figura 24 (Painel A) representa fotomicrografia de corte do rim de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 µL, controle) na cavidade medular do fêmur. As análises mostraram que a injeção de salina não acarretou alterações histológicas dignas de nota. Da mesma forma, a fotomicrografia de corte histológico do baço de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células – 3 µL) 14 dias após a injeção intramedular do fêmur (Painel B), mostra ausência de alterações histológicas dignas de nota, indicando, que neste período, não ocorreu metastização do tumor para esse órgão.

Figura 24 – Alterações histopatológicas do rim de rato

A

B

Painel A - Fotomicrografia de corte histológico do rim de um rato do grupo controle obtido 14 dias após a injeção de solução salina estéril (3 μ L) no fêmur. Observar ausência de alterações histológicas dignas de nota. H&E, 4X. **Painel B** - Fotomicrografia de corte histológico do rim de um rato do grupo injetado com células do tumor de Walker 256 no fêmur (4×10^6 células – 3 μ L) 14 dias após a injeção. Observar ausência de alterações histológicas dignas de nota. H&E, 4X.

4.6 Efeito da injeção de células do Tumor de Walker 256 sobre a sobrevivência, ingestão alimentar e hídrica e determinação da evolução ponderal

Com relação à análise de sobrevivência, os grupos experimentais foram constituídos por animais injetados com as células tumorais (fêmur) ou salina (controle). Neste estudo, os ratos foram avaliados diariamente, até que fosse observado o óbito espontâneo (Figura 25). Nossos resultados mostram que os animais vieram a óbito a partir do 14º dia após a inoculação das células tumorais. Neste período, a porcentagem de óbito foi de 5,45% aumentando progressivamente e proporcionalmente a 11,53% de óbitos no 15º dia, 23,91% no 16º, 71,42% no 18º, chegando a 100% no 20º dia após a inoculação das células tumorais (Painel A).

Outro parâmetro analisado foi o de ingestão alimentar e hídrica. Os animais injetados com as células tumorais ou salina (controle) foram colocados em gaiolas metabólicas, no 14º dia após a inoculação das células. Neste estudo, foi utilizado como grupo controle adicional, animais não manipulados (naive). Os ratos foram observados, individualmente, por um período de 24 h. Para as avaliações, foram colocados 500 g de ração em cada gaiola e 100 mL de água para cada animal. Após o período de 24 h procedeu-se a pesagem da ração que ainda estava no comedouro e o residual do que foi ingerido, e medido o volume de água consumido por cada animal.

Nossos resultados demonstram que 14 dias após a inoculação das células tumorais, os animais consumiram em média 3 g de ração, quando comparado ao grupo controle, que consumiu em média 26 g, indicando drástica diminuição na ingestão alimentar (Painel B). Por outro lado, não foi observada diminuição do consumo de água por esses animais, em comparação com o grupo controle (dados não mostrados).

Para a determinação da evolução ponderal, os animais foram pesados imediatamente antes da cirurgia e no 1º, 3º, 7º e 14º dias após a implantação das células tumorais ou da injeção de salina na cavidade intrafemoral (controle). Um grupo controle adicional foi constituído por animais não manipulados (naive). Os animais injetados com as células tumorais apresentaram diminuição no ganho de peso (Painel C), quando comparado com os grupos controles injetados com salina ou os que não foram submetidos a nenhum procedimento (naive). Esta diminuição foi significativa no 14º do pós – operatório. Não houve diferença significativa no ganho de peso corporal entre os animais tratados com salina e animais naive.

Figura 25 – Efeito da injeção de células do Tumor de Walker 256 sobre a sobrevivência, ingestão alimentar e hídrica e evolução ponderal

A

B

C

Painel A – Para análise da sobrevida os animais que foram injetados com as células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células em 3 μ L de salina) no fêmur esquerdo. Estes animais entraram em óbito espontâneo significativamente a partir do 18º dia. Não foi observado óbito entre os animais do grupo controle injetado com salina (fêmur direito), durante o período de observação. Os dados estão representados como % de sobrevida. Neste teste foram utilizados 55 animais do grupo injetado com células tumorais e 55 animais do grupo controle. **Painel B** - Para avaliação da quantidade de ração consumida, os ratos foram colocados, individualmente, por 24 h, em gaiolas metabólicas, no 14º dia após a inoculação das células do tumor de Walker fêmur esquerdo. O grupo controle foi composto por animais injetados com salina no fêmur e por animais não manipulados (naive). Os dados representam a média $\pm$ epm de 20 animais por grupo. * $P < 0,05$, por comparação com o grupo salina e ** $P < 0,05$, por comparação ao grupo naive. **Painel C** – Para avaliação do desenvolvimento ponderal dos animais os animais foram pesados imediatamente antes da cirurgia (tempo 0) para implantação das células do tumor de Walker 256 na cavidade femoral, e no 1º, 3º, 7º e 14º dias após a injeção das células. O grupo controle foi composto por animais que foram injetados com solução salina estéril (salina) na cavidade intrafemoral ou naive (não manipulados). Os dados representam a média $\pm$ epm de 20 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com medida inicial (tempo 0).

4.7 Efeito do tratamento com fármacos analgésicos sobre a nocicepção causada pela implantação de células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos

Com o intuito de melhor caracterizar o presente modelo de nocicepção óssea acarretada pela administração de células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos, foi avaliado o efeito de diferentes fármacos com atividade analgésica, nos fenômenos de hiperalgesia e alodinia acarretados pela implantação das células tumorais.

Uma vez que anti-inflamatórios não esteroidais são utilizados como terapia complementar, no controle deste tipo de dor, avaliamos o possível efeito da indometacina (4 mg/kg, i.v.), um inibidor da ciclo-oxigenase, administrada no 1º, 3º, 7º e 14º dias após a cirurgia. A indometacina inibiu parcial, mas significativamente, a hiperalgesia (Figura 26 A) e alodinia (Figura 26B) induzidas pela inoculação das células tumorais, indicando o envolvimento de prostanóides nos fenômenos nociceptivos observados. A contribuição dos prostanóides foi mais significativa até o 3º dia após a injeção das células, uma vez que entre o 7º e o 14º dia, o efeito inibitório da indometacina foi significativamente menor, quando comparado ao 1º e 3º dias após a injeção das células (Figura 26). Avaliamos ainda, o efeito da indometacina no fenômeno de “mirror image pain”, detectado na pata contralateral. Os resultados mostraram que o fármaco não foi capaz de reverter a alodinia nesta pata (Figura 26C).

Como controle experimental, utilizamos grupos que receberam salina ou TRIS (utilizado como diluente da indometacina), por via endovenosa. Estes tratamentos não interferiram com a hiperalgesia e alodinia induzidas pelo tumor.

Figura 26 - Efeito da indometacina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela implantação das células tumorais no fêmur de ratos

A

B

C

Na hiperalgesia, o limiar de dor está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). Na alodinia, o limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B e C). As medidas foram realizadas antes (tempo 0 – linha tracejada) e no 1º, 3º, 7º e 14º dias após a injeção das células tumorais animais (4×10^6 células em $3 \mu\text{L}$ de salina) no fêmur esquerdo dos animais (A e B). O tratamento com indometacina (4 mg/kg), Tris (200 μL , i.v.) ou salina (200 μL), por via endovenosa, foi realizado no 1º, 3º, 7º e 14º dias do pós-operatório, 60 minutos antes das medidas. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o valor basal (linha tracejada) ** por comparação com o grupo TRIS ou Salina # por comparação com a indometacina no 1º e 3º dias após a injeção das células tumorais.

Os opióides são amplamente utilizados na clínica médica, sendo também preconizados para o tratamento de neoplasias ósseas. No presente estudo, foi utilizada a morfina, administrada no 14º dia após a cirurgia, por via subcutânea. Os resultados mostraram que a morfina (5mg/kg, s.c.) inibiu parcialmente a hiperalgesia e alodinia (Figura 27A e B) causadas pela implantação das células no fêmur. Foi também observada inibição parcial da alodinia na pata contralateral, indicando que a morfina é capaz de interferir com o fenômeno de “mirror image pain” (Figura 27C). A escolha da dose de 5 mg/kg de morfina foi baseada em dados obtidos anteriormente, demonstrando que nas nossas condições experimentais, doses mais elevadas deste opióide promovem alterações nas frequências de locomoção e levantamento dos animais, no teste do campo aberto, bem como depressão respiratória (GUTIERREZ, V. et al., 2008a).

O grupo controle foi composto por animais tratados com solução salina estéril. Este tratamento não interferiu com os fenômenos nociceptivos observados nos animais que receberam as células tumorais.

Figura 27 - Efeito da morfina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela inoculação das células tumorais no fêmur de ratos

A

B

C

Pata contralateral

Na hiperalgesia, o limiar de dor está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). Na alodinia, o limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B e C). As medidas foram realizadas antes (tempo 0 – linha tracejada) e no 14º dia após a injeção das células tumorais (4×10^6 células em $3 \mu\text{L}$ de salina) no fêmur esquerdo dos animais (A e B). O tratamento com morfina (5,0 mg/kg, s.c) ou salina (controle) foi realizado no 14º dia após a inoculação das células tumorais, 60 minutos antes das medidas. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (linha tracejada); ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (salina).

Dados de literatura tem mostrado que o uso prolongado de pregabalina (estruturalmente relacionada com a gabapentina) atenua a dor óssea proveniente de metástase (PETERS et al., 2005), utilizamos presentemente, a gabapentina. O tratamento prolongado (diário, por 14 dias, iniciando-se o tratamento no primeiro dia após a inoculação das células tumorais) com a gabapentina (200 mg/kg, p.o.) reverteu parcialmente a hiperalgesia e alodinia, tanto na pata ipsilateral injetada com as células tumorais (Figura 28A e B), como também na pata contralateral injetada com solução salina estéril (Figura 28C).

A administração solução salina estéril (p.o), nas mesmas condições experimentais (controle) não interferiu com os fenômenos hipernociceptivos acarretados pela injeção das células tumorais no dos animais.

Figura 28 - Efeito do tratamento diário, durante 14 dias, com gabapentina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela implantação das células tumorais no fêmur de ratos

A

B

C Mirror image pain (pata contralateral)

Na hiperalgesia, o limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). Na alodinia, o limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B). As células tumorais (4×10^6 células em 3 μ L de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais (A e B). A gabapentina (200 mg/kg, s.c.) foi administrada diariamente, uma vez ao dia, a partir de 1º dia do pós-operatório, por um período de 14 dias. Animais tratados com salina, nas mesmas condições experimentais, constituem o grupo controle. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, # por comparação com a medida inicial (linha tracejada).

Os bisfosfonatos são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (BOONECAMP et al., 1986) e são utilizados como uma nova modalidade de tratamento para metástases ósseas (NYANGOOGA et al., 2010) e para o alívio da dor óssea resultante de metástases (NYANGOOGA et al., 2010). No presente estudo utilizamos o ácido zoledrônico para avaliação do possível efeito dos bifosfonatos no modelo de dor óssea acarretado pela injeção intrafemoral de células do tumor de Walker 256. A administração de ácido zoledrônico (78 µg/kg, i.v.), imediatamente após a injeção das células tumorais, inibiu parcialmente a hiperalgesia (Figura 29A) e alodinia (Figura 29B), durante 14 dias após o procedimento de inoculação das células tumorais. Foi também observada inibição do fenômeno de “mirror image pain” (Figura 29C). Salina, administrada nas mesmas condições experimentais, não interferiu com os fenômenos nociceptivos causados pela implantação das células tumorais (Figura 29).

Figura 29- Efeito do tratamento com ácido zoledrônico sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela inoculação das células tumorais no fêmur de ratos

A

B

C

Mirror image pain (pata contralateral)

Na hiperalgesia, o limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). Na alodinia, o limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B, C). O ácido zoledrônico (78 $\mu\text{g/kg}$, i.v.) foi administrado uma única vez, imediatamente após a injeção das células tumorais ou salina. As células do tumor de Walker 256 (4×10^6 células em 3 μL de salina) foram injetadas no fêmur esquerdo dos animais (A e B). Os animais foram avaliados diariamente por um período de 14 dias. Animais tratados com salina, nas mesmas condições experimentais, constituem o grupo controle. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle e # com a linha tracejada que representa a medida basal.

4.8 Caracterização do efeito antinociceptivo da crotalfina

4.8.1 Efeito da crotalfina sobre a hiperalgesia, alodinia e dor manifesta induzidas pela injeção das células tumorais

Inicialmente foram testadas três doses da crotalfina. A escolha das doses de 5µg/kg e 6µg/kg, administradas por via oral, foi baseada em dados anteriores de nosso grupo, mostrando sua efetividade em inibir em ratos, a dor neuropática (5µg/kg) (GUTIERREZ, V. et al., 2008a) e a dor induzida pela injeção intraplantar de células do tumor de Walker (6µg/kg) (BRIGATE et al., 2005). Como mostrado na Figura 30A, estas doses, administradas no 14º dia do período pós-operatório, não interferem com a hiperalgesia detectada 14 dias após a injeção intramedular das células do tumor de Walker no fêmur dos animais. Baseados nestes resultados, foi administrada a dose de 8µg/kg do peptídeo. Os dados obtidos indicam que a crotalfina, nesta dose, inibiu a hiperalgesia (Figura 30 A), alodinia (Figura 31 A e B) e o aumento do tempo de lambida e levantamento da pata (Figura 32 A e B) induzidos pela injeção das células tumorais. O efeito anti-hiperalgésico (Figura 30 A), antialodínico (Figura 31 A e B) e antinociceptivo (Figura 33 e 34) da crotalfina foi observado até 48 h após a administração de uma única dose deste peptídeo. A administração de salina, *p.o.* (controle), não interferiu com os fenômenos nociceptivos causados pela injeção das células tumorais.

Figura 30 - Efeito anti-hiperalgésico da crotalfina em animais submetidos à injeção das células tumorais

O limiar de dor está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata. A crotalfina nas doses de 5µg/kg, 6µg/kg e 8 µg/kg ou salina foram administradas no 14º dia após a injeção das células tumorais (4×10^6 células em 3µL de salina). A hiperalgesia foi determinada antes e 3 h após a administração do peptídeo ou salina. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo salina, # por comparação com a medida basal representada pela linha tracejada.

Figura 31 - Efeito antialodínico da crotalfina em animais submetidos à injeção das células do tumor de Walker 256

A

B Mirror imagem pain (pata contralateral)

O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como intensidade do estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata. A crotalfina (8 $\mu\text{g/kg}$) ou salina foram administrada nos 14^o dia da implantação das células tumorais (4×10^6 células em 3 μL de salina). A alodinia foi determinada 3 h os tratamentos, pata direita Painel A e pata esquerda Painel B. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo salina (controle) # por comparação com a medida basal representada pela linha tracejada.

Figura 32- Efeito da crotalina sobre o tempo de duração da lambida e levantamento da pata induzida pela injeção das células tumorais

A

B

A dor manifesta foi mensurada pelo tempo (em segundos, seg) de duração da lambida (A) e levantamento (B) das patas, durante um período de 10 minutos de observação. A crotalina (8 $\mu\text{g/kg}$) ou salina foram administradas no 14º dia da implantação das células tumorais (4×10^6 células em 3 μL de salina). A dor manifesta foi determinada antes e 3h a administração do peptídeo ou salina. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo salina.

Figura 33 - Duração do efeito anti-hiperalgésico e antialodínico da crotalfina em animais submetidos a injeção das células tumorais no fêmur

A

B

C

O limiar de dor está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como intensidade do estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B e C). As medidas foram realizadas no 14º dia após a injeção das células tumorais (4×10^6 células em 3 μ L de salina), imediatamente antes (tempo 0) e, 1, 3, 24, 48 e 72 horas após a administração da crotalina (8 μ g/Kg) ou salina (grupo controle). Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo salina (controle).

Figura 34 - Duração do efeito da crotalfina sobre a duração do tempo de lambida e levantamento da pata induzida pela injeção das células tumorais

A

B

A dor manifesta foi mensurada pelo tempo (em segundos, seg) de duração da lambida (A) e levantamento (B) das patas, durante um período de 10 minutos de observação. A crotalfina (8 μ g/kg) ou salina foram administradas no 14º dia da implantação das células tumorais (4x10⁶ células em 3 μ L de salina) e a dor manifesta foi avaliada imediatamente antes (tempo 0) e, 3, 24, 48 e 72 horas após a administração da crotalfina ou salina (grupo controle). Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo salina (controle).

4.8.2 Caracterização do tipo de receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo da crotalfina

Uma vez que dados da literatura demonstraram que a antinocicepção observada para a crotalfina em modelos de dor aguda e dor neuropática, é mediada por receptores opióides (GUTIERREZ, V. et al., 2008a; GUTIERREZ et al., 2012) e que o tipo de receptor opióide envolvido neste efeito depende do modelo nociceptivo utilizado, avaliamos presentemente o tipo de receptor opióide envolvido na antinocicepção observada neste modelo de dor óssea, utilizando antagonistas seletivos para cada tipo de receptor.

A injeção intraplantar de CTOP, antagonista de receptores opióides do tipo μ , não alterou o efeito antinociceptivo induzido pela crotalfina. Por outro lado, a administração de nor-BNI, antagonista de receptores opióides do tipo κ , bloqueou esta antinocicepção, enquanto que a administração de ICI 174,864, antagonista de receptores opióides do tipo δ , reverteu parcialmente o efeito anti-hiperalgésico e antialodínico induzido pela crotalfina (Figura 35 A e B). Os antagonistas *per se*, não interferiram com o limiar nociceptivo da pata contralateral (controle) (Figura 36 C) ou com a hiperalgesia e alodinia induzidas pelo desenvolvimento da neoplasia óssea (Figura 35 A, B, C e D). É importante salientar que os antagonistas, quando injetados na pata ipsilateral, não reverteram a antinocicepção causada pela administração de crotalfina, na pata contralateral. Estes dados indicam que nestas doses, os antagonistas utilizados tem apenas efeito local.

Em relação ao fenômeno de “mirror image pain”, a administração do antagonista κ , na pata contralateral, reverteu totalmente o efeito antialodínico da crotalfina, enquanto o antagonista δ reverteu parcialmente este fenômeno. Por outro lado, o antagonista μ não interferiu com o efeito da crotalfina (Figura 35 D).

Figura 35 – Envolvimento de receptores opióides periféricos do tipo δ e κ no efeito antinociceptivo da crotalina

A

B

C

D

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como intensidade do estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B e C). A crotalfina (8 µg/kg,) ou salina foram administrada *p.o* no 14º dia da implantação das células tumorais (4×10^6 células em 3 µL de salina—pata esquerda) (A e B) ou injeção de salina (3 µL – pata direita) (C e D). O CTOP, antagonista seletivo de receptor μ (20 µg/pata), nor-BNI, antagonista seletivo de receptor κ (50 µg/pata) e ICI 174, 864, antagonista seletivo de receptores δ (10 µg/pata) foram administrados na pata esquerda (C) ou direita (D), imediatamente após a crotalfina ou salina. A hiperalgesia e alodinia foram avaliadas antes e 1 h após a administração do peptídeo ou salina. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o a medida basal (linha pontilhada) ** $p < 0,05$ comparação com o grupo salina # $p < 0,05$ comparação com o grupo CTOP e NOR.

4.8.3 Avaliação do desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo da crotalfina em modelo de dor óssea induzida pelas células do tumor de Walker 256

Uma vez que a crotalfina é uma substância tipo opióide e que o tratamento prolongado com fármacos opióides pode acarretar o desenvolvimento de tolerância ao seu efeito antinociceptivo (WANG, J. et al., 2012), avaliamos, no presente estudo o possível desenvolvimento desse fenômeno após tratamento prolongado com a crotalfina. Para tanto, os animais foram tratados com a crotalfina (8 µg/kg) ou salina (controle), empregando 2 diferentes protocolos experimentais.

No primeiro protocolo, crotalfina ou salina foram administradas a cada 2 dias, durante o período de 15 dias, iniciando-se o tratamento no 1º do pós-cirúrgico (Figuras 36 A e B). No segundo protocolo, a crotalfina ou salina foram administradas diariamente, durante 14 dias, iniciando o tratamento no 1º dia do pós-operatório (Figuras 37 A e B).

A morfina, utilizada como controle positivo, foi administrada por via s.c., na dose de 5,0 mg/kg, diariamente, uma vez ao dia, durante 6 dias, (Figuras 37 A e B).

Independentemente do protocolo utilizado, a administração de crotalfina acarretou inibição da hiperalgesia (Figura 36 A, 37 A) e alodinia (Figura 36 B, 37 B), de mesma intensidade, durante todo o período de tratamento, não sendo observado o fenômeno de tolerância. Salina (controle), administrada por via oral, nas mesmas condições experimentais, não interferiu com os fenômenos nociceptivos acarretados pela injeção das células tumorais (Figuras 36 e 37).

Diferentemente da crotalfina, os animais tratados com morfina, tornaram-se tolerantes ao seu efeito antinociceptivo, a partir do 6º dia após o início do tratamento (Figura 37).

Ainda, nestes animais foi realizada a avaliação histopatológica da implantação do tumor ósseo após tratamento prolongado com a crotalfina. As fotomicrografias analisadas mostram, no sétimo dia após a inoculação das células tumorais, invasão do tecido ósseo por estas células e destruição óssea. Estas mesmas alterações são também observadas no décimo quarto (Figura 38). O tratamento com crotalfina, em ambos os protocolos, não foi capaz de interferir com a evolução e metastização do tumor (Painel A, B e C).

Figura 36 – Efeito do tratamento a cada 2 dias, durante 15 dias, com a crotalfina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela administração das células tumorais no fêmur de ratos

A

B

Na hiperalgesia, o limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). Na alodinia, o limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B). A crotalfina (8 $\mu\text{g/kg}$) foi administrada a cada 2 dias, por um período de 15 dias, iniciando-se o tratamento a partir do 1º dia após a implantação das células tumorais (4×10^6 células em $3 \mu\text{L}$ de salina). Animais tratados com salina, nas mesmas condições experimentais, constituem o grupo controle. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle.

Figura 37 - Efeito do tratamento diário, durante 14 dias, com crotalfina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas com a crotalfina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pela administração das células tumorais no fêmur de ratos

A

B

Na hiperalgesia, o limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). Na alodinia, o limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em gramas (g) necessária para induzir a retirada da pata (B). A crotalfina (8 $\mu\text{g/kg}$) foi administrada diariamente, uma vez ao dia, a partir de 1º dia após a injeção das células tumorais (4×10^6 células em 3 μL de salina), por um período de 14 dias. Animais tratados com salina, nas mesmas condições experimentais, constituem o grupo controle. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle.

Figura 38 – Alterações histopatológicas de cortes histológicos de fêmur de rato 14 dias após a administração das células tumorais.

Painel A

Painel B

Painel C

Painel A - Fotomicrografia de corte histológico de fêmur de um rato do grupo controle (salina por via oral) obtido 14 dias após a injeção das células de tumor de Walker (4×10^6 células em 3 μ L de salina) no fêmur. Foi observada a invasão das células tumorais nas trabéculas ósseas e destruição óssea → H&E, 0,5X.

Painel B - Detalhe do painel A. H&E, 4X. **Painel C** - Fotomicrografia de corte histológico de fêmur de um rato do grupo experimental (crotalina 8 μ g/kg, por via oral) obtido 14 dias após a injeção das células de tumor de Walker (4×10^6 células – 3 μ L) no fêmur. Em detalhe observar crescimento de células tumorais e necrose do tecido ósseo →. H&E, 4X.

5 DISCUSSÃO

Como mencionado na Introdução, estudos experimentais têm mostrado que a crotalina, um peptídeo obtido do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, apresenta potente atividade antinociceptiva, quando avaliada em diversos modelos experimentais de dor aguda e crônica (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; KONNO et al., 2008). Apesar desses dados, não havia sido avaliado ainda, o efeito deste peptídeo na dor de câncer ósseo. A dor é um sintoma comumente relatado em pacientes com neoplasia, incluindo neoplasias ósseas, sendo muitas vezes severa e de difícil controle, interferindo com a qualidade de vida dos pacientes (PAYNE, 1997a; PORTENOY; LESAGE, 1999). Portanto, é grande o interesse científico e médico no desenvolvimento de modelos experimentais de cancer que mimetizem os sintomas de dor (hiperalgesia, alodinia e dor manifesta) descritos em humanos (REGAN; PENG, 2000), com o intuito de melhor compreender os mecanismos envolvidos na gênese desta dor, bem como de favorecer a pesquisa de fármacos analgésicos mais eficazes.

Assim, o objetivo geral deste estudo foi padronizar um modelo de dor óssea induzida em ratos, pela inoculação de células do tumor de Walker 256 na cavidade medular do fêmur dos animais e avaliar o efeito da crotalina no controle da nocicepção causada pela implantação óssea do tumor. É importante salientar que, apesar da existência de modelos de dor de câncer resultantes da injeção, em roedores, de células tumorais, não havia ainda demonstrada, experimentalmente, se a administração na cavidade femoral de ratos, de células do tumor de Walker 256, seria capaz de originar um modelo de dor óssea, com a presença de hiperalgesia, alodinia e dor manifesta, bem como de induzir dor óssea compatível com o desenvolvimento deste processo patológico.

No presente estudo, foi realizada, primeiramente, a padronização do modelo de dor óssea induzida pela injeção intraóssea das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos. A implantação do tumor foi avaliada inicialmente, por meio da utilização de cintilografia óssea. Os resultados indicaram a presença do tumor no fêmur dos ratos, a partir do 7º dia após a inoculação das células tumorais, uma vez que foi detectada, neste período, a incorporação do radiofármaco ^{99m}Tc -MDP. Esta incorporação se acentuou no 14º dia, permanecendo até o 21º dia. Estudos subsequentes de curva de sobrevivência, mostrando a ocorrência significativa de óbitos a partir do 18º dia (71,42%), nos levaram a escolher o 14º dia após a injeção das células tumorais para a realização dos estudos subsequentes.

As imagens obtidas mostraram alterações ósseas compatíveis com a implantação e crescimento das células tumorais, caracterizadas pela presença de intensa atividade osteogênica e destruição progressiva do tecido ósseo (região cortical e periósteo). Além da destruição óssea, foi também detectado o crescimento tumoral nas áreas adjacentes ao fêmur (tecidos moles). Esses achados experimentais corroboram dados clínicos observados em pacientes com neoplasias ósseas (FILHO, 2005).

Dados de literatura tem mostrado que a injeção de células tumorais em diferentes tipos de osso, promove intensa destruição do tecido ósseo. O primeiro modelo experimental de câncer ósseo foi descrito por Schwei e colaboradores (1999) (SCHWEI et al., 1999). Estes autores mostraram que após 21 dias da injeção de células tumorais do tipo NCTC 2472, um sarcoma osteolítico, na cavidade medular do fêmur de camundongos, ocorre intensa destruição óssea, com perda de tecido pelo canal medular. Mais recentemente, Tong e colaboradores (2010) observaram que as células do tumor de Walker 256, injetadas na tíbia de ratos, induzem destruição óssea progressiva do 9º ao 21º dia após a inoculação destas células (TONG et al., 2010).

Além das avaliações descritas acima, foram também realizadas no presente estudo análises histopatológicas de diferentes tecidos e órgãos, visando a melhor caracterização do modelo. Os resultados mostraram a presença de células tumorais na cavidade medular do fêmur, acompanhada de necrose e intensa destruição óssea. Foi também observada a presença de células tumorais na musculatura adjacente e no pulmão, baço e fígado dos animais, indicando a disseminação e metastização do tumor. Nossos dados corroboram os achados clínicos observados em pacientes com tumores ósseos malignos, que se mostram multicompartimentais, isto é, extracompartimentais (FILHO, 2005). Esses tumores destroem o tecido cortical óssea e crescem em direção aos tecidos moles adjacentes (FILHO, 2005).

Dados da literatura indicam que o tumor de Walker 256 é bastante agressivo e quando estas células são inoculadas na medula óssea, crescem localmente, invadem tecidos adjacentes e disseminam-se para os órgãos. Em decorrência destas características, estas células são amplamente utilizadas em ensaios experimentais para padronização de diferentes modelos de câncer (BADRAOUI; REBAI, 2012). Os dados obtidos no nosso estudo corroboram com estudos realizados anteriormente, também pelo nosso grupo, mostrando que o tumor de Walker 256 possui grande capacidade de metastização, por via linfática, a partir do 7º dia após a inoculação das células no coxim plantar dos animais (BRIGATTE et al., 2007). Cabe

ressaltar, que na presente condição experimental, foram visualizadas células tumorais no baço, indicando que houve disseminação do tumor neste órgão linfoide.

Apesar da existência de dados anteriores mostrando que células do tumor de Walker 256 tem sido utilizadas para a padronização de modelos de câncer ósseo (MAO-YING et al., 2008; MAO-YING et al., 2006), é importante salientar que este é o primeiro trabalho que sistematicamente caracteriza, por meio da utilização de técnicas de imagem (radiológicas, cintilográficas e morfológicas), a implantação de um tumor na cavidade femoral de ratos.

Adicionalmente às análises de imagem, foram avaliados parâmetros como curva de evolução ponderal e medida de ingestão de ração e água. Foi detectada diminuição da evolução ponderal, uma vez que no 14º dia após a injeção das células, o animal com tumor perdeu 12% do seu peso corpóreo, enquanto que o animal “naive” teve um acréscimo de 30% no seu peso. Foi também detectada diminuição do consumo de ração, neste período. É importante salientar a ocorrência de número significativo de óbitos, no 18º (71,42%).

A manifestação mais comum de câncer avançado é a perda de peso seguida de caquexia. A caquexia associada ao câncer, inclui anorexia, perda de peso, perda e atrofia de massa muscular (ARGILES et al., 2003; SILVA, 2006). Em geral, a avaliação desses parâmetros é realizada com o intuito de monitorar a evolução de uma doença crônica, levando-se em consideração o desconforto induzido pela cronificação dos processos patológicos (SILVA, 2006).

Uma vez caracterizada a presença do tumor, foi avaliada, também em diversos tempos após a injeção das células, a presença de hiperalgesia, alodinia e dor manifesta, fenômenos que caracterizam a dor de câncer ósseo (REGAN; PENG, 2000). Nossos resultados indicaram que a injeção intramedular das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos, acarreta o desenvolvimento destes fenômenos nociceptivos, detectados 24 horas após a injeção das células e que persistiram por pelo menos, 14 dias. É interessante notar que nossos resultados mostram o desenvolvimento do fenômeno de alodinia mecânica tanto na pata ipsilateral, quanto na pata contralateral à injeção de células tumorais, indicando o fenômeno descrito como “mirror image pain”. Este fenômeno é observado em pacientes com múltiplas síndromes dolorosas, particularmente neuropatias e processos inflamatórios, bem como experimentalmente (CHACUR et al., 2001; WANG et al., 2008). Mao-Ying et al. (2006) também observaram a presença desse fenômeno em modelo de câncer ósseo induzido na tíbia de ratos. O desenvolvimento do fenômeno de “mirror-image pain” parece estar relacionado

com a ativação, na medula espinhal, de células da glia, produção de citocinas pró-inflamatórias, além de modificações morfológicas de neurônios (MAO-YING et al., 2006).

Uma vez que os resultados indicaram a presença de hiperalgesia e alodinia já no 1º dia após a inoculação do tumor de Walker 256 no fêmur dos animais, e que a inoculação destas células envolve processo cirúrgico e lesão tecidual, investigamos a contribuição do processo inflamatório para os fenômenos nociceptivos observados. Para tanto, foi utilizada indometacina, um inibidor de ciclo-oxigenases (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008). A administração desse inibidor, por via endovenosa, no 1º, 3º, 7º e 14º dias após a cirurgia, inibiu apenas parcialmente, a hiperalgesia, não interferindo com o fenômeno de alodinia induzida pela administração das células tumorais. Estes dados indicam que prostanóides estão envolvidos, pelo menos em parte, nos fenômenos nociceptivos acarretados pela injeção das células tumorais.

O envolvimento de prostanóides na dor decorrente de processos neoplásicos, tem sido demonstrado. Antiinflamatórios não esteroidais são comumente utilizados como terapia complementar para reduzir a dor originada de processos metastáticos. Neste sentido, foi observado que a utilização de inibidores seletivos da ciclooxigenase 2 é capaz de inibir fenômenos nociceptivos, em diferentes modelos experimentais de câncer ósseo (FOX et al., 2004; SABINO et al., 2002; SAITO et al., 2005).

Ainda, para melhor caracterizar este modelo de dor óssea, avaliamos presentemente, o efeito de drogas analgésicas usualmente utilizadas na clínica médica.

Os fármacos opióides estão entre os analgésicos mais importantes no controle da dor de origem neoplásica (PAYNE, 1997a; b; WOOTTON, 2004). Assim, investigamos, presentemente, se a morfina, o protótipo de drogas opióides, seria capaz de interferir com os fenômenos nociceptivos observados no nosso modelo experimental. Nossos dados mostrando que a morfina, na dose 5,0 mg/kg, inibe, parcialmente, a hiperalgesia e alodinia (pata ipsi e contralateral) acarretadas pela implantação no tumor no fêmur dos ratos, corroboram dados da literatura que indicam que o tratamento da dor oncológica com opióides não é totalmente efetiva, sendo necessária, muitas vezes, a administração de altas doses destes opióides, para a indução de analgesia em pacientes com esse tipo de dor (LUGER et al., 2002; LUGER et al., 2005; PERGOLIZZI et al., 2008). Experimentalmente, King et al (2007) observaram, em camundongos com câncer ósseo, tratados com morfina por uma semana, aumento dos fenômenos nociceptivos e do processo de destruição óssea, quando comparado aos animais controles (KING et al., 2007).

A pouca efetividade dos opióides na dor de câncer ósseo tem sido correlacionada ao componente neuropático desta dor. Evidências clínicas têm sugerido que a ineficácia do tratamento com opióides é decorrente da redução na sensibilidade aos opióides, observada nestas condições (PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar este fato, entre eles, a ocorrência de alterações nos receptores opióides espinhais ou nos mecanismos de transdução de sinal após a ativação destes receptores (PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001).

Cabe ressaltar que, nas nossas condições experimentais, não foi possível utilizar doses maiores de morfina, uma vez que no teste do campo aberto, doses mais elevadas deste opióide promovem alterações nas frequências de locomoção e levantamento dos animais e depressão respiratória, o que pode interferir com a avaliação do efeito antinociceptivo (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008).

Além da morfina, avaliamos presentemente a efetividade da gabapentina, um anticonvulsivante que também é utilizado com analgésico em processos de dor crônica (PETERS et al., 2005), incluindo dor resultante de câncer ósseo. Ensaios clínicos tem mostrado a efetividade da pregabalina (estruturalmente relacionada a gabapentina) no alívio da dor de câncer ósseo, relacionado principalmente a processos metastáticos (PETERS et al., 2005).

Peters e colaboradores (2005) observaram, em modelo experimental de osteosarcoma, que o tratamento crônico com a gabapentina atenua tanto a dor manifesta quanto a dor evocada por movimento, comportamentos relacionados à dor de câncer ósseo. Esses achados sugerem que mecanismos neuropáticos podem estar envolvidos neste tipo de dor. Com base nesses dados, avaliamos presentemente, a efetividade da gabapentina em nosso modelo experimental. O tratamento prolongado (diário, por 14 dias) com a gabapentina (200 mg/kg, p.o.) foi eficaz em reverter parcialmente a nocicepção induzida pelo câncer ósseo, tanto na pata ipsilateral injetada com as células tumorais, como também na pata contralateral injetada com solução salina estéril. A dose empregada nesta avaliação esteve baseada em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo, mostrando sua efetividade em modelo de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008). Além da efetividade nesse modelo de neuropatia, não foram observadas, para essa dose, alterações motoras dos animais.

Outra classe de fármacos amplamente utilizada para o tratamento da dor de câncer ósseo, é a dos bisfosfonatos. Estes fármacos são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (BOONECAMP et al., 1986) e são efetivos na redução das

concentrações de cálcio no soro de pacientes com hipercalemia maligna (KANIS et al., 1987). Além disso, estes fármacos são considerados nova modalidade de tratamento para metástases ósseas, já que reduzem a quantidade e a taxa de complicações esqueléticas no mieloma múltiplo e no câncer de mama avançado (BERENSON, 1996; HORTOBAGYI et al., 1996). Outra característica importante dos bisfosfanatos é a capacidade de aliviar a dor óssea causada por metástases de vários tumores, o que favorece melhora na qualidade de vida do paciente (ERNST, H. et al., 1992; PUROHIT et al., 1994). No presente estudo, o tratamento único com o ácido zoledrônico (78µg/kg, i.v.) (NYANGOGA et al., 2010), um bisfosfanato, imediatamente após a injeção das células do tumor de Walker 256 na cavidade medular do fêmur dos animais, resultou na inibição parcial do desenvolvimento dos fenômenos nociceptivos durante todo o período de avaliação (14 dias).

Uma vez demonstrado, em nosso modelo experimental, que fármacos utilizados clinicamente para o controle da dor de câncer ósseo, induzem efeito antinociceptivo, investigamos a capacidade da crotalfina em acarretar antinocicepção neste modelo. Os dados mostraram que a crotalfina, a dose de 8 µg/kg, bloqueou a hiperalgesia, alodinia e a dor espontânea induzidas pela inoculação das células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos. Adicionalmente, este peptídeo reverteu o fenômeno de “mirror image pain”. Esse efeito foi de longa duração, persistindo por 2 dias após uma única administração oral do peptídeo. Ensaios farmacológicos demonstraram ainda, que este efeito é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo κ e δ . Cabe ressaltar que a dose presentemente utilizada para crotalfina, 8µg/kg, é maior do que as doses utilizadas para este peptídeo, nos estudos anteriores, em modelos de dor aguda e dor neuropática (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012; KONNO et al., 2008). Estes resultados corroboram dados da literatura que relatam a necessidade de utilização de doses mais altas de analgésicos em processos crônicos, como por exemplo, em neoplasias ósseas, para se obter analgesia satisfatória (JIMENEZ-ANDRADE; MANTYH et al., 2010).

Dados anteriores obtidos pelo nosso crônico já demonstraram a potente e duradoura atividade antinociceptiva da crotalfina, em modelos experimentais de dor aguda e crônica (BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012). Na hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂) em ratos, a crotalfina acarreta efeito antinociceptivo, quando administrada em baixas doses (0,008 a 0,2 µg /kg), pelas vias sistêmica (oral e intravenosa) e subcutânea (intraplantar) (KONNO et al., 2008). O efeito antinociceptivo da crotalfina é também observado no modelo de hiperalgesia inflamatória

induzida por carragenina e em modelos de dor crônica, como a dor neuropática decorrente da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (GUTIERREZ, V. P. et al., 2008). Em todos os modelos, o efeito antinociceptivo é de longa duração (3 dias nos modelos de nocicepção crônica e por até 5 dias nos modelos de hiperalgesia inflamatória) e mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo κ e δ . É importante salientar que a mediação por receptores opióides (κ e/ou δ) é determinada pelo tipo de modelo utilizado, ativação de receptores do tipo κ (modelos de dor aguda) ou κ e δ (modelos de dor crônica) (GUTIERREZ et al., 2012). A diferença de estímulo observada nos diferentes modelos pode facilitar a expressão de diferentes tipos de receptores opióides o que justifica a diferença na mediação κ e/ou δ observada (ZAMBELLI, 2011).

Uma vez que o efeito analgésico da crotalfina envolve a participação de receptores opióides e que o tratamento prolongado com fármacos opióides induz o aparecimento de tolerância ao efeito analgésico (JASINSKI, 1997; WANG, Y. et al., 2012), foi nosso objetivo avaliar se o tratamento prolongado com a crotalfina seria capaz de induzir este fenômeno. Neste estudo, dois diferentes protocolos de tratamento foram utilizados, baseado nos resultados mostrando que o efeito antinociceptivo da crotalfina neste modelo de dor, é detectado por 2 dias. Nestes protocolos, a crotalfina foi administrada a cada 2 dias, durante 15 dias, ou diariamente, uma vez ao dia, durante 14 dias. Os dados obtidos indicam que o tratamento prolongado com esse peptídeo não acarreta tolerância ao seu efeito antinociceptivo, uma vez que, em ambos os protocolos utilizados, a crotalfina manteve sua potencia analgésica. Estes resultados corroboram dados obtidos por nós em modelo de constrição crônica do nervo isquiático (GUTIERREZ, V. et al., 2008b). Por outro lado, o tratamento prolongado com morfina, utilizada como controle positivo, acarretou tolerância no 6º dia do tratamento.

Cabe ressaltar que os resultados ora obtidos e também detectados em estudos anteriores (Konno et al., 2008; Gutierrez et al., 2012) tem indicado que a crotalfina, ao contrário da morfina, não ativa receptores opióides do tipo μ . Dados recentes da literatura (WANG, Y. et al., 2012) sugerem que a tolerância a morfina, pode resultar da liberação do fator de crescimento derivado de plaqueta- β (PDGF- β), consequente à ativação do receptor opióide. O PDGF- β , por sua vez, causa dessensibilização heteróloga do receptor μ . Foi observado ainda, que camundongos tratados com PDGF- β tornam-se tolerantes ao efeito da morfina e que o bloqueio da ativação dos receptores PDGFR- β impede o desencadeamento do fenômeno da tolerância.

No presente estudo, foram também realizadas análises histopatológicas do tecido ósseo de animais tratados prolongada mente com a crotalfina. Os resultados mostraram que, apesar do efeito antinociceptivo, este peptídeo não interfere com as alterações acarretadas pela implantação das células tumorais, corroborando os dados da literatura que mostram que o tratamento com opióides, apesar de causar alívio da dor relacionada ao câncer ósseo, não interfere com a progressão do tumor (PORTENOY; LESAGE, 1999).

Nossos resultados em conjunto, indicam que a injeção de células do tumor de Walker 256 no fêmur de ratos, acarreta alterações compatíveis com às observadas em neoplasias ósseas, incluindo a presença de fenômenos nociceptivos características desse tipo de neoplasia. Os dados mostrando a efetividade antinociceptiva da crotalfina, sugerem que este peptídeo pode se tornar um importante agente terapêutico, destituído de alguns dos efeitos colaterais característicos de drogas com atividade opióide. Estes dados apontam para a importância do estudo da crotalfina como possível fármaco no controle da dor de origem neoplásica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que:

- ✓ a injeção das células do tumor de Walker 256 na cavidade medular do fêmur de ratos acarreta alterações metabólicas e histopatológicas compatíveis com o desenvolvimento de neoplasia no osso dos animais.
- ✓ a injeção das células do tumor de Walker 256 no fêmur dos ratos induz o aparecimento de fenômenos nociceptivos (hiperalgesia, alodinia, manifesta e “mirror image pain”). Estes fenômenos são detectados no 1º dia após a injeção das células e permanecem até pelo menos 14 dias após a injeção;
- ✓ a administração de fármacos com atividade analgésica, usualmente utilizados na clínica médica para o tratamento da dor de câncer ósseo (indometacina, morfina, gabapentina e ácido zoledrônico), inibiram, apenas parcialmente, os fenômenos nociceptivos acarretados pela implantação das células do tumor de Walker, no fêmur dos animais;
- ✓ a crotalfina bloqueou a hiperalgesia, alodinia e dor espontânea acarretadas pela implantação das células do tumor de Walker no fêmur de ratos. O efeito antinociceptivo é de longa duração (2 dias) e mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo *kappa* e *delta*;
- ✓ o tratamento prolongado com a crotalfina, diferentemente do observado para a morfina, não acarreta o desenvolvimento de tolerância ao seu efeito antinociceptivo neste modelo de dor óssea.

REFERÊNCIAS

- AIRD, S. D. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1040, n. 2, p. 217-224, 1990.
- ALEXANDRESCU, C. et al. Tumor thrombus in right atrium from lung adenocarcinoma. **Ann. Thorac. Surg**, v. 87, n. 2, p. e11-12, 2009.
- ALEXANDRESCU, D. T. et al. Development of squamous cell carcinomas in Darier disease: a new model for skin carcinogenesis? **Br. J. Dermatol**, v. 159, n. 6, p. 1378-1380, 2008.
- ARGILES, J. M. et al. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v. 35, n. 4, p. 405-409, 2003.
- BADRAOUI, R.; REBAI, T. Effect of malignant ascites on antioxidative potency of two tumoral cells-induced bone metastases: Walker 256/B and MatLyLu. **Exp. Toxicol. Pathol**, v. 64, n. 1-2, p. 65-68, 2012.
- BARDOS, H. et al. Fibrin deposition in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. **Thromb. Haemost**, v. 80, n. 5, p. 767-772, 1998.
- BARLOCCO, D. et al. The opioid-receptor-like 1 (ORL-1) as a potential target for new analgesics. **Eur. J. Med. Chem**, v. 35, n. 3, p. 275-282, 2000.
- BENFORD, H. L. et al. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, v. 28, n. 5, p. 465-473, 2001.
- BERENSON, J. Pamidronate in the treatment of osteolytic bone lesions in multiple myeloma patients--the American experience. **Br. J. Clin. Pract. Suppl**, v. 87, p. 5-7; discussion 13-14, 1996.
- BLOOM, A. P. et al. Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. **J. Pain**, v. 12, n. 6, p. 698-711, 2011.
- BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989.
- BRASIL, Ministério da saúde. Alívio da dor de câncer. Brasília, 1991.
- BRASIL, Ministério da saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, 1998.
- BRASIL, Ministério da saúde. Cuidados Paliativos oncológicos: controle da dor. In: INCA. Rio de Janeiro, 2001.
- BRASIL, ABC do Câncer - abordagens básicas para o controle do câncer., São Paulo, 2011. Acesso em: 10/12/2012.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BRENTANI, M. M. Bases da oncologia. In: (Ed.). 2. ed. São Paulo: Tecmedd
- BRENTANI, M. M. Fatores de crescimento. In: SNITCOVSKY, I. (Ed.). **Bases da oncologia**. 2. ed. . São Paulo: Tecmedd, 2003b. p.168-176.
- BRENTANI, M. M. O controle do câncer. In: COELHO, F. R. G. (Ed.). **Bases da oncologia**. 2. ed. São Paulo: Tecmedd Editora., 2003c. p.3-24.
- BRENTANI, M. M. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: CAMARGO, A. C. (Ed.). **Bases da oncologia**. 2. ed. São Paulo: Tecmedd v.2, 2003d. p.71-86.
- BRENTANI, M. M. Oncogenética. In: ROCHA, J. C. C. (Ed.). **Bases da oncologia**. 2. ed. São Paulo: Tecmedd Editora, 2003e. p.423-432.
- BRIGATTE, P. et al. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J. Pain**, v. 8, n. 5, p. 412-421, 2007.
- BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr. Psychosom. Med**, v. 1, p. 63-69, 1960.
- BUGA, S.; SARRIA, J. E. The management of pain in metastatic bone disease. **Cancer Control**, v. 19, n. 2, p. 154-166, 2012.
- CAHILL, C. M. et al. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. **Pain**, v. 101, n. 1-2, p. 199-208, 2003.
- CALIGNANO, A. et al. A role for the endogenous cannabinoid system in the peripheral control of pain initiation. **Prog. Brain Res**, v. 129, p. 471-482, 2000.
- CARR, J. et al. Lymphatic metastasis: invasion of lymphatic vessels and efflux of tumour cells in the afferent popliteal lymph as seen in the Walker rat carcinoma. **J. Pathol.**, v. 132, n. 4, p. 287-305, 1980.
- CHACUR, M. et al. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. **Pain**, v. 94, n. 3, p. 231-244, 2001.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.
- CHRISTIE, M. J. et al. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, v. 27, n. 7, p. 520-523, 2000.
- CLOHISY, D. R.; MANTYH, P. W. Bone cancer pain. **Cancer**, v. 97, n. 3 Suppl, p. 866-873, 2003.
- CLOHISY, D. R. et al. Tumor osteolysis in osteopetrotic mice. **J. Orthop. Res**, v. 13, n. 6, p. 892-897, 1995.

- COXON, F. P. et al. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. **Mol .Pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 631-638, 1998.
- CULO, F. et al. Ascitic versus solid growth of Ehrlich ascites tumor influenced by immunological factors. **Oncology**, v. 35, n. 1, p. 15-21, 1978.
- DELLEMIJN, P. L. et al. Prolonged treatment with transdermal fentanyl in neuropathic pain. **J. Pain Symptom Manage**, v. 16, n. 4, p. 220-229, 1998.
- DRAKE, M. T. et al. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc**, v. 83, n. 9, p. 1032-1045, 2008.
- DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch. Neurol**, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.
- EARLE, W. R. A study of Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **American Journal of Cancer**, v. 24, p. 556-612, 1935.
- ERNST, D. S. et al. A double-blind, crossover trial of intravenous clodronate in metastatic bone pain. **J. Pain Symptom Manage**, v. 7, n. 1, p. 4-11, 1992.
- ERNST, H. et al. Osteochondroma in laboratory rats: a report of 3 cases in a Fischer-344, a Sprague-Dawley, and a Wistar rat. **Toxicol. Pathol.**, v. 20, n. 2, p. 264-267, 1992.
- FERNANDES, J. K. et al. Overview of the management of differentiated thyroid cancer. **Curr.Treat. Options Oncol.**, v. 6, n. 1, p. 47-57, 2005.
- FILHO, R. J.-G. Estadiamento dos Tumores. **Diagnóstico e Tratamento de Tumores Ósseos**. Rio de Janeiro: Elsevier v.1, 2005. p.55-82.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. **Adv. Cancer Res**, v. 43, p. 175-203, 1985.
- FOX, A. et al. Anti-hyperalgesic activity of the cox-2 inhibitor lumiracoxib in a model of bone cancer pain in the rat. **Pain**, v. 107, n. 1-2, p. 33-40, 2004.
- FRITH, J. C. et al. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. **J. Bone Miner Res.**, v. 12, n. 9, p. 1358-1367, 1997.
- FURMANSKI, P. et al. Molecular mechanisms of tumor development and progression: new targets for prevention, diagnosis, and therapy--a pathology B study section workshop. Working report from the Division of Research grants, National Institutes of Health. **Cancer Res.**, v. 53, n. 20, p. 5055-5059, 1993.
- GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1796, n. 2, p. 293-308, 2009.
- GRANÃ, X. R., E.P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth supressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogenese**, v. 11, p. 211-219, 1995.

GREEN, J. R. Anti-tumor potential of bisphosphonates. **Med. Klin. (Munich)**, v. 95 Suppl 2, p. 23-28, 2000.

GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 594, n. 1-3, p. 84-92, 2008.

GUTIERREZ, V. P. et al. The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K(+) channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 23, n. 1, p. 14-24, 2012.

HALVORSON, K. G. et al. Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer. **Clin. J. Pain**, v. 22, n. 7, p. 587-600, 2006.

HANNUN, Y. A. B., R.M. Signal transduction in cancer. **Cancer medicine**. 3°. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.48-65.

HEROLD, S. et al. Facilitating replication under stress: an oncogenic function of MYC? **Nat Rev. Cancer**, v. 9, n. 6, p. 441-444, 2009.

HONORE, P. et al. Cellular and neurochemical remodeling of the spinal cord in bone cancer pain. **Prog. Brain Res.**, v. 129, p. 389-397, 2000.

HORTOBAGYI, G. N. et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 335, n. 24, p. 1785-1791, 1996.

HUGHES, J. H. et al. p53 immunoreactivity in primary and metastatic prostatic adenocarcinoma. **Mod. Pathol.**, v. 8, n. 5, p. 462-466, 1995.

JAGDEV, S. P. et al. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. **Br. J. Cancer**, v. 84, n. 8, p. 1126-1134, 2001.

JAGDEV, S. P. et al. Comparison of the effects of intravenous pamidronate and oral clodronate on symptoms and bone resorption in patients with metastatic bone disease. **Ann. Oncol.**, v. 12, n. 10, p. 1433-1438, 2001.

JASINSKI, D. R. Tolerance and dependence to opiates. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v. 41, n. 1 Pt 2, p. 184-186, 1997.

JIMENEZ-ANDRADE, J. M. et al. Pathological sprouting of adult nociceptors in chronic prostate cancer-induced bone pain. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 44, p. 14649-14656, 2010.

JIMENEZ-ANDRADE, J. M. et al. Bone cancer pain. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1198, p. 173-181, 2010.

JIMENEZ ANDRADE, J. M.; MANTYH, P. **Cancer Pain: From the Development of Mouse Models to Human Clinical Trials**. 2010.

JONGKAMONWIWAT, N. et al. The presence of opioid receptors in rat inner ear. **Hear Res.**, v. 181, n. 1-2, p. 85-93, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 e.d. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2008.

KING, T. et al. Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. **Pain**, v. 132, n. 1-2, p. 154-168, 2007.

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293-1304, 2008.

LICATA, A. A. Bisphosphonate therapy. **Am. J. Med. Sci.**, v. 313, n. 1, p. 17-22, 1997.

LIPTON, A. Biochemical bone markers in breast cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v. 32 Suppl 1, p. 20-22, 2006a.

LIPTON, A. Future treatment of bone metastases. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 20 p. 6305s-6308s, 2006b.

LIPTON, A. et al. Advances in treating metastatic bone cancer: summary statement for the First Cambridge Conference. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 20 Pt 2, p. 6209s-6212s, 2006.

LIPTON, A. et al. Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. **Cancer**, v. 113, n. 1, p. 193-201, 2008.

LOPEZ-OLIVO, M. A. et al. Bisphosphonates in the treatment of patients with lung cancer and metastatic bone disease: a systematic review and meta-analysis. **Support Care Cancer**, v. 20, n. 11, p. 2985-2998, 2012.

LOZANO-ONDOUA, A. et al. Disease modification of breast cancer-induced bone remodeling by cannabinoid 2 receptor agonists. **J. Bone Miner Res.**, 2012.

LUCKMAN, S. P. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. **J. Bone Miner Res.**, v. 13, n. 4, p. 581-589, 1998.

LUCKMAN, S. P. et al. JBMR anniversary classic. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. Originally published in Volume 7, number 4, pp 581-9 (1998). **J. Bone Miner Res.**, v. 20, n. 7, p. 1265-1274, 2005.

LUGER, N. M. et al. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 397-406, 2002.

- LUGER, T. J. et al. The effect of ciprofloxacin and gentamicin on spinal morphine-induced antinociception in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 96, n. 5, p. 366-374, 2005.
- MANCHESTER, K. L. Theodor Boveri and the origin of malignant tumours. **Trends Cell Biol.**, v. 5, n. 10, p. 384-387, 1995.
- MANTYH, P. W. et al. Molecular mechanisms of cancer pain. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 201-209, 2002.
- MAO-YING, Q. L. et al. Analgesic effects of electroacupuncture combined with Celebrex on rats with tibial cancer pain. **Cancer** v. 6, n. 8, p. 830-835, 2008.
- MAO-YING, Q. L. et al. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 345, n. 4, p. 1292-1298, 2006.
- MARIA, D. A. et al. Mononuclear cell cytotoxicity in rats with Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 6, p. 1343-1346, 1994.
- MATTOS, M. C. et al. Walker 256 carcinoma sarcoma: pathology microscopic and ultrastructural features of the circulant cells. **Ciência e Cultura**, v. 32, p. 849-857, 1980.
- MCBRIDE, W. H. Phenotype and functions of intratumoral macrophages. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 865, n. 1, p. 27-41, 1986.
- MELCHIORRI, P. et al. Long-term sensitization to the activation of cerebral delta-opioid receptors by the deltorphin Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ in rats exposed to morphine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, n. 9, p. 3696-3700, 1992.
- MILLIGAN, E. D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain Res.**, v. 861, n. 1, p. 105-116, 2000.
- MILLIGAN, E. D. et al. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 1026-1040, 2003.
- MISHIMA, K. et al. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 38, n. 5, p. 468-474, 2002.
- MORIOKA, T. et al. Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. **Neurosurgery**, v. 30, n. 6, p. 891-896, 1992.
- MOUEDDEN, M. E.; MEERT, T. F. Pharmacological evaluation of opioid and non-opioid analgesics in a murine bone cancer model of pain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 86, n. 3, p. 458-467, 2007.
- NAGY, J. A. et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 948, n. 3, p. 305-326, 1989.

- NAGY, J. A. et al. Pathogenesis of ascites tumor growth: angiogenesis, vascular remodeling, and stroma formation in the peritoneal lining. **Cancer Res.**, v. 55, n. 2, p. 376-385, 1995.
- NEGRI, M. et al. Plasma opioid levels during extracorporeal gallstone lithotripsy. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 88, n. 7, p. 1093-1096, 1993.
- NYANGOGA, H. et al. A single pretreatment by zoledronic acid converts metastases from osteolytic to osteoblastic in the rat. **Microsc. Res. Tech.**, v. 73, n. 8, p. 733-740, 2010.
- ORTIZ, M. I. et al. Pharmacological evidence for the activation of K(+) channels by diclofenac. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 438, n. 1-2, p. 85-91, 2002.
- PATEL, L. R. et al. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. **Future Oncol.**, v. 7, n. 11, p. 1285-1297, 2011.
- PATEL, L. R. et al. Cancer genome sequencing: understanding malignancy as a disease of the genome, its conformation, and its evolution. **Cancer Lett.**, v. 3, p. 125-128, 2012.
- PAYNE, R. Mechanisms and management of bone pain. **Cancer**, v. 80, n. 8 p. 1608-1613, 1997a.
- PAYNE, R. Relieving the pain of cancer. **Provider**, v. 23, n. 11, p. 123-124, 127, 1997b.
- PEARSON, P. L. V. D. L., R.B. The genetic analysis of cancer. **Journal of Internal Medicine**, v. 243, p. 413-417, 1998.
- PERGOLIZZI, J. et al. Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). **Pain Pract.**, v. 8, n. 4, p. 287-313, 2008.
- PETERS, C. M. et al. Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. **Exp. Neurol.**, v. 193, n. 1, p. 85-100, 2005.
- PICOLO, G. et al. Delta-Opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, p. 55-62, 2000.
- PIMENTA, C. A. et al. Pain, depression, and cultural concepts. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n. 3A, p. 370-380, 1997.
- PORTENOY, R. K.; LESAGE, P. Management of cancer pain. **Lancet.**, v. 353, n. 9165, p. 1695-1700, 1999.
- PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, n. 1-3, p. 79-91, 2001.
- PUROHIT, O. P. et al. High-dose intravenous pamidronate for metastatic bone pain. **Br. J. Cancer**, v. 70, n. 3, p. 554-558, 1994.

- RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. **Arch. Inst. Pharmacodyn.**, v. 111, p. 209-219, 1957.
- REGAN, J. M.; PENG, P. Neurophysiology of cancer pain. **Cancer Control**, v. 7, n. 2, p. 111-119, 2000.
- REISINE, T. et al. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 780, p. 168-175, 1996.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Oncologia. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p.125-132.
- ROCHA, J., SILVA SN. Oncogenética. **Bases da Oncologia**. 2º edição. São Paulo: p.423-432.
- ROSA, L. F. et al. Effects of various dietary fatty acids on enzyme activities of carbohydrate and glutamine metabolism and the metabolic response of lymphocytes and macrophages during Walker-256 ascites cell tumour growth in rats. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 29, n. 1, p. 33-45, 1993.
- SABINO, M. A. et al. Simultaneous reduction in cancer pain, bone destruction, and tumor growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. **Cancer Res.**, v. 62, n. 24, p. 7343-7349, 2002.
- SAITO, O. et al. Analgesic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs, acetaminophen, and morphine in a mouse model of bone cancer pain. **J. Anesth.**, v. 19, n. 3, p. 218-224, 2005.
- SAMARA, G. et al. Molecular mechanisms of tumor formation. **Am. J. Surg.**, v. 164, n. 4, p. 389-396, 1992.
- SCHWEI, M. J. et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 24, p. 10886-10897, 1999.
- SILVA, M. P. N. Síndrome da Anorexia-Caquexia. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 59-77, 2006.
- SIMONY, J. et al. Characterization of proliferative cells in malignant melanomas and their inflammatory infiltrates. **Cancer detect. prev.**, v. 15, n. 3, p. 183-187, 1991.
- SIMPKINS, H. et al. A morphological and phenotypic analysis of Walker 256 cells. **Cancer Res.**, v. 51, n. 4, p. 1334-1338, 1991.
- SIRICA, A. E. The pathobiology of neoplasia. In: (Ed.). 3. ed. . New York: Plenum Press, 1989. p.583 p.
- SNEDECOR, G. W. et al. Statistical methods Biometry. In: W.H. FREEMAN & CO (Ed.). 4 ed. Ames. New York: Owa State University Press, 1946. p.p.859.

- SOARES, F. A. et al. Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cells in vitro and during metastasis in vivo. **Lab. Invest.**, v. 71, n. 4, p. 480-489, 1994.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry. In: CO, W. H. F. (Ed.). New York: Elsevier, 1981. p.859.
- STEIN, C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 9, n. 1, p. 3-8, 2009.
- TAMOYO, R. P. Introducción a la patologia:mecanismos de la enfermedad. In: (Ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana, 1987. p.670 p. .
- TONG, W. et al. Spinal high-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia in a rat model of bone cancer pain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 395, n. 4, p. 572-576, 2010.
- TSAI, Y. C.; WON, S. J. Effects of tramadol on T lymphocyte proliferation and natural killer cell activity in rats with sciatic constriction injury. **Pain**, v. 92, n. 1-2, p. 63-69, 2001.
- TWYLCROSS, R. G.; FAIRFIELD, S. Pain in far-advanced cancer. **Pain**, v. 14, n. 3, p. 303-310, 1992.
- VIELHABER, A.; PORTENOY, R. K. Advances in cancer pain management. **Hematol. Oncol.Clin. North. Am.**, v. 16, n. 3, p. 527-541, 2002.
- WANG, J. et al. Topical treatment with Tong-Luo-San-Jie gel alleviates bone cancer pain in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 143, n. 3, p. 905-913, 2012.
- WANG, J. Y. et al. Mu-opioid receptor in the nucleus submedialis: involvement in opioid-induced inhibition of mirror-image allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem. Res.**, v. 33, n. 10, p. 2134-2141, 2008.
- WANG, Y. et al. Blockade of PDGFR-beta activation eliminates morphine analgesic tolerance. **Nat. Med.**, v. 18, n. 3, p. 385-387, 2012.
- WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia : the contribution of tumour necrosis factor α . **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, p. 417-424, 1997.
- WOOTTON, M. Morphine is not the only analgesic in palliative care: literature review. **J. Adv. Nurs.**, v. 45, n. 5, p. 527-532, 2004.
- YEAGER, M. P. et al. Morphine inhibits spontaneous and cytokine-enhanced natural killer cell cytotoxicity in volunteers. **Anesthesiology**, v. 83, n. 3, p. 500-508, 1995.
- YONEHARA, N.; TAKIUCHI, S. Involvement of calcium-activated potassium channels in the inhibitory prejunctional effect of morphine on peripheral sensory nerves. **Regul. Pept.**, v. 68, n. 3, p. 147-153, 1997.

ZAMBELLI, V. O. **Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos**. 160 f. (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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