

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Nicole Rodrigues da Silva

**HUF-101, um análogo do canabidiol, previne a alodinia
mecânica e térmica em modelo de dor neuropática periférica
induzida por quimioterápico**

RIBEIRÃO PRETO

2020

Nicole Rodrigues da Silva

**HUF-101, um análogo do canabidiol, previne a alodinia
mecânica e térmica em modelo de dor neuropática periférica
induzida por quimioterápico**

Aluna: Nicole Rodrigues da Silva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

RIBEIRÃO PRETO

2020

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Nicole Rodrigues

HUF-101, um análogo do canabidiol, previne a alodinia mecânica e térmica em modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico.

Ribeirão Preto, 2020.

102 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Francisco Silveira Guimarães

1. HUF-101 2. Neuropatia periférica induzida por quimioterápico 3. PPAR γ 4. Anti-inflamatório 5. Neuroprotetor.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, Nicole Rodrigues

Título: HUF-101, um análogo do canabidiol, previne a alodinia mecânica e térmica em modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutora em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ___ / ___ / 2020

Banca examinadora

Prof. Dr.: Francisco S. Guimarães

Assinatura: _____

Instituição: FMRP – USP

Profa. Dra.: Sâmia Regiane Lourenço Joca

Assinatura: _____

Instituição: FCFRP – USP

Profa. Dra.: Lúcia Helena Faccioli

Assinatura: _____

Instituição: FCFRP – USP

Prof. Dr.: Alexandre Leite R. de Oliveira

Assinatura: _____

Instituição: UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus por me guiar em todas as minhas escolhas.

Aos meus pais, Itamar e Leonor, me faltam palavras para tentar agradecer tudo o que fazem por mim. Obrigada por todo amor e confiança. Nada tem sentido sem vocês!

Ao meu irmão, que do céu me protege para continuar essa jornada da vida.

Aos membros da minha família, que torcem para a minha realização profissional.

À madrinha Conceição, por me tratar como filha, e sempre estar presente e torcendo pela minha felicidade.

Aos meus amados amigos de Viçosa e Alfenas que mesmo distante, de alguma forma fazem parte dessa conquista!

Aos meus amigos de Ribeirão, que se tornaram a minha família, por todo apoio, pelo companheirismo e pela confiança. Estar ao lado de vocês me ajuda a seguir em frente longe da minha família de Viçosa. Eu sou realmente muito grata a todos!

Ao professor e orientador Francisco Silveira Guimarães, por acreditar em um trabalho que fugia da sua linha de pesquisa. Obrigada por confiar em mim, pelas oportunidades, incentivo e ensinamentos acadêmicos e culturais.

Ao professor Thiago Mattar Cunha pela oportunidade de me juntar ao seu grupo de pesquisa e confiar no meu trabalho. Obrigada pelos muitos aprendizados que levarei por toda a minha vida profissional.

Ao professor Felipe Villela Gomes, que desde o mestrado me ensina o que realmente é fazer pesquisa. Obrigada por ser um exemplo de profissional para mim. Agradeço também a suas alunas Adriana e Thamyris pelo companheirismo na rotina de trabalho.

À professora Sabrina Lisboa, obrigada por todos os conselhos e por sempre estar disponível para me ajudar. Você é o meu exemplo de mulher na ciência.

As minhas amigas de laboratório Alice, Naielly, Carla, Isadora, Débora e Amanda, por terem feito os dias no laboratório mais felizes. Obrigada pelos conselhos, ajuda e discussões científicas durante essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, por sempre estar disposto a esclarecer dúvidas e por deixar seu laboratório sempre disponível para mim. E aos demais membros do seu laboratório Mayara, Andreza, Laura, Jéssica, Anna Bárbara e Luana por proporcionarem momentos agradáveis na convivência do dia-dia.

À Professora Alline Campos pelas discussões científicas e por estar sempre disponível em ajudar e ensinar. E aos demais membros do seu laboratório por tornarem a convivência no trabalho agradável. Em especial agradeço a Fran por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer tipo de situação.

A todos os membros do LID, obrigada por entenderem minha presença no laboratório de vocês e por toda ajuda.

Aos meus colaboradores, Isaac, Alexandre Lopes, Jéssica e Isadora, obrigada por sempre estarem disponíveis e não medirem esforços para colaborar com esse trabalho.

Ao apoio técnico da Laura, Eleni, Inês, Marcos, Ieda, Katinha, Serginho, Juliana e Marcela por me ensinarem e auxiliarem com suas habilidades técnicas. E a Eliana, Orlando e Marcos pelo cuidado e respeito que dedicam aos animais do biotério.

A todos os funcionários do Depto. de Farmacologia, em especial ao Ramon e Gislaine pela competência, disponibilidade e conversas. Vocês são essenciais para que tudo dê certo nesse departamento.

Aos membros da banca, Dra. Sâmia Joca, Dra. Lucia Facioli, Dr. Alexandre Oliveira pela disponibilidade, atenção, auxílio e colaboração na finalização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPESP, pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de doutorado (CNPq).

*“O fim é belo, incerto, depende de como você vê.
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só”*

Fernando Anitelli

RESUMO

SILVA, N. R. **HUF-101, um análogo do canabidiol, previne a alodinia mecânica e térmica em modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico.** Tese de Doutorado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2020.

A neuropatia periférica induzida por quimioterápico (NPIQ) é o principal efeito adverso limitante do uso de quimioterápicos como o paclitaxel (PCX). Estima-se que tal condição atinja aproximadamente 80% dos pacientes, sendo que os medicamentos usados atualmente são ineficazes na maioria desses pacientes, além de estarem associados com diversos efeitos adversos. O uso do PCX causa sérias complicações moleculares e celulares como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, produção de citocinas e quimiocinas, infiltrado de células como macrófagos, que ocorre principalmente no sistema nervoso periférico, como em neurônios sensoriais localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRDs). Atualmente, vários estudos têm demonstrado um potencial terapêutico no uso de canabinoides para o tratamento de neuropatias periféricas, incluindo as induzidas por quimioterápico. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do HUF-101, um análogo fluorado do CBD (principal componente não psicotomimético presente na planta *Cannabis sativa*), em prevenir e/ou reverter a alodinia mecânica e térmica induzida pelo PCX em camundongos C57BL/6. Nós observamos que o tratamento com HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg), iniciado após o término do tratamento com PCX, não reverteu a alodinia mecânica induzida por esse quimioterápico. No entanto, o tratamento com HUF-101, na dose de 1 mg/kg, por 8 dias e que se sobrepôs ao tratamento com PCX apresentou efeitos prolongados em prevenir

a alodinia mecânica e térmica. Tais efeitos foram bloqueados pelo antagonista dos receptores PPAR γ , GW9662 (2 mg/kg), mas não pelos antagonistas dos receptores CB1 (AM251; 0,3 mg/kg) e CB2 (AM630; 0,3 mg/kg). Além disso, esse efeito antialodínico do HUF-101 foi acompanhado de uma diminuição da expressão gênica de IL-6, TNF α , bem como de Iba-1 nos GRDs. O tratamento com HUF-101 também preveniu a perda de fibras nervos intraepidermais, causadas pelo PCX. Observamos ainda que, *in vitro*, o HUF-101 não afetou o efeito quimioterápico do PCX em células de câncer de mama, murinho (4T1) e humano (MCF-7), de câncer de cólon humano (HCT-116), bem como no modelo *in vivo* de câncer de mama induzido em fêmeas BALB/c. Por fim, observamos que o tratamento com HUF-101, também não produziu efeitos sobre a coordenação motora dos animais, não causou tolerância, nem efeitos associados a dependência. Desse modo, esse novo análogo fluorado do CBD, poderia ser uma alternativa terapêutica para prevenir a alodinia mecânica e térmica induzida pelo tratamento antineoplásico com o PCX.

Palavras-chave: 1.HUF-101 2. Neuropatia periférica induzida por quimioterápico 3. PPAR γ 4. Anti-inflamatório 5. Neuroprotetor.

ABSTRACT

SILVA, N. R. **HUF-101, a cannabidiol analog, prevents the mechanical and thermal allodynia in chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain model.** Thesis (PhD) - Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2020.

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is the main dose-limiting adverse effect of chemotherapy drugs such as paclitaxel (PCX). This condition affects at least 80% of patients, and the current drugs available are ineffective in most of these patients, and are associated with several adverse effects. The use of PCX causes serious molecular and cellular complications such as mitochondrial dysfunction, oxidative stress, cytokine and chemokine production, infiltration of cells such as macrophages. Besides, these events occur mainly in the peripheral nervous system, such as sensory neurons located in the dorsal root ganglia (DRG). Currently, several studies have shown a therapeutic potential for the cannabinoids in the treatment of peripheral neuropathies, including those induced by chemotherapy. In this sense, the present study aimed to evaluate the effect of HUF-101, a fluorinated analog of CBD (main non-psychotomimetic component present in *Cannabis sativa* plant), in preventing and/or reversing PCX-induced mechanical and thermal allodynia in mice C57BL/6. We observed that the treatment with HUF-101 (3, 10 and 30 mg/kg), started after the end of treatment with PCX, did not reverse the mechanical allodynia induced by this chemotherapy. However, the treatment with HUF-101 at a dose of 1 mg/kg for 8 days overlapping with PCX treatment produced prolonged effects upon mechanical and thermal allodynia prevention. These effects were blocked by PPAR γ receptor antagonist GW9662 (2 mg / kg), but not by CB1

(AM251; 0.3 mg / kg) and CB2 (AM630; 0.3 mg/kg) receptor antagonists. In addition, this antiallodynic effect of HUF-101 was followed by a decrease in IL-6, TNF α as well as Iba-1 gene expression in DRGs. HUF-101 treatment also prevented the loss of intraepidermal nerve fibers caused by PCX. We also observed that, in vitro, HUF-101 did not affect the chemotherapeutic effect of PCX on murine (4T1) and human (MCF-7) breast cancer cells, and human colon cancer (HCT-116) cells, as well as in the in vivo model of induced breast cancer in female BALB/c. Finally, we observed that the treatment with HUF-101, did not have effects on the motor coordination of the animals, neither caused tolerance nor effects associated with the dependence. Thus, the new fluorinated CBD analogue could represent an innovative therapeutic alternative to prevent mechanical and thermal allodynia induced by antineoplastic PCX treatment.

Keywords: 1.HUF-101 2. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy 3. PPAR γ 4. Anti-inflammatory 5. Neuroprotective.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do CBD e HUF-101.....	30
Figura 2: Esquema experimental do teste de preferência condicionada por lugar.....	42
Figura 3: HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) administrado do 7º ao 21º dia não reverte a alodinia mecânica induzida pelo PCX.....	43
Figura 4: HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) administrado durante 14 dias previne a alodinia mecânica induzida pelo PCX.....	44
Figura 5: HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) administrado concomitante com o PCX não previne a alodinia mecânica induzida por este quimioterápico	45
Figura 6: HUF-101 (1 e 3 mg/kg) administrado por 7 dias previne a alodinia mecânica induzida pelo PCX até o 21º dia.....	46
Figura 7: HUF-101 (1 e 3 mg/kg) administrado por 7 dias previne a alodinia térmica induzida pelo PCX até o 21º dia.....	47
Figura 8: AM251 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX.....	48
Figura 9: AM251 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX.....	49
Figura 10: AM630 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX.....	50
Figura 11: AM630 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX.....	51
Figura 12: GW9662 (2 mg/kg) bloqueia efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX.....	53

Figura 13: GW9662 (2 mg/kg) bloqueia efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX.....	54
Figura 14: PCX (8 mg/kg) aumenta a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Iba-1 nos GRDs (L3, L4 e L5)	56
Figura 15: HUF-101 diminui o aumento da expressão gênica de TNF- α , IL-6 e Iba-1 nos GRDs (L3, L4 e L5) após o tratamento com PCX.....	58
Figura 16: Tratamento com o PCX (8 mg/kg) tem uma tendência em diminuir o número de FNIDs, enquanto o tratamento com HUF-101 (1 mg/kg) tende a bloquear este efeito.....	60-61
Figura 17: Tratamento durante 24h com PCX (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 μ M) diminui a viabilidade celular das células de câncer de mama murino (4T1)	62
Figura 18: Tratamento durante 24h com HUF-101 (0,1, 0,3, 1 e 3 μ M) não altera o efeito do PCX (3 e 10 μ M) em diminuir a viabilidade celular de células 4T1.....	63
Figura 19: Tratamento durante 24h com HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μ M) não altera o efeito do PCX (3 e 10 μ M) em diminuir a viabilidade celular de células MCF-7.....	64
Figura 20: Tratamento durante 24h com HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μ M) não altera o efeito do PCX (3 e 10 μ M) em diminuir a viabilidade celular de células HCT-116.....	65
Figura 21: Tratamento do HUF-101 (1 mg/kg) e PCX (8 mg/kg) não diminui o volume do tumor de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c.....	66
Figura 22: Tratamento do HUF-101 (1 mg/kg) e PCX (8 mg/kg) não diminui o volume do tumor de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c.....	67
Figura 23: Tratamento com HUF-101 (1 mg/kg) não interfere na coordenação motora avaliada no teste de Rota Rod.....	68
Figura 24: Tratamento com HUF-101 (3 e 30 mg/kg) não induz condicionamento por lugar diferentemente da Morfina (20 mg/kg)	69

LISTA DE ABREVIÇÕES

2-AG	2-araquidonilglicerol
AEA	Anandamina
Anova	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira Hematoencefálica
CB1	Receptor canabinoide do tipo 1
CB2	Receptor canabinoide do tipo 2
CBD	Canabidiol
cDNA	DNA complementar
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-2	Ciclooxigenase-2
CT	<i>Cycle threshold</i>
DAGL	Diacilglicerol lipase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECs	Endocanabinoides
FAAH	Hidrolase de amidas de ácidos graxos
FNIDs	Fibras Nervosas Intraepidermais
GRDs	Gânglios da Raiz Dorsal
i.p	Intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MGL	Monoacil glicerol lipase
MMP-9	Metaloproteinase-9
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NAPE-PLD	N-acil-fosfatidiletanolamina específica fosfolipase D
NF-kB	Fator Nuclear-kB
NO	Óxido nítrico
NPIQ	Neuropatia periférica induzida por quimioterápico
PBN	Phenyl N-tert-butylnitron
PCX	Paclitaxel
PEA	Palmitoiletílida lipídica endógena
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
qRT-PCR	Reação de cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
S-N-K	Newman-Keuls
SNP	Sistema Nervoso Periférico
THC	Δ 9-tetraidrocanabinol
TLR4	Receptor Toll do tipo 4
TRP	<i>Transient receptor potential</i>

TNF- α

Fator de Necrose Tumoral alpha

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Dor e Nocicepção	18
1.2 Neurobiologia da dor	19
1.3 Tipos de dor	21
1.4 Dor neuropática induzida por quimioterápicos	23
1.5 Canabinoides no tratamento da NPIQ.....	26
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Animais	32
3.2. Drogas.....	33
3.3 Delineamento experimental.....	33
3.3.1 Protocolo de reversão da alodinia mecânica induzida por PCX.....	33
3.3.2 Protocolos de prevenção da alodinia mecânica e térmica induzida por PCX	34
3.3.3 Protocolos para avaliar o envolvimento dos receptores CB1, CB2 e PPAR γ nos efeitos do HUF-101	34
3.3.4 Protocolos para avaliar as possíveis alterações gênicas após os tratamentos com PCX e HUF-101	35
3.3.5 Protocolo para avaliar as possíveis alterações nas FNIDs após o tratamento com PCX e HUF-101	35
3.4. Procedimentos Experimentais.....	36
3.4.1. Teste de Von Frey Filamento	36
3.4.2. Teste da acetona	36
3.4.3. Teste do Rota Rod	37
3.4.4. Cultura de células	37
3.4.5. Atividade da desidrogenase mitocondrial (MTT)	38
3.4.6. Indução de modelo de câncer de mama in vivo	38
3.4.7. Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR)	39
3.4.8. Quantificação de Fibras Nervosa Intraepidermais (FNIDs) por imunofluorescência	40

3.4.9. Preferência condicionada por lugar	41
3.5. Análise estatística	42
4. RESULTADOS	43
4.1 Experimento 1: Efeito do HUF-101 na reversão da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel	43
4.2 Experimento 2: Efeito do tratamento de 14 dias com HUF-101 na prevenção da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	44
4.3 Experimento 3: Efeito do tratamento concomitante HUF-101 e PCX na prevenção da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	45
4.4 Experimento 4: Efeito do tratamento por 7 dias com HUF-101 na prevenção da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	46
4.5 Experimento 5: Efeito do tratamento por 7 dias com HUF-101 na prevenção da alodinia térmica induzida pelo paclitaxel	47
4.6 Experimento 6: Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	48
4.7 Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia térmica induzida pelo paclitaxel	49
4.8 Experimento 8: Efeito do pré-tratamento com AM630 (antagonista CB2) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel.....	50
4.9 Experimento 9: Efeito do pré-tratamento com AM630 (antagonista CB2) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia térmica induzida pelo paclitaxel	51
4.10 Experimento 10: Efeito do pré-tratamento com GW9662 (antagonista PPAR γ) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel	52
4.11 Experimento 11: Efeito do pré-tratamento com GW9662 (antagonista PPAR γ) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia térmica induzida pelo paclitaxel ..	53
4.12 Experimento 12: Efeito da expressão gênica da citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Iba-1 e do receptor PPAR γ nos GRDs (L3, L4 e L5) após o tratamento com PCX.....	54
4.13 Experimento 13: Efeito do tratamento do HUF-101 (1 mg/kg) sobre o aumento da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Iba-1 nos GRDs (L3, L4 e L5) após o tratamento com PCX.....	57
4.14 Experimento 14: Avaliação do tratamento com HUF-101 e PCX sobre as FNIDs	59
4.15 Experimento 15: Efeito de diferentes concentrações do paclitaxel sobre a viabilidade celular de células de câncer de mama murino (4T1).....	62

4.16 Experimento 16: Efeito de diferentes concentrações do HUF-101 sobre a capacidade do paclitaxel em diminuir a viabilidade celular de células de câncer de mama murino (4T1).....	62
4.17 Experimento 17: Efeito de diferentes concentrações do HUF-101 sobre a capacidade do paclitaxel em diminuir a viabilidade celular de células de câncer de mama humano (MCF-7).....	63
4.18 Experimento 18: Efeito de diferentes concentrações do HUF-101 sobre a capacidade do paclitaxel em diminuir a viabilidade celular de células de carcinoma de cólon humano (HCT-116).....	65
4.19 Experimento 19: Efeito do tratamento do HUF-101 sobre o efeito quimioterápico do paclitaxel em diminuir o volume tumoral no modelo de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c.....	66
4.20 Experimento 20: Efeito do tratamento do HUF-101 sobre o efeito quimioterápico do paclitaxel em diminuir o peso tumoral no modelo de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c.....	67
4.21 Experimento 21: Efeito do tratamento do HUF-101 sobre equilíbrio e coordenação motora avaliados pelo teste de Rota Rod	68
4.22 Experimento 22: Efeito do HUF-101 e Morfina no modelo de preferência condicionada pelo lugar (PCL)	69
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nocicepção

A dor é definida como uma experiência sensorial desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial. Tal processo é complexo, multidimensional e envolve aspectos sensorio-discriminativos, cognitivos, emocionais e motivacionais (TREEDE, 2018). Embora tal sensação seja descrita como desagradável, a capacidade de detectar estímulos dolorosos é essencial para sobrevivência e bem-estar de um organismo, já que é um importante sinal de alerta para possíveis alterações que podem comprometer a sua integridade (WALL; MELZACK'S, 2006). Sendo assim, a dor é um sinal vital para induzir comportamentos de precaução e limitação de danos, como respostas motoras reflexas de escape e respostas autonômicas frente a um estímulo potencialmente danoso (BASBAUM et al., 2009; WILLIAMS; CRAIG, 2016).

Considerando a subjetividade da dor, para discutir a sua avaliação em qualquer contexto, os significados dos termos mais comumente usados devem ser claros. Nesse sentido, é importante diferenciar os termos dor e nocicepção, que apesar de estarem frequentemente relacionados não são equivalentes e podem ocorrer de maneira independentemente um do outro (TREEDE, 2018).

A percepção de que algo dói envolve a integração neuronal e o processamento de informações sensoriais que geralmente iniciam na periferia e são transferidos para o Sistema Nervoso Central (SNC). A dor é resultante de uma experiência humana que só pode ser identificada através de um auto-relato, já que tal sensação é uma sensação singular que pode ser influenciada por diversos elementos tais como emoção, cognição e memória (DAVIS et al., 2017; COHEN; QUINTNER; RYSEWYK, 2018; TREEDE, 2018). Já a nocicepção, seria uma função específica do sistema sensorial e refere-se ao processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos, desencadeada

por dano ou ameaça ao tecido decorrente da ativação de nociceptores. Dessa forma, a nocicepção pode ser avaliada independente da consciência e seria o termo correto para ser usado em estudos pré-clínicos utilizando animais de laboratório, onde normalmente, a avaliação da nocicepção se baseia na medida dos comportamentos defensivos ("reflexos nociceptivos") diante de estímulos nocivos ou potencialmente nocivos (DAVIS et al., 2017; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; TREEDE, 2018; COHEN; QUINTNER; RYSEWYK, 2018).

1.2 Neurobiologia da dor

O processamento da dor é complexo e ainda não completamente entendido e baseia-se no produto final de uma rede de processamento de informações que compreende vários estágios. O primeiro estágio é a transdução, onde um estímulo nocivo externo é convertido em atividade eletrofisiológica. Já no segundo, a transmissão, esta informação codificada é retransmitida através da medula espinal ao tronco cerebral e tálamo. Por fim, o estágio da percepção ocorre devido a conexões entre o tálamo e os centros corticais superiores que integram a resposta afetiva à dor (BRIDGESTOCK, 2013).

O início da integração de todos esses estágios inicia-se com os nociceptores que são terminações de neurônios sensoriais periféricos fisiologicamente especializados, que são os responsáveis por detectar os estímulos nocivos. Eles compreendem terminações nervosas periféricas livres e não encapsuladas e são encontrados na maioria dos tecidos, incluindo pele, músculos, articulações e vísceras (BRIDGESTOCK, 2013).

Basicamente, existem duas classes de nociceptores. As fibras aferentes mielinizadas e não mielinizadas. Dentre as mielinizadas, as fibras tipo A δ possuem médio diâmetro e medeiam a dor aguda bem localizada proveniente de estímulos mecânicos e térmicos. Já as fibras de maior diâmetro e de rápida condução, as fibras tipo A β , respondem à estimulação mecânica inócua como o toque leve. Vale ressaltar, no entanto, que

evidências sugerem que esta população de fibras sensitivas, mudaria seu papel fisiológico e poderia estar envolvida no desenvolvimento da alodinia mecânica em modelos experimentais de dor neuropática (COBOS et al., 2018). A segunda classe de nociceptores compreende às fibras aferentes de pequeno diâmetro, não-mielinizadas e de baixa velocidade de condução. Denominadas de fibras do tipo C, são as fibras mais numerosas e respondem a uma ampla gama de estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. Medeiam a dor caracterizada como difusa, lancinante e em queimação (WALL; MELZACK'S, 2006; INOUE; TSUDA, 2018).

O estímulo nocivo despolariza o terminal nervoso dos axônios aferente primários e gera potenciais de ação que são propagados centralmente, permitindo assim, que essas fibras sejam capazes de captar e transmitir o estímulo nocivo. Esses terminais contêm receptores que convertem a energia mecânica, térmica ou química dos estímulos nociceptivos em potencial elétrico despolarizante (KANDEL et al., 2014.). Dentre esses receptores, destacam-se os que pertencem a família de canais iônicos de potencial de receptor transitório, TRP – do inglês *transient receptor potential*, (NISHIDA et al., 2015; HUANG et al., 2019), canais de sódio, (WOOD et al., 2004; PRIESTLEY, 2017), receptores purinérgicos ionotrópicos, que são ativados pelo trifosfato de adenosina (ATP) (BOREA et al., 2018), membros da família de receptores associados à proteína G relacionados ao Mas, Mrg – do inglês "*Mas-related G protein-coupled receptor*"), que são ativados por ligantes peptídicos (TIWARI et al., 2016; LI et al., 2017), dentre outros.

Dessa forma, o potencial de ação gerado é transmitido pelo neurônio aferente primário, cujo corpo celular localiza-se nos gânglios da raiz dorsal (GRDs), realizando a primeira sinapse no corno dorsal da medula espinal com o neurônio aferente secundário. Nesta etapa, a informação nociceptiva é passível de modulação pelos axônios descendentes do tronco cerebral e por interneurônios excitatórios e/ou inibitórios que

regulam o fluxo de informações nociceptivas (D'MELLO; DICKENSON, 2008; BESSON; CHAOUCH, 2017; DICKIE et al., 2019; GUTIERREZ-MECINAS et al., 2019). Essa transmissão é dependente da liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos, que é realizada pelos neurônios aferentes primários, tanto na periferia quanto na sinapse com os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula. Tais substâncias incluem o glutamato, a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a somatostatina, o ATP, o óxido nítrico (NO), entre outros (MIN et al., 2008; ABBADIE et al., 2009; KUNER, 2010; CHEN et al., 2018; DEMBO et al., 2018; SOUSA-VALENTE; BRAIN, 2018).

A informação nociceptiva transmitida ao neurônio aferente secundário então ascende a centros neurais superiores, chegando ao tálamo onde ocorre a segunda sinapse com o neurônio de terceira ordem que, por sua vez, projeta-se ao córtex somatossensorial. Estes centros nervosos são responsáveis pela percepção da localização da dor, sua intensidade, bem como os aspectos afetivos e cognitivos e também são passíveis de modulação por circuitos descendentes inibitórios ou facilitatórios (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). No entanto, o processamento da dor fisiológica como uma entidade isolada é um evento raro. Na maioria das vezes o estímulo nocivo não é transitório e envolve diversas alterações na dinâmica no processamento da informação nociva o que pode desencadear diferentes tipos de dor (PISERA, 2005).

1.3 Tipos de dor

A classificação dos tipos de dor é ampla e complexa, pois pode envolver diversos critérios. Quanto a duração, basicamente a dor pode ser dividida em aguda ou crônica. A dor aguda possui duração limitada e tem suas causas bem definidas e fáceis de serem identificadas, podendo desaparecer antes da remoção do estímulo ou do reparo tecidual. Esse tipo de dor, por meio de geração de resposta reflexa de retirada, tem o papel

principal de afastar o organismo do estímulo nocivo e assim protegê-lo de danos mais graves (SCHAIBLE, 2006; WOESSNER, 2018).

Já a dor crônica, é conhecida como uma dor que persiste por um tempo maior que o necessário para o reparo do dano tecidual e que dure por pelo menos três meses. Ela compreende diferentes tipos de dor, dentre elas a dor inflamatória, artrite, fibromialgia, dor causada pelo câncer e dor neuropática (TREEDE et al., 2015; WOESSNER, 2018; ORR; SHANK; BLACK, 2017; NUGRAHA et al., 2019). Essas doenças frequentemente estão associadas a comorbidades como depressão, ansiedade e distúrbios do sono, o que faz com que essa síndrome seja ainda mais incapacitante. Portanto, diferentemente da dor aguda, a dor crônica não possui a função de proteção do organismo. É uma condição frequente no mundo, acometendo cerca de 30% da população mundial. No Brasil, a prevalência da dor crônica é estimada em 40% da população, sendo um importante problema de saúde pública (RU-RONG JI, ZHEN-ZHONG XU, 2014; SOUZA et al., 2017).

Dentre os tipos de dor crônica, a dor neuropática refere-se à dor causada por uma lesão ou doença do sistema somatossensorial e representa uma ampla categoria de síndromes dolorosas que abrangem uma grande variedade de distúrbios periféricos ou centrais. Sua prevalência representa cerca de 20 a 25% dos indivíduos com dor crônica (TORRANCE et al., 2006; BOUHASSIRA, 2018).

A classificação dos diferentes tipos de dores neuropáticas também é complexa e heterogênea, pois os sintomas podem variar em relação ao tipo, intensidade e tempo. Dentre eles podemos destacar a parestesia (que é uma sensação anormal, espontânea ou evocada que se traduz em dormência ou formigamento), a disestesia (que diferentemente da parestesia, a sensação anormal é desagradável), a hiperalgesia (que é o aumento da dor mediante a um estímulo que normalmente já provoca essa sensação)

e a alodinia (que é a sensação de dor devido a um estímulo que normalmente não provocaria a sensação dolorosa) (JAGGI; SINGH, 2012; RU-RONG JI, ZHEN-ZHONG XU, 2014).

Numerosos são os processos patológicos que podem causar dor neuropática, como por exemplo, traumas, infecção como por Herpes Zoster, isquemia, neoplasia, doenças metabólicas como diabetes mellitus e as neuropatias induzida por produtos químicos/medicamentos, como os usados no tratamento quimioterápico (BRIDGESTOCK, 2013).

1.4 Dor neuropática induzida por quimioterápicos

A neuropatia periférica induzida por quimioterápico (NPIQ) é uma complicação grave de algumas drogas utilizadas no tratamento do câncer, como o paclitaxel (PCX). Estima-se que aproximadamente 80% dos pacientes submetidos ao tratamento antineoplásico apresentem esse quadro e, portanto, é considerada a principal complicação neurológica, dose dependente, em decorrência da quimioterapia (STAROBOVA; VETTER, 2017). Dentre os sintomas da NPIQ destacam-se as dores intensas nas mãos, pés, articulações e músculos, bem como alterações motoras finas e dificuldade de andar. Tal problema pode limitar o uso desses agentes, havendo a necessidade de redução de dose e até mesmo a interrupção do tratamento. Na maioria dos casos, a NPIQ é parcialmente reversível com a interrupção do tratamento ou troca do agente quimioterápico, porém, em algumas situações o dano pode ser permanente (CAROZZI et al., 2015).

O PCX, quimioterápico pertencente à classe dos taxanos, é um agente amplamente usado no tratamento do câncer de mama, ovário e fígado. Este fármaco se liga e estabiliza os microtúbulos, prevenindo a dinâmica necessária aos processos proliferativos neoplásicos e, por consequência, interrupção da mitose na fase G2/M, seguida de morte celular por apoptose. De maneira paradoxal, apesar de não serem

células em divisão, os neurônios são suscetíveis ao PCX (GORNSTEIN; SCHARWZ, 2014).

Dessa forma, o PCX causa importantes alterações moleculares que resultam em disfunção mitocondrial, mudanças na expressão de receptores TRP e na sinalização glutamatérgica, danos ao DNA nuclear, disfunção em canais para cálcio, potássio e sódio, aumento do estresse oxidativo, ativação do sistema imune com o aumento da produção de citocinas e quimiocinas, que ocorrem principalmente no sistema nervoso periférico, como nos GRDs, já que tal composto não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) (CANTA; POZZI; CAROZZI, 2015). Além disso, um dos principais mecanismos de ação do PCX sobre neurônios caracteriza-se pela ruptura do transpote axonal. Uma vez que esta droga atua como um fator de estabilização de tubulina, a inibição da despolimerização de microtúbulos induzida pela droga dificulta o transporte axonal (SIAU; XIAO; BENNETT, 2006; KAVALLARIS, 2010; LAPOINTE et al., 2013) levando a processos como degeneração axonal, desmielinização e retração de fibras nervosas intraepidermais (FNIDs), que na pele compreende principalmente as fibras sensoriais do tipo C e A δ . Tais processos têm sido correlacionados com os sintomas relatados na clínica como a alodinia, hiperalgesia, parestesia e disestesia (PARK et al., 2014; KO et al., 2014; DUGGETT et al., 2016).

Além do efeito direto sobre os neurônios, o tratamento com PCX, direta ou indiretamente, também pode provocar a ativação de outros tipos de células. Por exemplo, o tratamento com o PCX pode reprogramar macrófagos com perfil M2 para um fenótipo ativo M1 por meio da ativação dos receptores TLR4 (WANDERLEY et al., 2018). Além disso, já foi descrito que o tratamento com esse quimioterápico também é capaz de ativar indiretamente astrócitos e células Schwann. Em conjunto, a ativação dessas células, desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 β e IL-6 que

podem levar a sensibilização de neurônios nociceptivos (JAGGI; SINGH, 2012; SISIGNANO et al., 2014).

É importante ressaltar que a lesão neuronal induzida por PCX pode também ser o estímulo inicial para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória local nos GRDs visto que após a lesão dessas células há a infiltração de macrófagos nessa região e nos nervos periféricos (PETERS et al., 2007). O recrutamento robusto e ativação de células inflamatórias, com subsequente desenvolvimento de um quadro de inflamação neurogênica ocorre após a fase aguda do tratamento com o quimioterápico (SIAU; XIAO; BENNETT, 2006; SISIGNANO et al., 2014). Dessa forma, especula-se que a resposta inflamatória gerada nessa fase contribuiria para o desenvolvimento da dor neuropática persistente (SISIGNANO et al., 2014).

Pacientes com NPIQ respondem pobremente aos analgésicos convencionais. Sendo que antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes são as principais drogas utilizadas atualmente para o tratamento dessa condição. Os opióides também são prescritos para alívio da dor crônica, apesar de não serem a classe de medicamentos de primeira escolha (NEELAKANTAN et al., 2016). Na maioria das vezes, essas classes de medicamentos não oferecem um alívio satisfatório ao indivíduo, além de estarem associados a diversos efeitos adversos importantes como boca seca, visão turva, sedação, tremores, tolerância e dependência, como no caso da morfina, que podem resultar em grandes complicações na qualidade de vida desses pacientes (CHU et al., 2014; LYNCH et al., 2014; AHMAD et al., 2017; DONVITO et al., 2016).

Apesar dos possíveis mecanismos pelos quais o PCX promove a NPIQ, a patogênese envolvida nesse processo não está totalmente elucidada, necessitando de mais estudos para solucionar tais problemas e avançar na busca de novos alvos terapêuticos.

1.5 Canabinoides no tratamento da NPIQ

Dentre os mais de 400 compostos químicos presente na planta *Cannabis sativa*, aproximadamente 60 são denominados canabinoides (ATAKAN, 2012). Dentre estes, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC), composto identificado na metade do século passado por Rafael Mechoulam e colaboradores (1970) é o principal responsável pelos efeitos psicotomiméticos induzidos por essa planta (MECHOULAM, 1970). Já entre os fitocannabinoides não psicotomiméticos, mas que exercem múltiplas ações farmacológicas, destaca-se o canabidiol (CBD), composto que produz efeitos muitas vezes opostos ao THC (MECHOULAM et al., 2007). Os múltiplos efeitos farmacológicos do CBD estão relacionados a sua ação em diversos receptores no sistema nervoso central e periférico, dentre eles os receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e 2 (CB2), PPAR γ , TRPV1, 5-HT1A, GPR55, entre outros (COSTA et al., 2004; CAMPOS; GUIMARÃES, 2009; CASAROTTO et al., 2010; PAZOS et al., 2013; CASAROTTO, et al., 2015; SONEGO et al., 2018).

Em relação ao sistema endocanabinoide, além dos receptores CB1 e CB2 mencionados anteriormente, compreende também os agonistas endógenos conhecidos como endocannabinoides (ECs), anandamina (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) e as proteínas responsáveis pela síntese, N-acil-fosfatidiletanolamina específica fosfolipase D (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipase (DAGL), e degradação destas substâncias, hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH) e Monoacil glicerol lipase (MGL), respectivamente (PIOMELLI, 2003)

Vários estudos mostram os possíveis efeitos dos compostos que interferem de alguma forma nos componentes do sistema endocannabinoides na NPIQ e em outros modelos de neuropatia periférica, como as de lesão do nervo ciático. Por exemplo, no modelo de NPIQ, usando cisplatina, foi observado o efeito antialodínico da AEA

administrada na pata dos camundongos (KHASABOVA et al., 2012). Também foi demonstrado que a administração intraperitoneal (i.p) do WIN 55,212-2 (agonista não seletivo dos receptores CB1 e CB2) preveniu a alodinia mecânica e térmica induzida pelo tratamento repetido com PCX em ratos. Nesse mesmo trabalho, quando o WIN 55,212-2 foi administrado intraplantar, não foram observadas diferenças entre a pata injetada e a contralateral, sugerindo a necessidade de mecanismos sistêmicos para o efeito desse canabinoide (PASCUAL et al., 2005). Já em outro estudo, verificou-se que AM1710 e AM1714, agonistas dos receptores CB2, impediram o desenvolvimento da alodinia mecânica e térmica induzida por cisplatina, PCX e vincristina, sendo que nesse caso, os efeitos foram mediados pelos receptores CB2, mas não CB1 (RAHN et al., 2009; DENG et al., 2015; LI et al., 2019). Em outro estudo, Khasabova e colaboradores (2014) observaram que o efeito antialodínico do JZL184, um inibidor da MGL, foi associado com a diminuição dos níveis dos endocannabinoides nos GRDs de camundongos no modelo de neuropatia periférica com cisplatina. No entanto, os níveis de AEA e 2-AG encontraram-se aumentados na medula espinal, mas sem alteração no cérebro (KHASABOVA et al., 2014). Já Guindon e colaboradores (2013), também utilizando a cisplatina, observaram que o tratamento com os inibidores das enzimas de degradação da FAAH e MGL (URB597 e JZL184, respectivamente) apresentaram efeitos antialodínicos relacionados a um aumento dos níveis de AEA e 2-AG na medula espinal, e uma diminuição de 2-AG, mas não da AEA na pata de ratos (GUINDON et al., 2013). Dessa forma, esses achados sugerem que os níveis de endocannabinoides possam estar diminuídos com o tratamento com esses quimioterápicos, sendo tal efeito observado apenas na periferia.

Em relação aos efeitos dos fitocannabinoides presentes na planta *Cannabis sativa*, verificou-se que o THC suprimiu a alodinia mecânica e térmica induzida por PCX, mas falhou em prevenir a alodinia mecânica induzida por cisplatina em camundongos (DENG

et al., 2015; HARRIS et al., 2016). Já o CBD impediu o desenvolvimento da alodinia mecânica e térmica induzida pelo PCX (WARD et al., 2011, 2014). No entanto, no modelo utilizando a cisplatina, o CBD atenuou a alodinia mecânica já estabelecida por esse quimioterápico, mas falhou em impedir o desenvolvimento desta condição (HARRIS et al., 2016). Nesses estudos, os efeitos do CBD não foram bloqueados pelos antagonistas do receptor CB1 ou CB2, mas sim bloqueados pelo antagonista dos receptores 5-HT1A (WARD et al., 2014).

Sabe-se que além de mecanismos envolvendo os receptores CB1, CB2 e 5-HT1A, os canabinoides também podem exercer seus efeitos via receptores PPARs. Nesse sentido, vários estudos demonstraram o efeito antinociceptivo do PEA em diferentes modelos de lesão química do tecido, lesão nervosa ou inflamação, sendo tais efeitos inibidos pelo antagonista dos receptores PPAR α (LOVERME et al., 2005; DE NOVELLIS et al., 2012; SASSO et al., 2012; DI CESARE MANNELLI et al., 2013; DONVITO et al., 2016). Além disso, um análogo da PEA, palmitoilalilamida, também reduziu a hipersensibilidade mecânica em diferentes modelos de dor neuropática, como a lesão parcial do nervo ciático, administração de anti-retroviral e modelo de vírus da varicela zoster. Em todos os modelos, o efeito do análogo da PEA foi inibido pelos antagonistas dos receptores CB1, CB2 e do PPAR α (WALLACE et al., 2007). Já Costa e colaboradores (2008) demonstraram que os efeitos antinociceptivo da PEA na dor neuropática pela constrição do nervo ciático envolveu receptores CB1, TRPV1 e PPAR γ , mas não receptores PPAR α e CB2 (COSTA et al., 2008).

Apesar dos inúmeros resultados mostrarem a eficácia dos agonistas canabinoides na produção de efeitos antinociceptivos em uma variedade de modelos animais de neuropatia periférica, estes estão tipicamente associados com efeitos colaterais indesejados, incluindo catalepsia, déficits motores, dependência física, efeitos adversos

à retirada e desenvolvimento de tolerância (SAIN et al., 2009; MASOCHA, 2018). Apesar de o CBD possuir um grande potencial terapêutico anti-inflamatório, antioxidante e antinociceptivo, e ainda com uma baixa propensão para indução de efeitos adversos significativos, como os descritos acima, uma limitação para o uso clínico do CBD é a sua baixa e variável biodisponibilidade oral em humanos (AGURELL et al., 1981). Adicionalmente a essa limitação, o CBD induz efeitos em curva de U invertido (aspecto de sino), sendo que em estudos com animais, ele possui uma limitada faixa de dose efetiva. Assim, o desenvolvimento de novos compostos com perfil clínico e segurança semelhante ao CBD, mas com biodisponibilidade e potência clínica maiores poderia ser uma alternativa para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (CAMPOS et al., 2012).

Nesse sentido, na tentativa de superar este problema, o grupo do Prof. Raphael Mechoulam, da Universidade Hebraica de Jerusalém, Israel, vem realizando modificações químicas na molécula do CBD na tentativa de aumentar sua biodisponibilidade e melhorar os parâmetros farmacológicos desse composto. Um exemplo dessas modificações deu origem ao composto HUF-101, que é um análogo fluorado do CBD. Modificações como essa vem sendo realizadas consideravelmente ao longo dos últimos 20 anos nas pesquisas científicas e no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica (Bohm et al., 2004; Park et al., 2001). Dentre os possíveis efeitos relacionados a estratégia de adição do átomo de flúor em moléculas, está o aumento da estabilidade metabólica, que é um dos fatores determinantes na biodisponibilidade de um composto, visto que essa é limitada pelo rápido metabolismo oxidativo das enzimas do citocromo P450. O flúor pode ainda alterar o caráter básico de um composto, atenuando uma característica que dificulta a permeabilidade do composto

nas membranas celulares. Por fim, o flúor pode aumentar a afinidade do composto pelos seus sítios de ligações (Park et al., 2001).

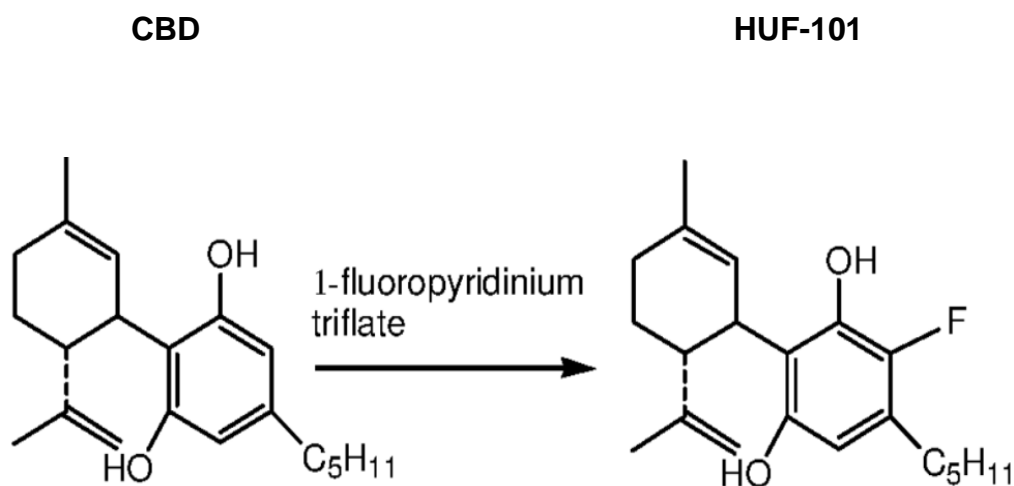


Figura 1: Fórmula estrutural do CBD e HUF-101

Nosso grupo evidenciou recentemente que o composto HUF-101, o análogo fluorado do CBD, demonstrou propriedades antinociceptivas em camundongos testados no Hot Plate, no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e no modelo da contorção abdominal induzida por ácido acético, em doses dez vezes menores que a dose efetiva do CBD. Esses efeitos envolveram a ativação de receptores CB1 e CB2, sem causar os efeitos da tétrede canabinoide (hiperlocomoção, hipotermia, antinocicepção e catalepsia) (SILVA et al., 2017). Dessa forma, assim como o CBD, tal composto poderia ser uma possível alternativa no tratamento alodinia mecânica e térmica causada na NPIQ, sem apresentar efeitos adversos relevantes.

Diante do exposto que a NPIQ é o principal efeito adverso limitante do uso do PCX e que tal efeito pode ocorrer pelo aumento da atividade inflamatória nos tecidos periféricos, bem como pela retração das FNIDs; que as drogas propostas para atuarem prevenindo

ou revertendo essa condição são ineficazes na maioria dos pacientes, além de apresentam efeitos adversos limitantes; e que canabinoides desempenham papel anti-inflamatório e neuroprotetor em diversos modelos de neuropatia periférica e lesão de nervos periféricos; a hipótese desse trabalho é que o análogo fluorado do CBD, HUF-101 poderia prevenir e/ou reverter a alodinia mecânica e térmica induzida pelo PCX, por restaurar os danos causados no GDRs e nas FNIDs, por mecanismos dependentes de receptores CB1 e CB2 sem causar efeitos colaterais significativos e sem interferir no efeito antineoplásico do PCX.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do HUF-101 em prevenir e/ou reverter a alodinia mecânica e térmica causada pelo PCX, bem como os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do HUF-101 em prevenir e/ou reverter a alodinia mecânica e térmica causada pelo PCX em camundongos C57BL/6, usando Von Frey filamento e teste da acetona, respectivamente.
- Avaliar o possível envolvimento dos receptores CB1, CB2 e PPAR γ nos efeitos do HUF-101 utilizando antagonistas farmacológicos específicos.
- Avaliar o nível da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como de Iba-1 e PPAR γ , por qRT-PCR.
- Avaliar os possíveis efeitos do HUF-101 sobre a retração das FNIDs após o uso do PCX, por imunoflorescência.

- Avaliar se o HUF-101 altera os efeitos do PCX em diminuir a viabilidade celular de células de câncer de mama animal (4T1), câncer de mama humano (MCF-7) e carcinoma de cólon humano (HCT-116).
- Avaliar se o HUF-101 altera os efeitos quimioterápicos do PCX em modelo animal de câncer de mama, usando fêmeas BALB/c.
- Avaliar se o HUF-101 altera a coordenação motora dos animais no teste de Rota Road.
- Avaliar se o HUF-101, assim como a morfina, causaria efeitos reforçadores positivos utilizando o modelo de preferência condicionada por lugar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas com idade entre 7-8 semanas das linhagens C57BL/6 e BALB/c do tipo selvagem (WT) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (USP-RP), bem como animais transgênicos que expressavam a proteína fluorescente vermelha (TdTomato) nas células que expressam o canal de sódio Nav1.8 (Nav1.8-cre-tdTomato) provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os camundongos foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, sob condições de temperatura (23-25°C) e ciclo claro/escuro (12 horas) controlados, com livre acesso à ração e água até o dia do experimento. Todos os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram avaliados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (protocolo nº100/2016 - anexo 1).

3.2. Drogas

- HUF-101 (1; 3; 10 e 30 mg/kg; sintetizado pelo grupo do Prof. Raphael Mechoulam da Universidade de Hebraica em Jerusalém, Israel); Veículo: 2% Tween 80 em salina (SILVA et al., 2017).
- Paclitaxel (8 mg/kg; ONTAX®, Libbs); Veículo: salina (TOMA et al., 2018).
- GW9662 (2 mg/kg; antagonista PPAR γ , Tocris, USA); Veículo: 2% Tween 80 e salina (SONEGO et al., 2018).
- AM251 (0,3 mg/kg; antagonista CB1, Tocris, USA); Veículo: 2% DMSO e salina (FOGAÇA et al., 2018).
- AM630 (0,3 mg/kg; antagonista CB2, Tocris, USA); Veículo: 2% DMSO e salina (FOGAÇA et al., 2018).
- Diazepam (10 mg/kg; Tocris, USA); Veículo: salina (FAJEMIROYE et al., 2018).

3.3 Delineamento experimental

3.3.1 Protocolo de reversão da alodinia mecânica induzida por paclitaxel (PCX)

Para avaliar se o HUF-101 seria capaz de reverter a alodinia mecânica induzida por PCX, camundongos C57BL/6 machos receberam uma injeção de veículo ou PCX (8 mg/kg; i.p.) nos dias 0, 2, 4 e 6, totalizando uma dose cumulativa de 32 mg/kg. Durante o período do 7^o ao 21^o dia, os animais receberam uma injeção diária de veículo ou HUF-101 (3, 10 ou 30 mg/kg). Para avaliar a alodinia mecânica induzida pelo PCX, o método de Von Frey filamento foi utilizado. Para isso, as respostas basais foram determinadas no dia 0, antes do início do tratamento com PCX ou veículo e subsequentemente, o teste foi realizado nos dias 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20 e 22. A representação esquemática dos protocolos utilizados foi inserida na figura mostrando os resultados nos respectivos experimentos realizados.

3.3.2 Protocolos de prevenção da alodinia mecânica e térmica induzida por paclitaxel

Para avaliar a capacidade do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica e térmica induzida pelo PCX, três diferentes protocolos foram realizados. No primeiro, os animais receberam injeção de veículo ou PCX (8 mg/kg; i.p) nos dias 0, 2, 4 e 6 e injeção de HUF-101 (3, 10 ou 30 mg/kg) diariamente do dia 0 ao 14^o dia, sendo que nos dias em que havia o tratamento com os dois compostos, o HUF-101 foi administrado 30 minutos antes do PCX. No segundo, o HUF-101 (3,10 e 30 mg/kg) foi administrado apenas nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 min antes da injeção do PCX (8 mg/kg; i.p). No terceiro protocolo, o PCX (8 mg/kg; i.p) foi administrado dos dias 0, 2, 4 e 6 e o HUF-101 (1 e 3 mg/kg) foi administrado nos dias 0 ao 7^o, sendo que nos dias em que havia o tratamento com os dois compostos, o HUF-101 foi administrado 30 minutos antes do que o PCX. Tais tratamentos resultaram nos grupos Veí+Veí, Veí+PCX e HUF-101 (diferentes doses)+PCX.

Para avaliar a prevenção da alodinia mecânica induzida pelo PCX o método de Von Frey filamento foi utilizado, sendo a basal avaliada no dia 0 e as demais medidas realizadas nos dias 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Para o último protocolo, ainda foi realizado o teste da acetona, onde o objetivo foi avaliar se o HUF-101 preveniria a alodinia térmica causada pelo PCX. Tal teste foi realizado logo após o teste usando Von Frey filamento.

3.3.3 Protocolos para avaliar o envolvimento dos receptores CB1, CB2 e PPAR γ nos efeitos do HUF-101

O possível envolvimento dos receptores CB1, CB2 e PPAR γ nos efeitos do HUF-101, foram avaliados com a administração dos antagonistas desses receptores 30 min antes das injeções de HUF-101; AM251 (0,3 mg/kg), AM630 (0,3 mg/kg) e GW9662 (2 mg/kg), respectivamente. As doses desses antagonistas foram baseadas em trabalhos nos quais

esses compostos, nas mesmas doses selecionadas, foram capazes de bloquear os efeitos do tratamento repetido com CBD (FOGAÇA et al., 2018; SONEGO et al., 2018). Assim como no terceiro protocolo descrito acima, os antagonistas e o HUF-101 foram administrados do dia 0 ao 7º. Já o PCX (8mg/kg), foi administrado 30 min após o HUF-101, nos dias 0, 2, 4 e 6, formando os grupos: Veí+Veí+Veí, Veí+Veí+PCX, Veí+HU+PCX, Antagonista+HU+PCX, Antagonista+Veí+PCX.

3.3.4 Protocolos para avaliar as possíveis alterações gênicas após os tratamentos com PCX e HUF-101

Para analisar as possíveis alterações gênicas dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , bem como de Iba-1 (marcador de macrófagos e micróglia) (MAKKER et al., 2017) e PPAR γ , induzidos pelo PCX, os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.) e logo após perfundidos com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,3 - 7,4, 6 horas ou 3, 7, 10, 14 e 21 dias após o tratamento com PCX ou veículo para coleta de GRDs e realização de qRT-PCR.

Já para avaliar os efeitos do HUF-101 sobre as alterações gênicas causadas pelo PCX nos GRDs, animais tratados com HUF-101 (1 mg/kg), seguido de PCX (HU+PCX), PCX (Veí+PCX) e veículo (Veí+Veí), foram anestesiados e perfundidos como descrito anteriormente, e em seguida os GRDs coletados 6h, 3, 5 e 7 dias após o fim de cada tratamento.

3.3.5 Protocolo para avaliar as possíveis alterações nas FNIDs após o tratamento com PCX e HUF-101

Para avaliar as alterações causadas pelo PCX sobre as FNIDs e os possíveis efeitos do HUF-101 sobre essas alterações, animais Nav1.8-Cre-tdTomato foram tratados como

descrito no terceiro protocolo, formando os grupos Veí+Veí, Veí+PCX e HU+PCX. 24h após o último tratamento, os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.) e logo em seguida perfundidos com PBS seguido de paraformaldeído 4% (PFA) em pH 7,3-7,4 e a pele das patas traseiras coletadas para o processamento de imunofluorescência.

3.4. Procedimentos Experimentais

3.4.1. Teste de Von Frey Filamento

Para a avaliação do limiar de retirada, primeiramente, os camundongos foram aclimatados em um compartimento de acrílico transparente individual (9 x 7 x 11 cm) sobre uma plataforma elevada de malha de arame para permitir o acesso à superfície plantar das patas traseiras. Depois de aclimatados, uma série de filamentos de Von Frey (North Coast Medical) de intensidade crescente (0,008g – 0,6g) foram aplicados no centro da pata posterior direita dos animais com uma pressão suficiente para dobrar o filamento. O estímulo foi interrompido após a observação da resposta nociceptiva, caracterizada por flexão seguida de retirada da pata. O filamento de menor força capaz de induzir resposta foi determinado como sendo o limiar mecânico do animal (BOURQUIN et.al., 2006).

3.4.2. Teste da acetona

No mesmo aparato onde foi realizado o teste de Von Frey, e sob as mesmas condições, uma gota (50 µL) de acetona PA foi aplicado na superfície plantar da pata posterior direita do animal. O estímulo frio causado pela acetona provoca comportamentos de agitação e elevação da pata, além de lambidas (CASPANI et al., 2009). O tempo de resposta destes comportamentos foi avaliado durante 60 segundos.

3.4.3. Teste do Rota Rod

Para avaliar possíveis déficits na coordenação motora dos camundongos, 24 horas após a última injeção de HUF-101 (1 mg/kg) e PCX (8 mg/kg), como descrito no terceiro protocolo na seção 3.3.2, o teste de Rota Rod foi realizado. Além disso, foi utilizado o Diazepam (10 mg/kg) como controle positivo, onde os animais foram submetidos ao teste 30 minutos após o tratamento. Este equipamento consiste em uma barra cilíndrica rotatória com raio de aproximadamente 2,5 centímetros e colocado a uma altura de 40 centímetros do assoalho. O aparelho possui 5 baias, com espaço de 3 centímetros para cada camundongo, de modo que 5 animais são avaliados por vez (Ugo Basile, Itália). Os camundongos foram colocados na barra enquanto a mesma girava a uma velocidade constante de 21 rotações por minuto (rpm). Neste teste, os animais devem caminhar continuamente sobre o cilindro em rotação, para avaliar o tempo que permanecem sobre o mesmo. Os animais foram inicialmente mantidos sobre os cilindros por 5 minutos, para habituação, antes do início do tratamento com as drogas. No dia teste, os camundongos foram novamente colocados sobre o Rota Rod e a latência para queda dos animais foi medida automaticamente através de um sensor mecânico localizado no chão do aparato, sendo o tempo de corte utilizado de 180 segundos (MAGRO et al., 2013).

3.4.4. Cultura de células

Células de câncer de mama murino (linhagem 4T1), câncer de mama humano (MCF-7) e carcinoma de cólon humano (HCT-116) (ATCC, EUA), foram cultivadas em placas de 96 poços, em quadruplicata em 100 µL em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (v/v), penicilina (100 U/mL) e anfotericina B (2 µg/mL) e mantidas em estufa umidificada a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. Antes do uso, células com 70-80% de confluência foram separadas com tripsina EDTA 0,25% e lavadas em PBS por duas vezes. Após tal procedimento as células foram plaqueadas na presença de PCX (0,1; 0,3; 1,0; 3,0 µM)

isoladamente ou na presença de HUF-101 (0,1;0,3; 1,0 e 3,0 μM), e também na presença de Triton X-100 10%, usado como controle positivo e após foram retornadas a estufa. Vinte e quatro horas após o tratamento com os compostos, o teste de viabilidade celular MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) foi realizado (WANG et al., 2019; SLIVICKIA et al., 2019).

3.4.5. Atividade da desidrogenase mitocondrial (MTT)

O ensaio de MTT foi realizado nas células descritas acima. Após 24h do tratamento, as células foram incubadas com 150 μL de MTT em uma concentração de 1mg/mL (Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio; Sigma) durante 4 horas a 37 °C. Após, o meio foi retirado e 150 μL de álcool absoluto foi adicionado em cada poço e a absorbância foi medida a 570 nm usando um espectrofotômetro (WANG et al., 2019).

3.4.6. Indução de modelo de câncer de mama in vivo

As células de câncer de mama murino 4T1 (ATCC, EUA) foram cultivadas em meio RPMI completo (10% de SFB, penicilina 100 UI/mL, e anfotericina B 2 $\mu\text{g/mL}$). Para o modelo de câncer de mama, foram injetadas 5×10^4 células da linhagem 4T1 no tecido subcutâneo do dorso de fêmeas BALB/c. Após 9 dias, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos Veí+Veí, Veí+PCX e HU+PCX, sendo que o tratamento com PCX (8 mg/kg) foi realizado nos dias 9, 11, 13, 15, 17 e 19 após a inoculação das células. Já o HUF-101 (1 mg/kg) foi administrado diariamente do dia 9 ao dia 21, sendo que nos dias em que havia o tratamento com os dois compostos, o HUF-101 foi administrado 30 minutos antes do que PCX. Os volumes tumorais foram calculados ao longo do tratamento de acordo com a fórmula: volume do tumor (mm^3) = $L \times W^2/2$, onde L representa o eixo maior (maior diâmetro transversal), e W representa o eixo menor do

tumor (WANDERLEY et al., 2018). Após 24 horas do fim do último tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores foram coletados para avaliação do peso.

3.4.7. Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR)

As amostras dos GRDs foram coletadas após o tratamento com os compostos em diferentes tempos, como descrito no item 3.3.4. Após a coleta, os tecidos foram imediatamente armazenados em reagente de Trizol (Sigma) e acondicionados em freezer a -80°C . Para o processamento das amostras, os tecidos foram triturados e a extração do RNA total foi realizada de acordo com o fabricante do reagente. O RNA total foi reversamente transcrito para DNA complementar (cDNA) por ação da enzima transcriptase reversa MultiScribe[®], pertencente ao kit High Capacity (Life-Invitrogen). A amplificação dos genes de interesse foi realizada a partir da utilização de primer IDT[®] para IL-1 β , IL-6, TNF- α , Iba-1 e PPAR γ . O qRT-PCR foi executado com volume final da reação de 10 μL e mantido a 95°C (10 min), seguido de 40 ciclos de 95°C (15 segundos) e 60°C (1 min). A reação foi realizada no sistema Step One (Life-Applied Biosystems) e a expressão do RNA mensageiro para GAPDH foi usada como controle da integridade do tecido e da reação em todas as amostras. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “*cycle threshold*” (CT) (WANDERLEY, 2018). As sequências dos pares de *primers* utilizados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1. Sequência dos pares de *primers* utilizados

<i>Primers</i>	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
IL1- β	5'- TGACAGTGATGAGAAT GACCTGTTC- 3'	5'- TTGGAAGCAGCCCTTC ATCT- 3'

TNF- α	5'- AGCAAGCAGCCAACCA GG- 3'	5'- GCCACAAGGAGGAAT GAGAAG- 3'
IL-6	5'- AGCTGGAGTCACAGAA GGAGTGGC- 3'	5'- AGGCATAACGCACTAG GTTTGCCGA- 3'
IBA-1	5'- TGAGGAGCCATGAGC CAAAG- 3'	5'- GCTTCAAGTTTGGACG GCAG- 3'
PPAR γ	5'- TTTTCAAGGGTGCCAG TTTC- 3'	5'- AATCCTTGGCCCTCTG AGAT- 3'
GAPDH	5'- AGGGCGAAGAAAACC GCATCACC- 3'	5'- TCTAAGGGAGAGCTG GCAGGGCT- 3'

3.4.8. Quantificação de Fibras Nervosa Intraepidermais (FNIDs) por imunofluorescência

Para a análise das FNIDs, animais Nav1.8-cre-tdTomato foram tratados com PCX e/ou HUF-101 conforme descrito no tópico 3.3.5. Ao término do tratamento os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.) e, em seguida, perfundidos com PBS e PFA 4%. Após a perfusão, as peles das patas traseiras foram coletadas e pós-fixadas em solução de PFA 4% por 2 horas e depois mantidas em solução de sacarose 30% *overnight* a 4°C. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em meio para congelamento Tissue-Tek® O.C.T.TM (Sakura Finetek), e rapidamente congelados em gelo seco e armazenados a -20°C. Os cortes foram realizados em criostato (Leica, Alemanha) com espessura de 40 μ m e colocados em lâminas gelatinizadas.

Para o ensaio de imunofluorescência os cortes foram fixados em câmara a vácuo por 40 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS por 5 minutos,

bloqueadas por 60 minutos em solução de PBS contendo 0,1% de Triton X[®] e 1% de BSA, com o objetivo de bloquear as ligações inespecíficas e permeabilização do tecido. Após um ciclo de 3 lavagens de 5 minutos com PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-COLÁGENO IV (1:500) produzido em cabra (1340-01 - Southern Biotech), que foi diluído na mesma solução do bloqueio e deixado *overnight* a 4°C.

Após novo ciclo de lavagens, os cortes foram incubados com anticorpo secundário fluorescente Alexa flúor 594 por 2 hora, em temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram novamente lavadas e cobertas com lamínulas, que foram fixadas com o meio de montagem apropriado contendo DAPI. As lâminas foram analisadas utilizando microscópio confocal (Leica TSE-SPE; objetiva de 40x).

Para a quantificação das FNIDs 4-5 secções de cada pata foram escolhidas aleatoriamente para análise. O número de fibras nervosas que cruzaram a junção dérmica/epidérmica, ou seja, presentes além da marcação de colágeno, foram contadas usando o software ImageJ. O comprimento da epiderme dentro de cada campo foi medido e a densidade das fibras nervosas foi expressa como o número total de fibras/comprimento da epiderme (FNIDs/mm) (SINGHMAR et al., 2018).

3.4.9. Preferência condicionada por lugar

Para realizar o teste de PCL, foi utilizado uma caixa retangular constituída por dois compartimentos maiores (20cm de comprimento x 18cm de largura x 25cm de altura) separados por um compartimento central menor (neutro) (20cm x 7cm x 25cm), que ligava os lados maiores através de duas portas. Os compartimentos maiores apresentavam diferenças no assoalho e nas paredes para a distinção do lugar pelo animal. No pré-teste (Dia 0), os animais foram colocados no compartimento central da caixa, com ambas as portas abertas, e puderam explorar livremente todos os compartimentos da caixa por 15 minutos. Os resultados foram avaliados com o auxílio

do programa ANY-MAZE (Stoelting). Os animais que preferiram 70% ou mais um dos lugares foram descartados. No dia seguinte (Dia 1), os animais receberam uma injeção (i.p) de morfina (20 mg/kg), HUF-101 (3 ou 30 mg/kg) ou salina e foram imediatamente confinados no compartimento de condicionamento (lado pareado) por 30 min. No dia seguinte (Dia 2), todos os animais receberam uma injeção de salina e foram confinados no compartimento oposto (lado não pareado). Foram realizadas 3 sessões de condicionamento ao lado pareado e 3 ao lado não pareado em dias alternados. No dia teste (Dia 7) os animais foram colocados novamente no compartimento central da caixa, com ambas as portas abertas, e puderam explorar livremente todos os compartimentos da caixa por 15 minutos. O resultado foi expresso como tempo final – tempo inicial no lado pareado com a droga (NEELAKANTAN et al., 2016).

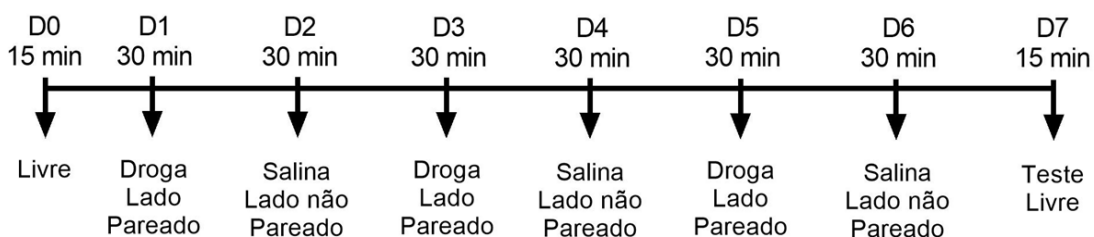


Figura 2: Esquema experimental do teste de preferência condicionada por lugar

3.5. Análise estatística

Todos os resultados foram representados como média \pm EPM, sendo que os testes comportamentais de Von Frey e Acetona, bem como a avaliação do volume tumoral (4T1) foram analisados pela Anova de medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls (S-N-K). Já no experimento de avaliação do peso tumoral foi utilizado Anova de 2 vias seguido de S-N-K. Os demais resultados foram analisados pela Anova de uma via seguido de S-N-K. O nível de significância estatístico utilizado foi de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Efeito do HUF-101 na reversão da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel

Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos com HUF-101 não foram capazes de reverter a alodinia mecânica já instalada pelo PCX. O teste de Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito no tratamento ($F_{4,20}=18,96$; $p < 0,05$), no tempo ($F_{9,36}= 21,37$; $p < 0,05$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{36,180}= 3,70$; $p < 0,05$), sendo que o pós-teste S-N-K demonstrou que o PCX foi capaz de induzir alodinia mecânica a partir do 3º dia. Foi observado ainda que apenas no 15º dia o HUF-101 nas doses de 3 e 10 mg/kg foi capaz de atenuar o efeito do PCX.

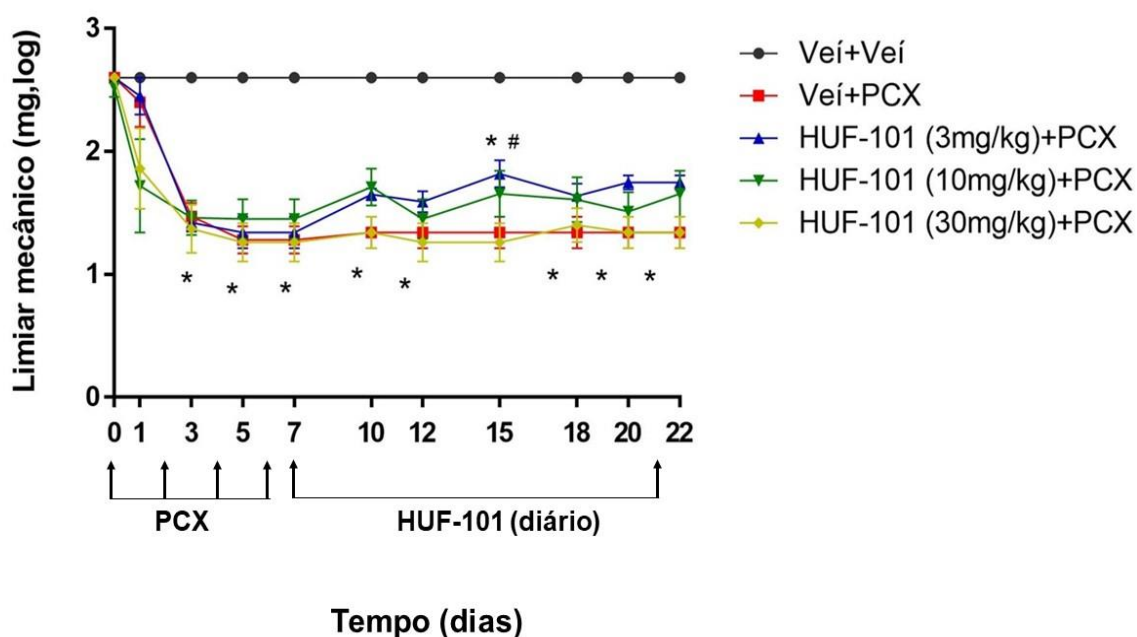


Figura 3: HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) administrado do 7º ao 21º dia não reverte a alodinia mecânica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de veículo (Veí) ou Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) nos dias 0, 2, 4 e 6. Veículo (Veí) ou HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) foram administrados do 7º ao 21º dia (n=5/grupo). O teste de Von Frey foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20 e 22. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.2 Experimento 2: Efeito do tratamento de 14 dias com HUF-101 na prevenção da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel

Foi observado que o tratamento com HUF-101, nas doses de 3 e 10 mg/kg, foi capaz de bloquear o efeito do PCX em induzir alodinia mecânica. Já a dose de 30 mg/kg foi capaz de atenuar o efeito do PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 128,01$; $p < 0,05$), tempo ($F_{6,120} = 38,89$; $p < 0,05$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{24,120} = 17,84$; $p < 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o PCX foi capaz de induzir alodinia mecânica a partir do 3º dia. Além disso, foi observado que o tratamento com o HUF-101, na dose de 3 mg/kg, foi capaz de bloquear o efeito do PCX a partir do 5º dia. Já a dose de 10 mg/kg foi capaz de bloquear o efeito do PCX a partir do 3º dia e a dose 30 mg/kg foi capaz de atenuar o efeito do PCX a partir do 5º dia.

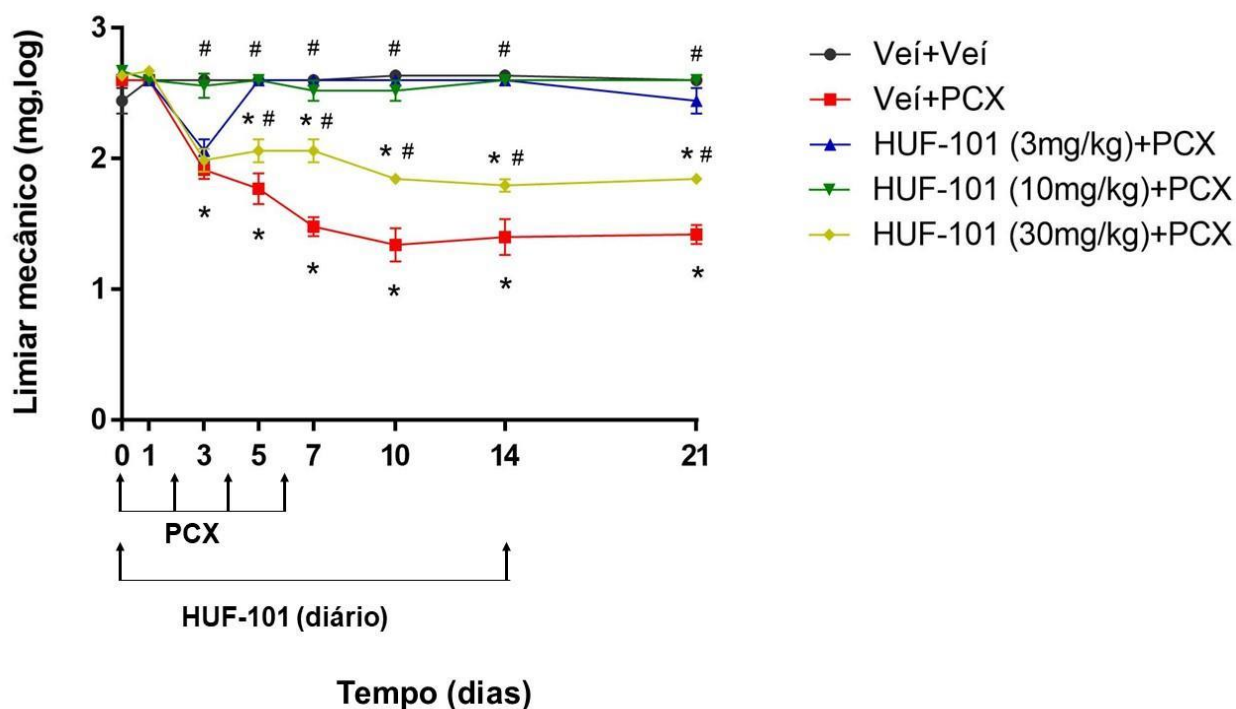


Figura 4: HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) administrado durante 14 dias previne a alodinia mecânica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de veículo (Veí) ou Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) nos dias 0, 2, 4 e 6. Veículo (Veí) ou HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) foram administrados do dia 0 ao 14º (n=5/grupo). O teste de Von Frey foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados

apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.3 Experimento 3: Efeito do tratamento concomitante HUF-101 e PCX na prevenção da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel

Foi observado que o tratamento com HUF-101 nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg foram capazes de bloquear a alodinia mecânica induzida por PCX apenas no 3º e 5º dia. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 9,31$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{6,120} = 59,56$; $p < 0,05$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{24,120} = 6,86$; $p < 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o PCX foi capaz de induzir alodinia mecânica a partir do 3º dia.

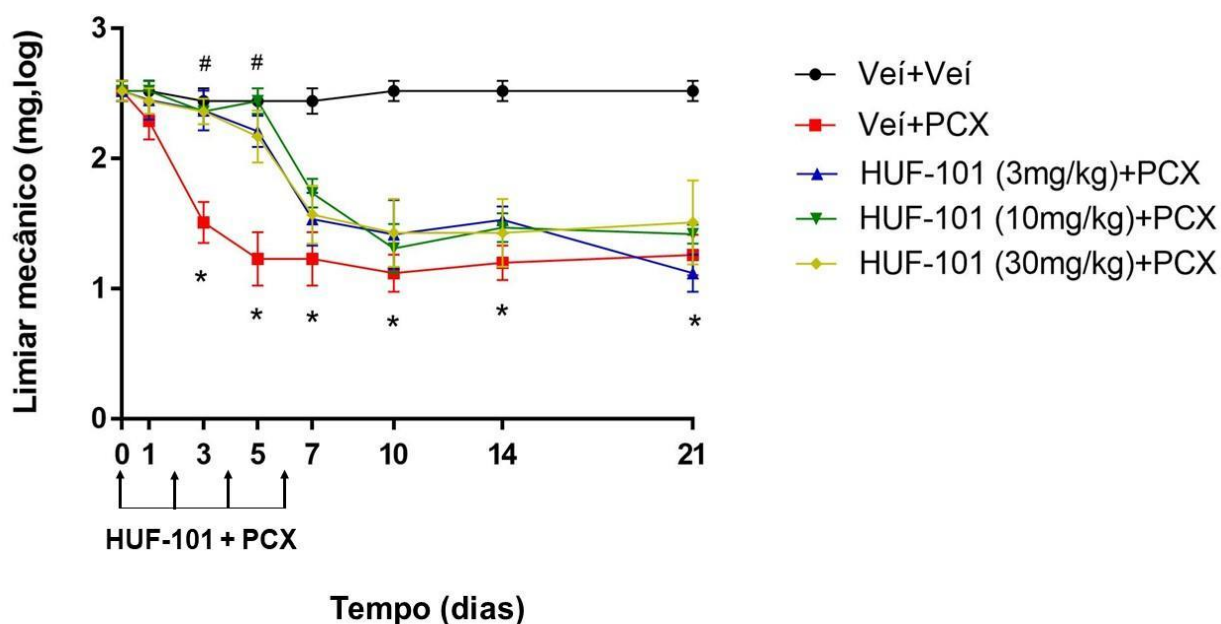


Figura 5: HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) administrado concomitante com o PCX não previne a alodinia mecânica induzida por este quimioterápico. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de Veículo (Veí) ou HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 minutos antes da segunda injeção de veículo (Veí) ou Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg, =5/grupo). O teste de Von Frey foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5,

7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.4 Experimento 4: Efeito do tratamento por 7 dias com HUF-101 na prevenção da alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel

Neste protocolo, foi observado que o tratamento com HUF-101, nas doses de 1 e 3 mg/kg, foi capaz de bloquear a alodinia mecânica induzida por PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{3,24} = 36,56$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{6,144} = 4,74$; $p < 0,05$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{18,144} = 2,66$; $p < 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o PCX foi capaz de induzir alodinia mecânica a partir do 1º dia. Além disso, foi observado que o tratamento com HUF-101 nas doses de 1 e 3 mg/kg foi capaz de bloquear o efeito do PCX a partir do 1º dia.

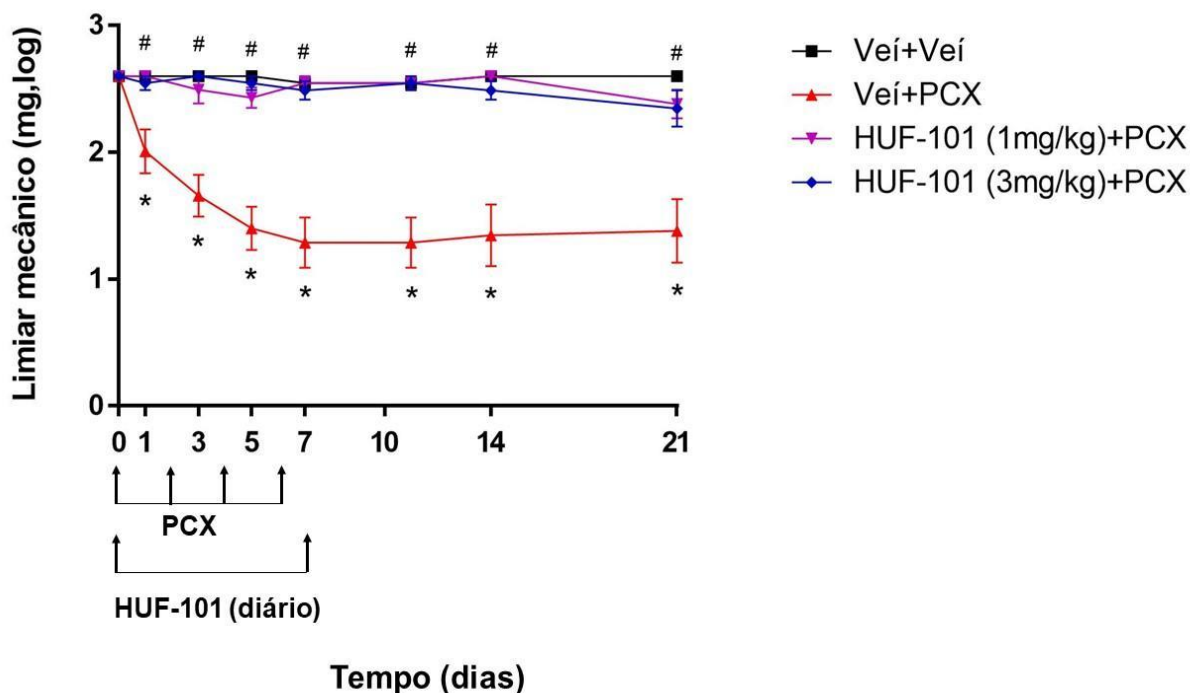


Figura 6: HUF-101 (1 e 3 mg/kg) administrado por 7 dias previne a alodinia mecânica induzida pelo PCX até o 21º dia. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de Veículo (Veí) ou HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg,) nos dias 0 a 7º, 30 minutos antes da segunda injeção de veículo (Veí) ou Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) que foi administrada apenas nos dias 0, 2, 4 e 6 (n=7/grupo). O teste de Von Frey foi realizado

nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.5 Experimento 5: Efeito do tratamento por 7 dias com HUF-101 na prevenção da alodinia térmica induzida pelo paclitaxel

Os resultados obtidos demonstraram que HUF-101 nas doses de 1 e 3 mg/kg foram capazes de bloquear o efeito do PCX em induzir alodinia térmica. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{3,24} = 25,80$; $p < 0,05$, pelo teste de S-N-K), mas não houve efeito do tempo ($F_{6,144} = 0,60$; $p > 0,05$), e não houve interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{18,144} = 0,61$; $p > 0,05$).

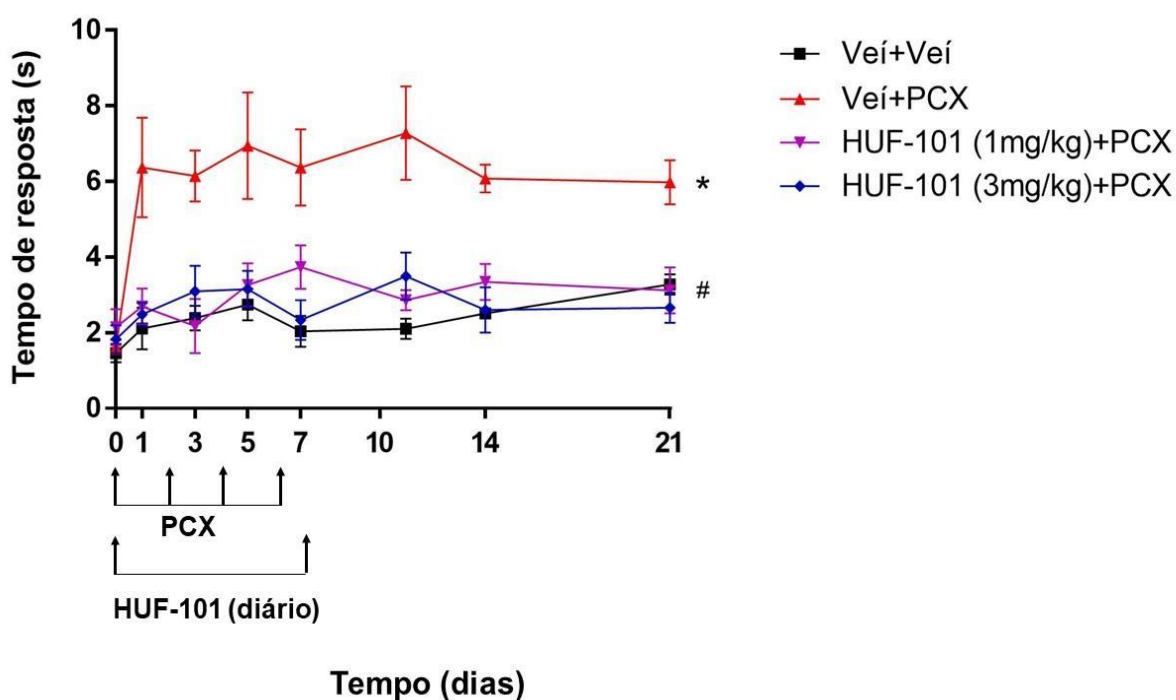


Figura 7: HUF-101 (1 e 3 mg/kg) administrado por 7 dias previne a alodinia térmica induzida pelo PCX até o 21º dia. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de Veículo (Veí) ou HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg,) nos dias 0 ao 7º, 30 minutos antes da segunda injeção de veículo (Veí) ou Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) que foi administrada apenas nos dias 0, 2, 4 e 6 (n=7/grupo). O teste da acetona foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.6 Experimento 6: Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel

Foi observado que o AM251 (0,3 mg/kg) não foi capaz de bloquear o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 126,03$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{6,120} = 15,41$; $p < 0,05$), e interação entre tratamento e tempo ($F_{24,120} = 6,29$; $p < 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o PCX foi capaz de induzir alodinia mecânica a partir do 3º dia, sendo este efeito prevenido pelo tratamento com HUF-101 na dose de 1 mg/kg. Tal efeito, não foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista CB1, que também não demonstrou efeito per si em bloquear o efeito do PCX.

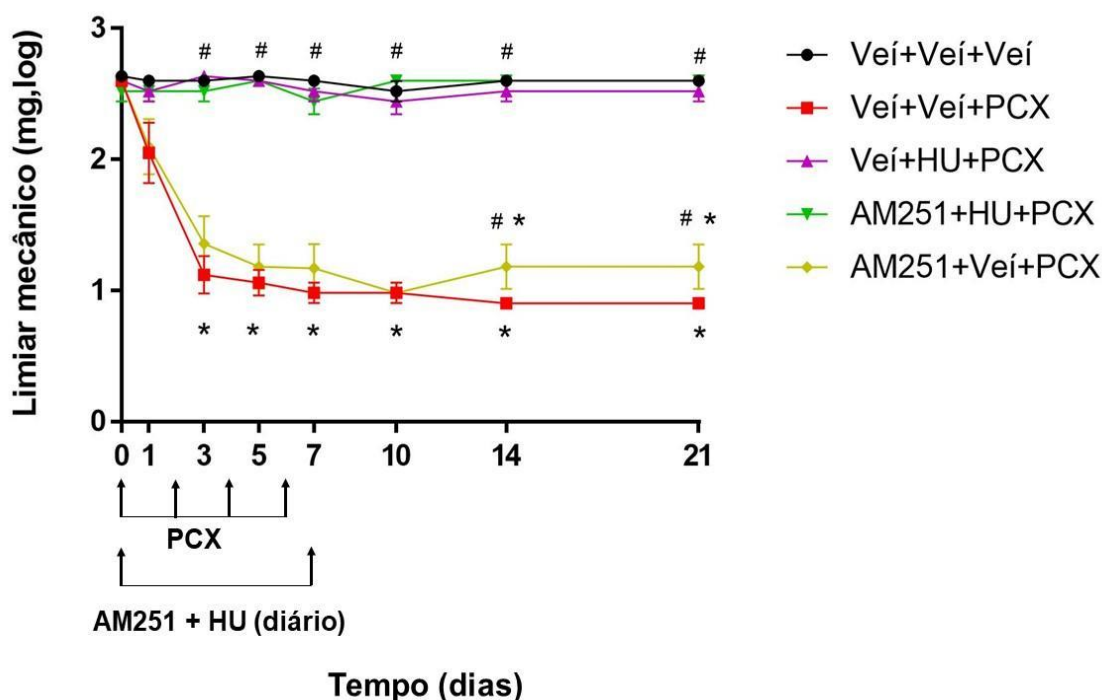


Figura 8: AM251 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de AM251 (0,3 mg/kg) ou Veículo (Veí), 30 min depois receberam uma segunda injeção de HUF-101 (1 mg/kg) ou Veículo (Veí) nos dias 0 ao 7º. Nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 minutos após a segunda injeção de veículo ou HUF-101 foi administrada a terceira injeção de Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) ou Veículo (Veí, n=5/grupo). O teste de Von

Frey foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.7 Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia térmica induzida pelo paclitaxel

Foi observado que o AM251 (0,3 mg/kg) não foi capaz de bloquear o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) em prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 14,17$; $p < 0,05$), mas não houve efeito do tempo ($F_{6,120} = 1,42$; $p > 0,05$), nem interação entre tratamento e tempo ($F_{24,120} = 0,52$; $p > 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o antagonista CB1 não teve efeito per si em bloquear o efeito do PCX.

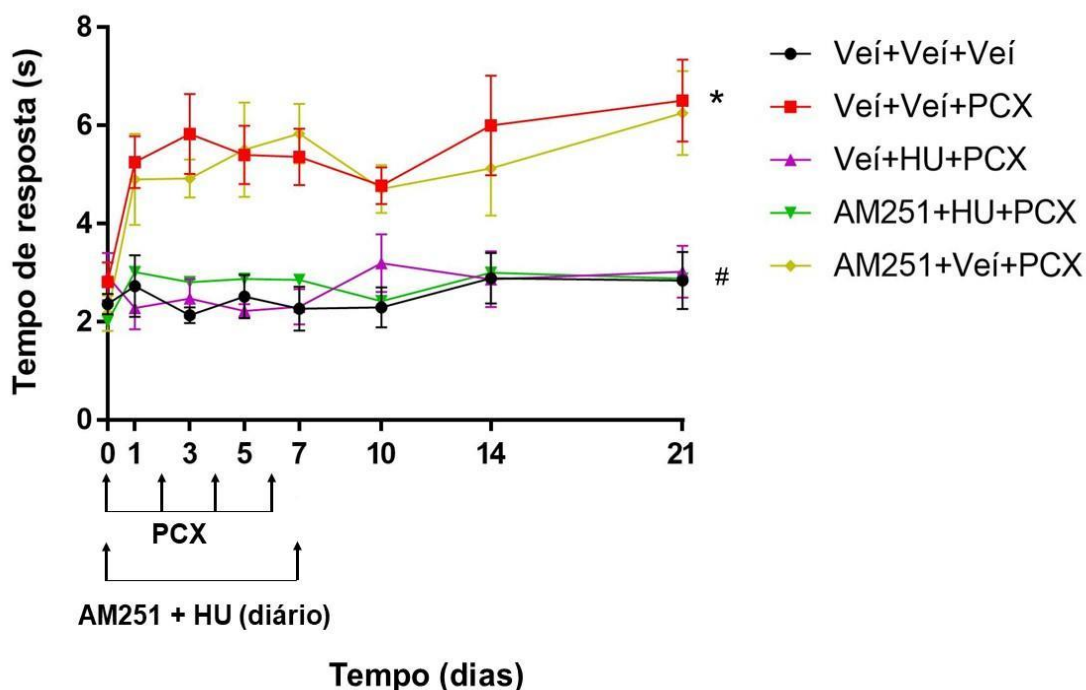


Figura 9: AM251 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de AM251 (0,3 mg/kg) ou Veículo (Veí), 30 min depois receberam uma segunda injeção de HUF-101 (1 mg/kg) ou Veículo (Veí) nos dias 0 ao 7^o. Nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 minutos após a segunda injeção de veículo ou HUF-101 foi administrada a terceira injeção de Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) ou Veículo (Veí, n=5/grupo). O teste da

Acetona foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.8 Experimento 8: Efeito do pré-tratamento com AM630 (antagonista CB2) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel

Foi observado que o AM630 (0,3 mg/kg) não foi capaz de bloquear o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 68,62$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{6,120} = 24,08$; $p < 0,05$), e da interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{24,120} = 7,80$; $p < 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o PCX foi capaz de induzir alodinia mecânica a partir do 3º dia, sendo este efeito prevenido pelo tratamento com HUF-101 na dose de 1 mg/kg. Tal efeito, não foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista CB2, que também não demonstrou efeito per si em bloquear o efeito do PCX.

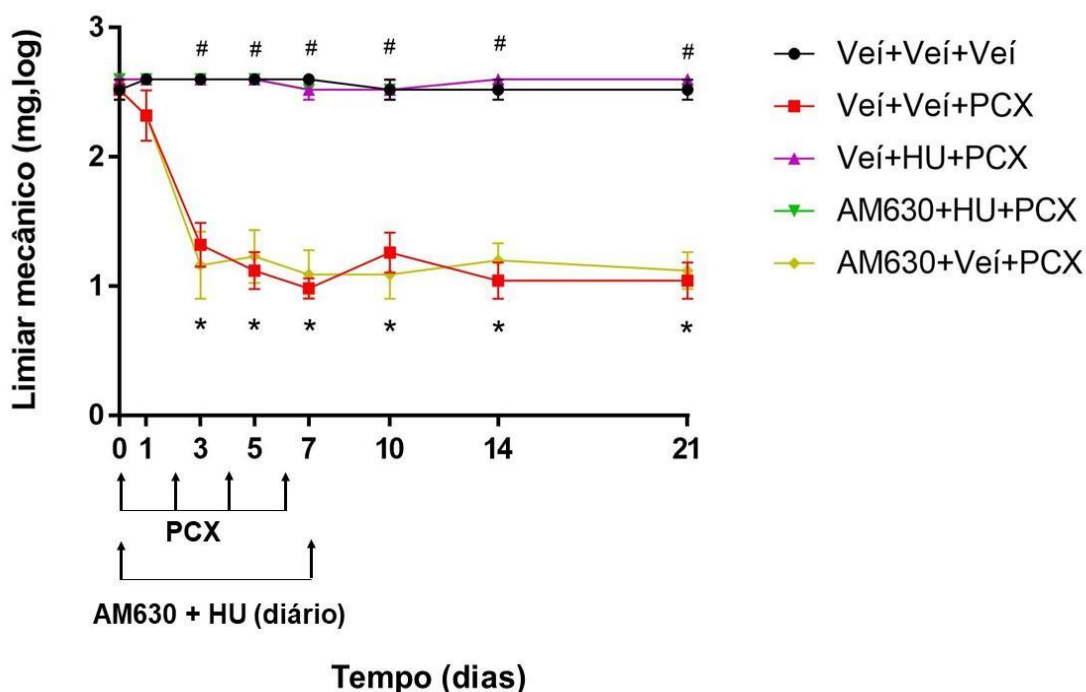


Figura 10: AM630 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de AM630 (0,3 mg/kg) ou Veículo (Veí), 30 min depois receberam uma segunda injeção de HUF-101 (1 mg/kg) ou Veículo

(Veí) nos dias 0 ao 7º. Nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 minutos após a segunda injeção de veículo ou HUF-101 foi administrada a terceira injeção de Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) ou Veículo (Veí, n=5/grupo). O teste de Von Frey foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+PCX+Veí, pelo teste de S-N-K.

4.9 Experimento 9: Efeito do pré-tratamento com AM630 (antagonista CB2) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia térmica induzida pelo paclitaxel

Foi observado que o AM630 (0,3 mg/kg) não foi capaz de bloquear o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) em prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 25,70$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{6,120} = 4,38$; $p < 0,05$), mas não houve interação entre tratamento e tempo ($F_{24,120} = 0,86$; $p > 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o antagonista CB2 não teve efeito per si em bloquear o efeito do PCX.

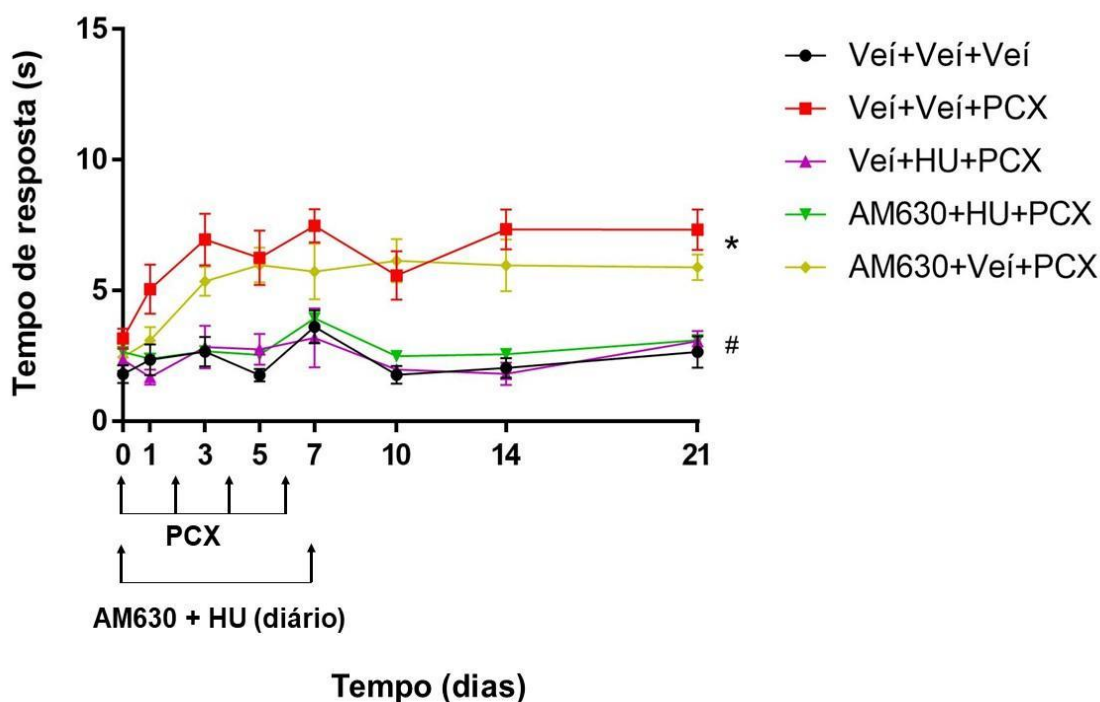


Figura 11: AM630 (0,3 mg/kg) não bloqueia o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de AM630 (0,3 mg/kg) ou Veículo (Veí), 30 min depois receberam uma segunda injeção de HUF-101 (1 mg/kg) ou Veículo (Veí)

nos dias 0 ao 7^o. Nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 minutos após a segunda injeção de veículo ou HUF-101 foi administrada a terceira injeção de Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) ou Veículo (Veí, n=5/grupo). O teste da Acetona foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+PCX+Veí, pelo teste de S-N-K.

4.10 Experimento 10: Efeito do pré-tratamento com GW9662 (antagonista PPAR γ) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel

Os dados obtidos demonstram que o GW9662 (2 mg/kg) foi capaz de bloquear o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) em prevenir a alodinia mecânica induzida por PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 91,83$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{6,120} = 10,83$; $p < 0,05$), e interação entre tratamento e tempo ($F_{24,120} = 3,60$; $p < 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o PCX foi capaz de induzir alodinia mecânica a partir do 1^o dia, sendo este efeito prevenido pelo tratamento com HUF-101 na dose de 1 mg/kg. O pré-tratamento com o antagonista PPAR γ atenuou os efeitos do HUF-101 nos dias 1 e 5 e bloqueou nos demais dias, e não demonstrou efeito per si em bloquear o efeito do PCX.

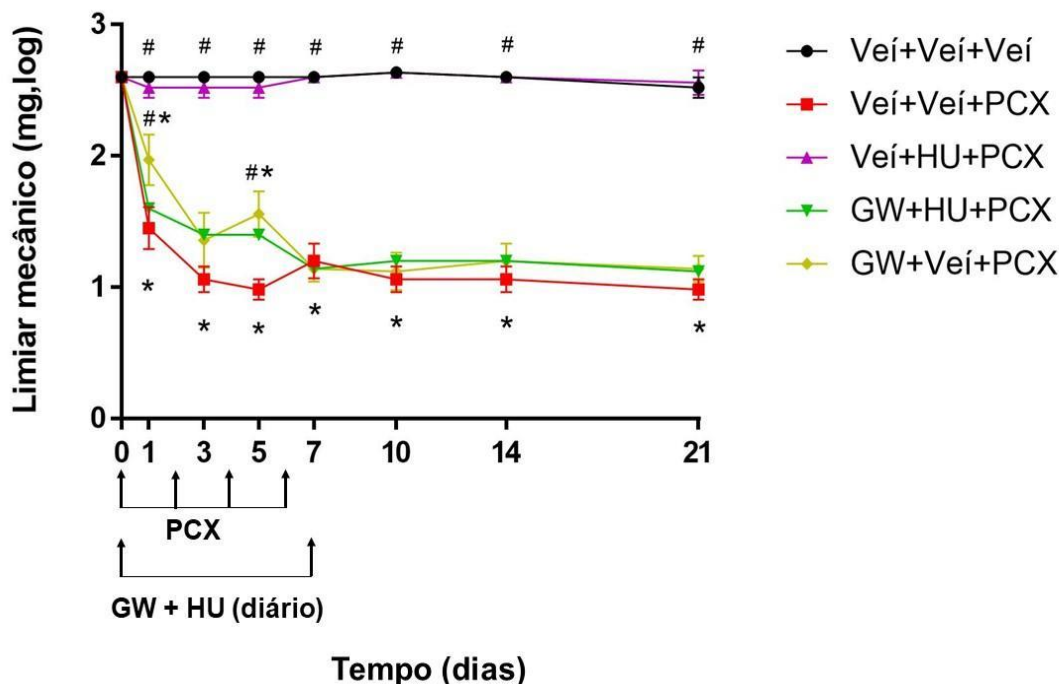


Figura 12: GW9662 (2 mg/kg) bloqueia efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de GW9662 ou Veículo (Veí), 30 min depois receberam uma segunda injeção de HUF-101 (1 mg/kg) ou Veículo (Veí) nos dias 0 ao 7°. Nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 minutos após a segunda injeção de veículo ou HUF-101 foi administrada a terceira injeção de Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) ou Veículo (Veí; n=5/grupo). O teste de Von Frey foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.11 Experimento 11: Efeito do pré-tratamento com GW9662 (antagonista PPAR γ) sobre o efeito do HUF-101 em prevenir a alodinia térmica induzida pelo paclitaxel

Os resultados demonstraram que o tratamento com GW9662 (2 mg/kg) foi capaz de bloquear o efeito do HUF-101 (1 mg/kg) em prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX. A Anova de medidas repetidas demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{4,20} = 27,12$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{6,120} = 11,39$; $p < 0,05$), mas não houve interação entre tratamento e tempo ($F_{24,120} = 1,19$; $p > 0,05$). O teste de S-N-K demonstrou que o antagonista PPAR γ não teve efeito per si em bloquear o efeito do PCX.

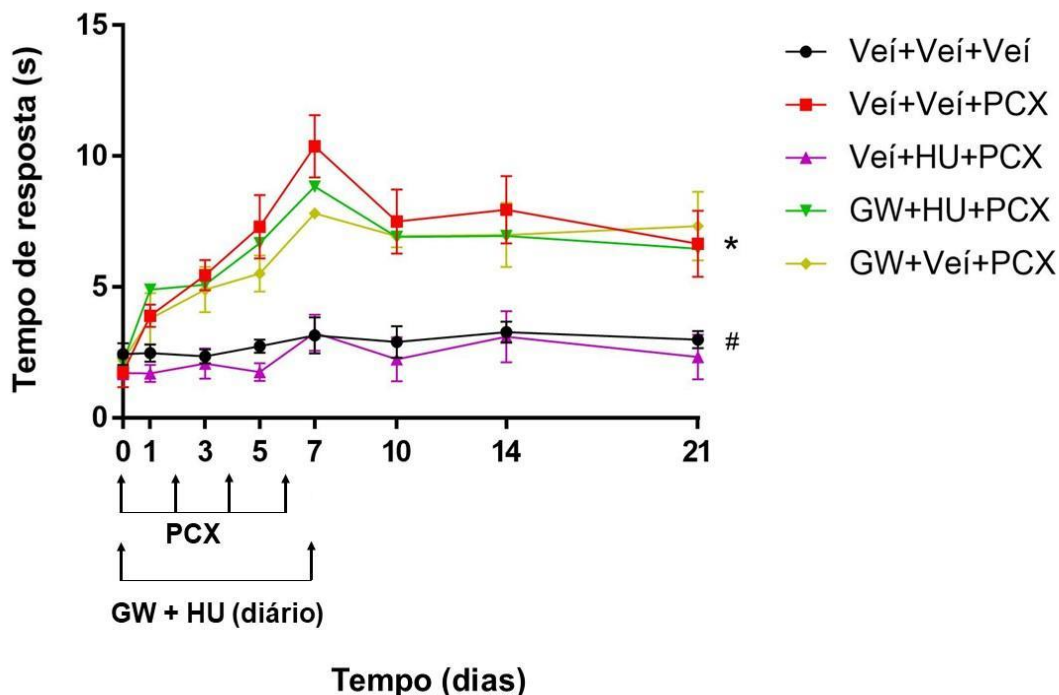


Figura 13: GW9662 (2 mg/kg) bloqueia efeito do HUF-101 (1 mg/kg) de prevenir a alodinia térmica induzida pelo PCX. Camundongos C57BL/6J receberam uma injeção (i.p) de GW9662 ou Veículo (Veí), 30 min depois receberam uma segunda injeção de HUF-101 (1 mg/kg) ou Veículo (Veí) nos dias 0 ao 7°. Nos dias 0, 2, 4 e 6, 30 minutos após a segunda injeção de veículo ou HUF-101 foi administrada a terceira injeção de Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) ou Veículo (Veí; n=5/grupo). O teste da Acetona foi realizado nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí+PCX, pelo teste de S-N-K.

4.12 Experimento 12: Efeito da expressão gênica da citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Iba-1 e do receptor PPAR γ nos GRDs (L3, L4 e L5) após o tratamento com PCX

Os resultados mostraram que o tratamento com PCX aumentou a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Iba-1, mas não de PPAR γ nos GRDs. A Anova de uma via seguida de S-N-K demonstrou que houve aumento da expressão gênica de TNF- α , 6h após o tratamento com PCX (Figura 14A; $F_{6,27} = 8,14$; $p < 0,05$); bem como de IL-1 β (Figura 14B; $F_{6,28} = 4,84$; $p < 0,05$); de IL-6 (Figura 14C; $F_{6,27} = 4,56$; $p < 0,05$) e Iba-1, que também

teve um aumento significativo da expressão gênica 3 dias após o tratamento com PCX (Figura 14D; $F_{6,28}$ 3,55; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa observada na expressão gênica dos receptores PPAR γ em nenhum tempo avaliado (Figura 14E; $F_{6,28}$ 2,03; $p > 0,05$).

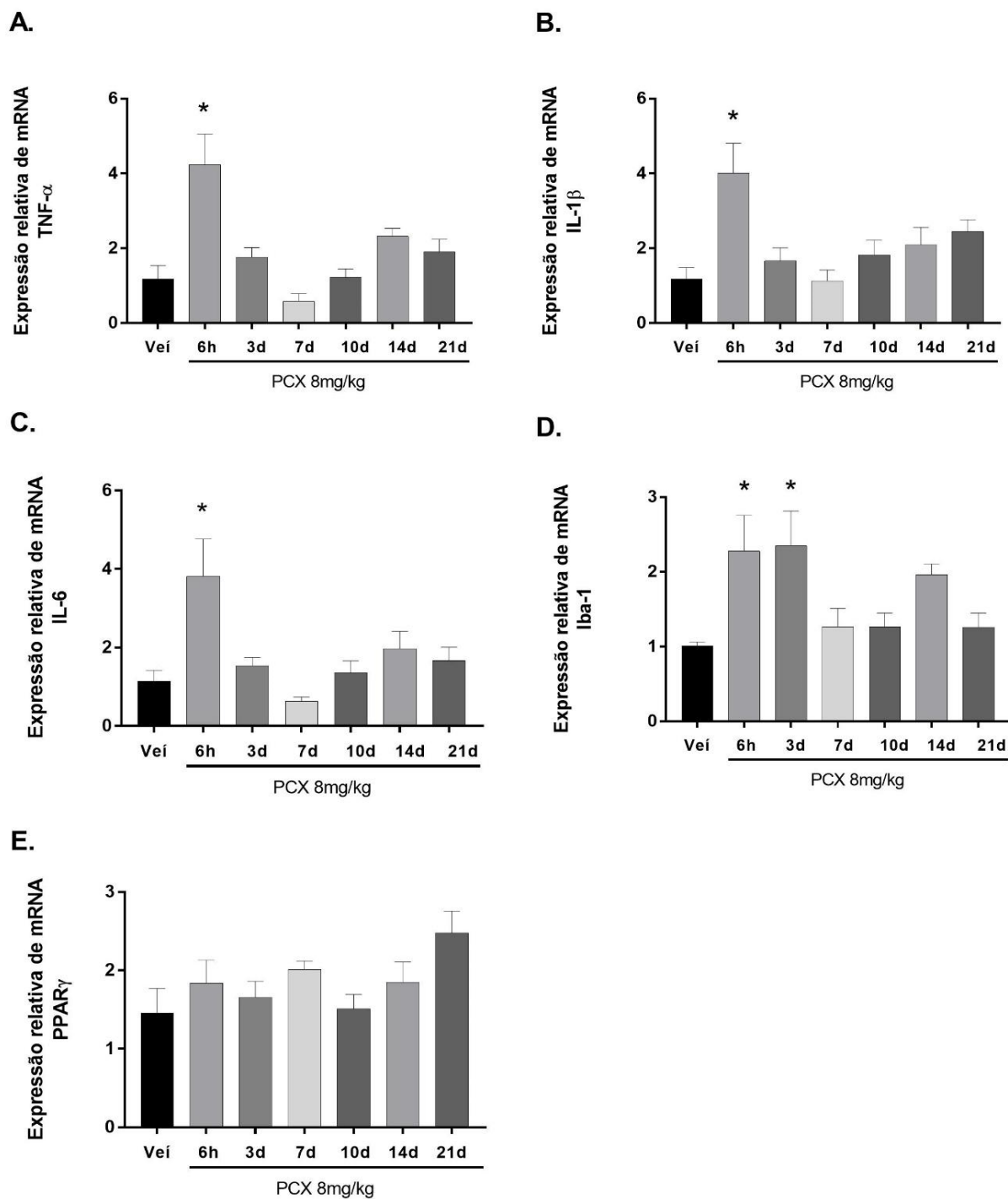


Figura 14: PCX (8 mg/kg) aumenta a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Iba-1 nos GRDs (L3, L4 e L5). Camundongos C57BL/6J receberam quatro injeções (i.p) de Veículo (Veí,) ou PCX (8 mg/kg) nos dias 0, 2, 4 e 6. 6h após a primeira injeção com PCX ou 3, 7, 10, 14 e 21 dias após o tratamento os animais foram anestesiados e perfundidos com PBS para a coleta dos GRDs (L3, L4 e L5) e posterior análise da expressão gênica dos alvos acima citados (n=4-5/grupo). Os animais tratados com Veí foram

sacrificados 24h após a quarta injeção no dia 7. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí, pelo teste S-N-K.

4.13 Experimento 13: Efeito do tratamento do HUF-101 (1 mg/kg) sobre o aumento da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Iba-1 nos GRDs (L3, L4 e L5) após o tratamento com PCX

Foi observado que o tratamento com HUF-101 (1 mg/kg) foi capaz de atenuar o aumento da expressão gênica de TNF- α , IL-6 e Iba-1, mas não de IL-1 β . A Anova de uma via seguido de S-N-K, demonstrou que o tratamento com HUF-101 foi capaz de atenuar a expressão gênica de TNF- α (Figura 15A; $F_{6,27} = 8,63$; $p < 0,05$); e IL-6 (Figura 15C; $F_{6,27} 2,7$; $p < 0,05$) 6h após o tratamento com PCX. Já a diminuição da expressão gênica de Iba-1, ocorreu 3 dias após o tratamento com PCX (Figura 15D; $F_{6,27} 3,36$; $p < 0,05$). Não houve efeito do HUF-101 em relação ao aumento da expressão gênica de IL-1 β 6h após o tratamento com PCX (Figura 15B; $F_{6,27} 7,11$; $p > 0,05$).

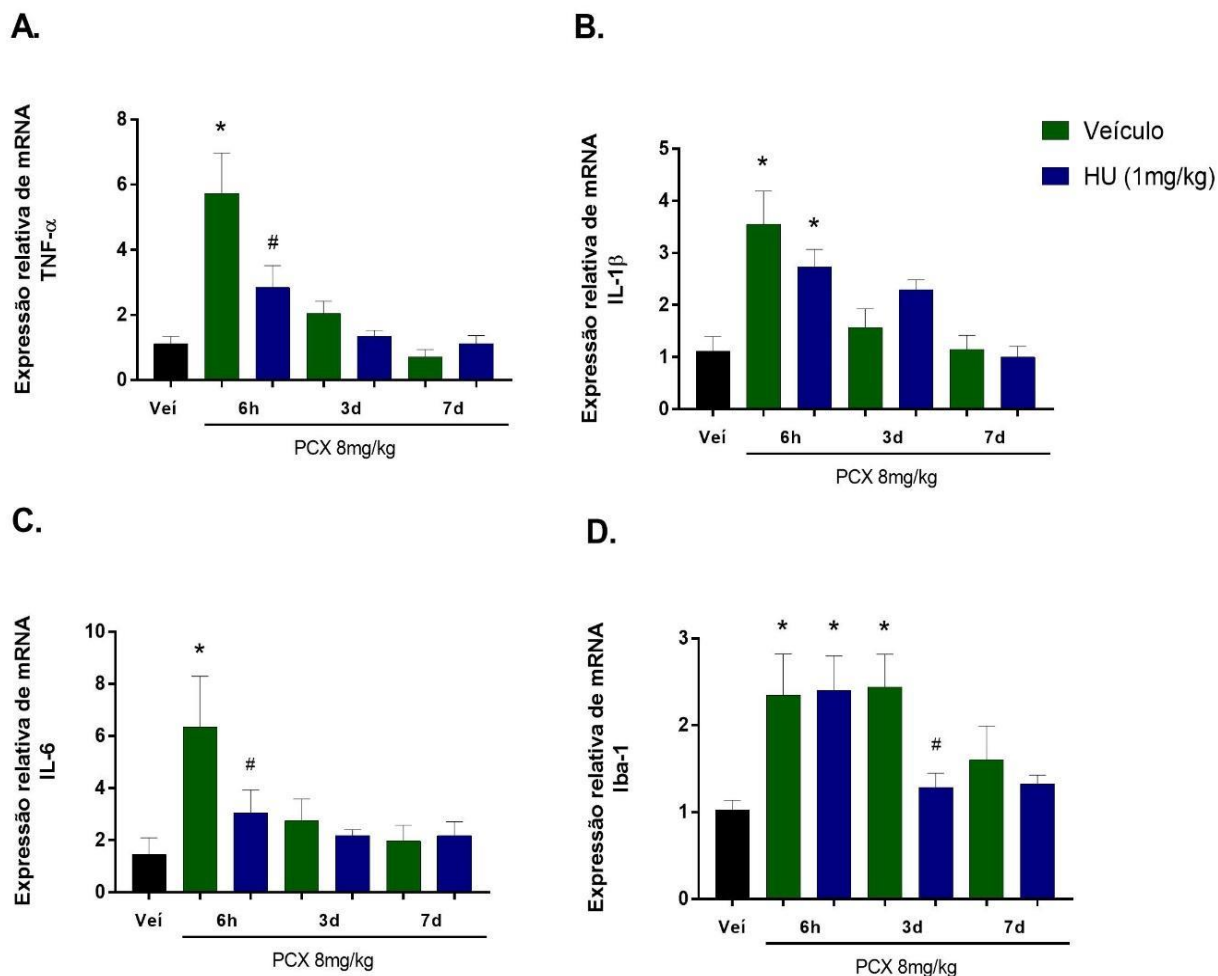
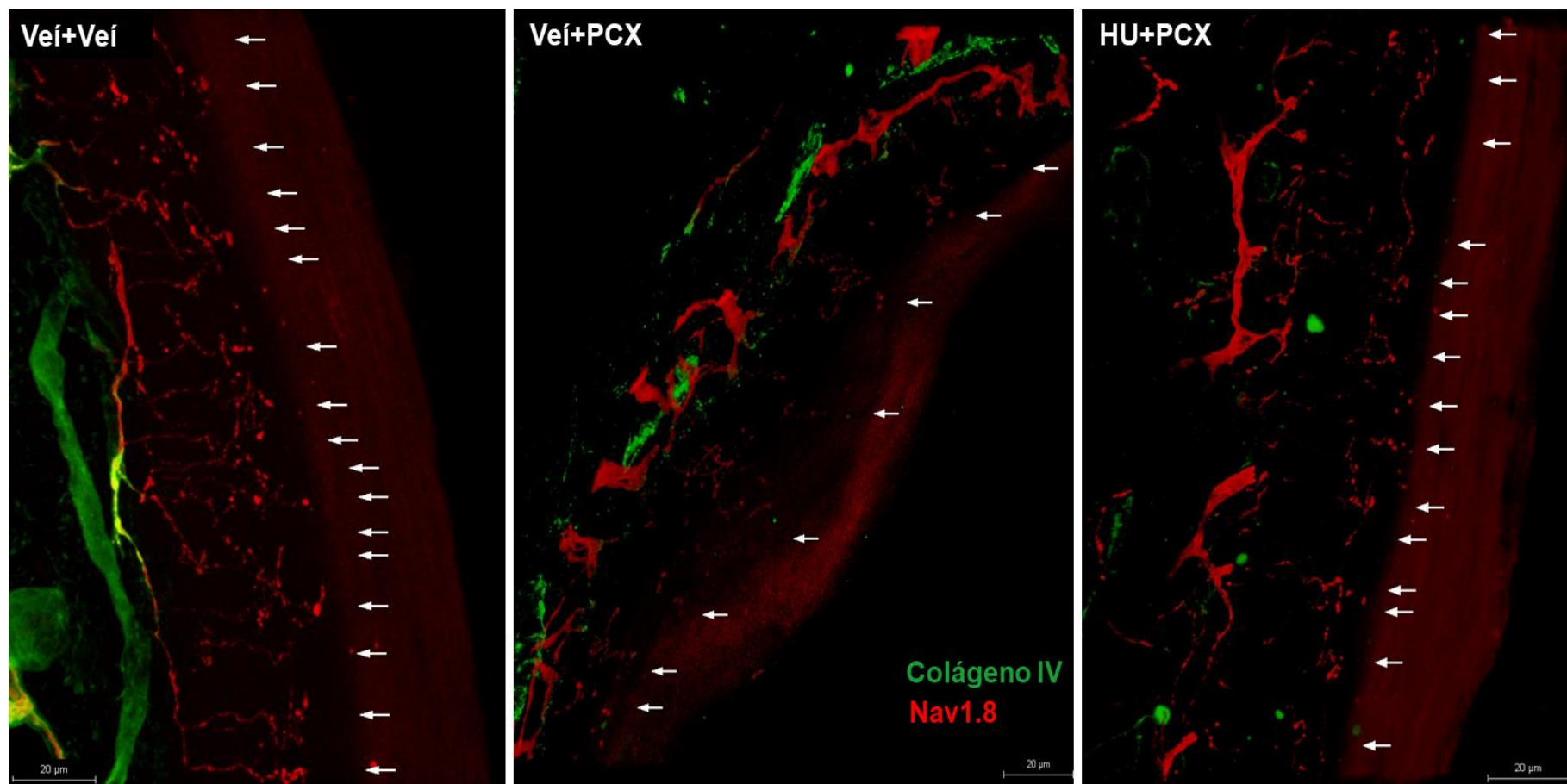


Figura 15: HUF-101 diminui o aumento da expressão gênica de TNF- α , IL-6 e Iba-1 nos GRDs (L3, L4 e L5) após o tratamento com PCX. Camundongos C57BL/6J receberam injeções (i.p) de Veículo (Veí) ou HUF-101 (1 mg/kg) dos dias 0 ao 6. O tratamento com PCX (8 mg/kg) foi realizado nos dias 0, 2, 4 e 6, sendo que nos dias em que o animal recebia também o HUF-101, este foi administrado 30 min antes do PCX (n=4-5/grupo). 6h após a primeira injeção com PCX ou 3 e 7 dias após, os animais foram anestesiados e perfundidos com PBS para a coleta dos GRDs (L3, L4 e L5) e posterior análise da expressão gênica dos alvos acima citados. Os animais tratados com Veí foram sacrificados no dia 7, 24h após a última injeção. Dados apresentados como média \pm EPM. *p<0,05 em relação ao grupo Veí+Veí e #p<0,05 em relação ao grupo Veí+PCX pelo teste de S-N-K.

4.14 Experimento 14: Avaliação do tratamento com HUF-101 e PCX sobre as FNIDs

Os resultados demonstraram que houve uma tendência para o efeito do PCX (8 mg/kg) em diminuir o número de FNIDs e do HUF-101 (1 mg/kg) em bloquear este efeito; ($F_{2,3} = 6,87$; $p = 0,07$), pelo teste de Anova de uma via seguida de S-N-K.

A.



B.

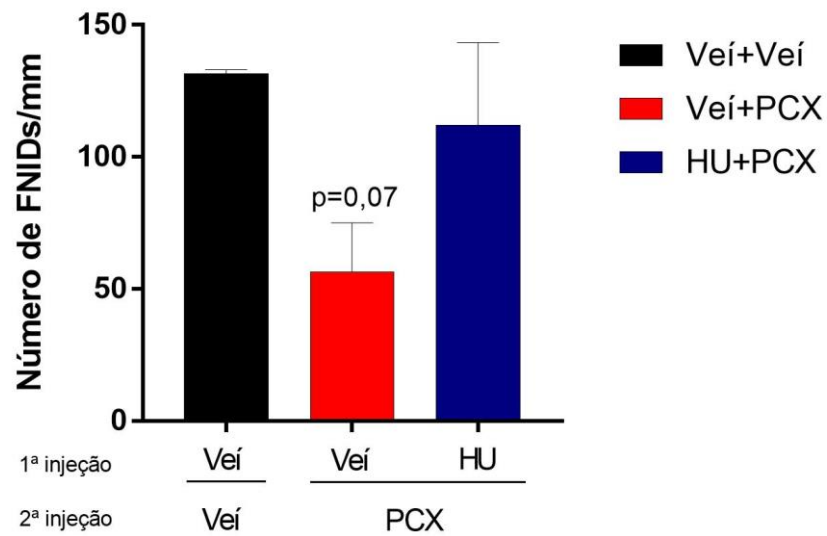


Figura 16: Tratamento com o PCX (8 mg/kg) tem uma tendência em diminuir o número de FNIDs, enquanto o tratamento com HUF-101 (1 mg/kg) tende a bloquear este efeito. Camundongos Nav1.8-cre-tdTomato receberam injeções (i.p) de Veículo (Veí) ou HUF-101 (1 mg/kg) dos dias 0 ao 6. O tratamento com PCX (8 mg/kg) ou Veículo foi realizado nos dias 0, 2, 4 e 6, sendo que nos dias em que o animal recebia também o HUF-101, este foi administrado 30 min antes do PCX (n=2/grupo). 24h após a última injeção, os animais foram anestesiados e perfundidos com PBS e PFA 4% para coleta da epiderme da pata traseira e processamento para imunofluorescência. **A.** Imagens representativas das FNIDs marcadas com a seta. **B.** Quantificação das FNIDs.

4.15 Experimento 15: Efeito de diferentes concentrações do paclitaxel sobre a viabilidade celular de células de câncer de mama murino (4T1)

O tratamento por 24h com PCX nas concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10 μM foi capaz de diminuir a viabilidade celular de células de câncer de mama murino (4T1); ($F_{7,40}=631,2$; $p<0,05$) pelo teste de anova de uma via seguido de SNK.

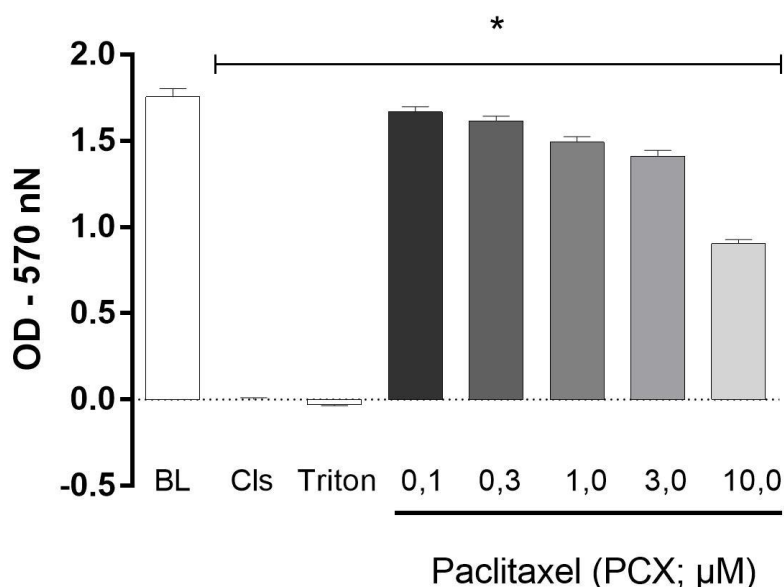


Figura 17: Tratamento durante 24h com PCX (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 μM) diminui a viabilidade celular das células de câncer de mama murino (4T1). Células de câncer de mama murino da linhagem 4T1 foram tratadas com paclitaxel (0,1; 0,3; 1; 3 e 10 μM) por 24h e após, o ensaio para viabilidade celular, MTT foi realizado. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo Células (Cls), pelo teste de SNK.

4.16 Experimento 16: Efeito de diferentes concentrações do HUF-101 sobre a capacidade do paclitaxel em diminuir a viabilidade celular de células de câncer de mama murino (4T1)

O tratamento com HUF-101 (0,1; 0,3, 1 e 3 μM) concomitante com o PCX 3 e 10 μM não foi capaz de alterar o efeito do quimioterápico em diminuir a viabilidade celular das

células de câncer de mama murino. Além disso, o HUF-101, na concentração de 1 μM , também foi capaz de diminuir a viabilidade celular das células 4T1 per si, ($F_{16,51} = 54,06$; $p < 0,05$) pelo teste de Anova de uma via seguido de SNK.

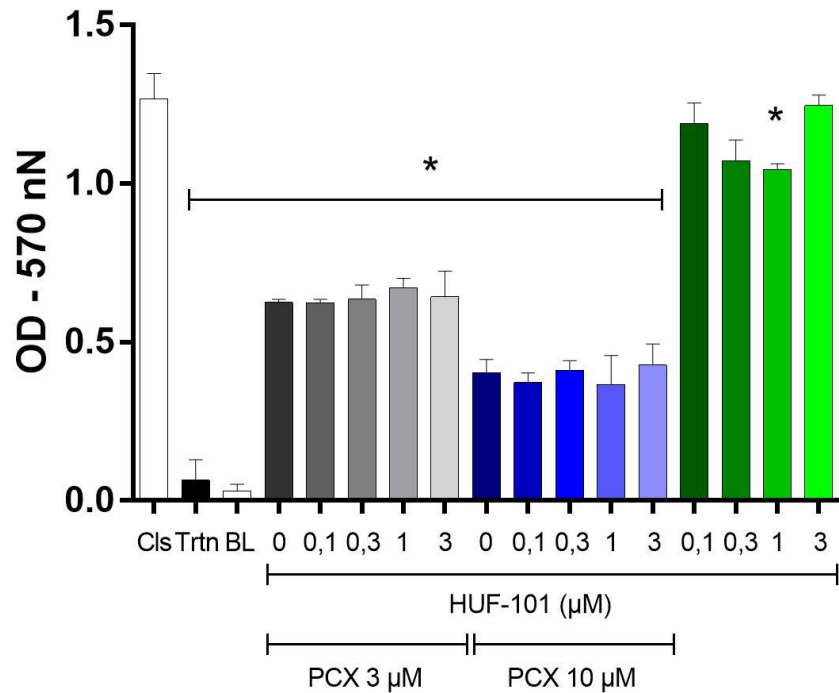


Figura 18: Tratamento durante 24h com HUF-101 (0,1, 0,3, 1 e 3 μM) não altera o efeito do PCX (3 e 10 μM) em diminuir a viabilidade celular de células 4T1. Células de câncer de mama murino da linhagem 4T1 foram tratadas com paclitaxel (3 e 10 μM) e HUF-101 (0,1, 0,3, 1 e 3 μM) por 24h e após, o ensaio para viabilidade celular, MTT foi realizado. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Células (Cls), pelo teste de SNK.

4.17 Experimento 17: Efeito de diferentes concentrações do HUF-101 sobre a capacidade do paclitaxel em diminuir a viabilidade celular de células de câncer de mama humano (MCF-7)

O tratamento com HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μM) concomitante com o PCX 3 e 10 μM não foi capaz de alterar o efeito do quimioterápico em diminuir a viabilidade celular das células de câncer de mama humano. Também foi observado que o HUF-101, em

todas as concentrações, per si, também foi capaz de diminuir a viabilidade celular das células MCF-7. Além disso, a associação do PCX 3 μM com HUF-101 0,3 μM produziu um efeito sinérgico em diminuir a viabilidade celular das células MCF-7 ($F_{19,60} = 46,92$; $p < 0,05$) pelo teste de Anova de uma via seguido de SNK.

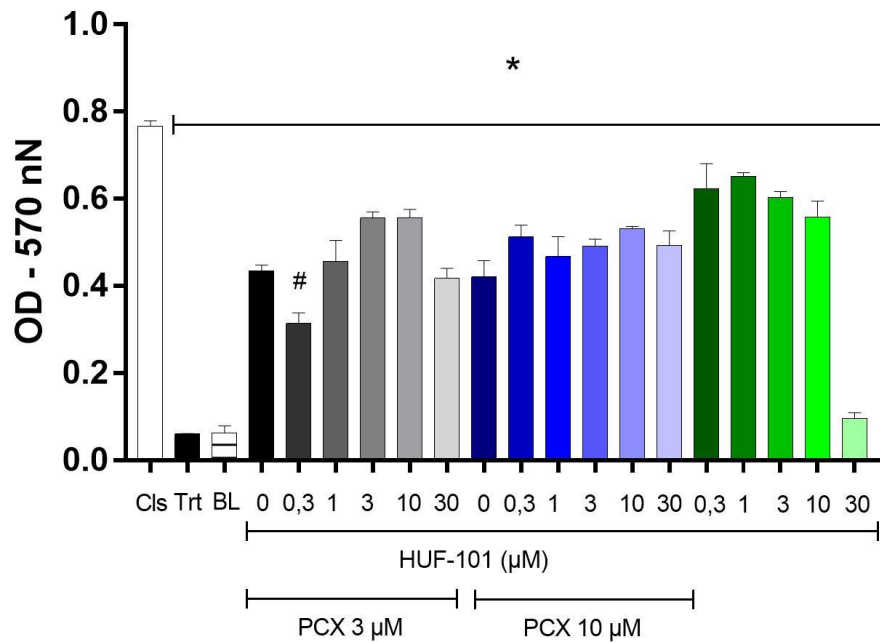


Figura 19: Tratamento durante 24h com HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μM) não altera o efeito do PCX (3 e 10 μM) em diminuir a viabilidade celular de células MCF-7. Células de câncer de mama humano da linhagem MCF-7 foram tratadas com paclitaxel (3 e 10 μM) e HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μM) por 24h e após, o ensaio para viabilidade celular, MTT foi realizado. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Células (Cls) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo PCX 3 μM , pelo teste de S-N-K.

4.18 Experimento 18: Efeito de diferentes concentrações do HUF-101 sobre a capacidade do paclitaxel em diminuir a viabilidade celular de células de carcinoma de cólon humano (HCT-116)

O tratamento com HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μM) concomitante com o PCX 3 e 10 μM não foi capaz de alterar o efeito do quimioterápico em diminuir a viabilidade celular das células de carcinoma de cólon humano. Também foi observado que o HUF-101, nas concentrações de 3, 10 e 30 μM , per si, também foi capaz de diminuir a viabilidade celular das células HCT-116. Além disso, a associação do PCX 3 μM com HUF-101 3, 10 e 30 μM produziu um efeito sinérgico em diminuir a viabilidade celular das células HCT-116 ($F_{19,60} = 47,71$; $p < 0,05$) pelo teste de Anova de uma via seguido de SNK.

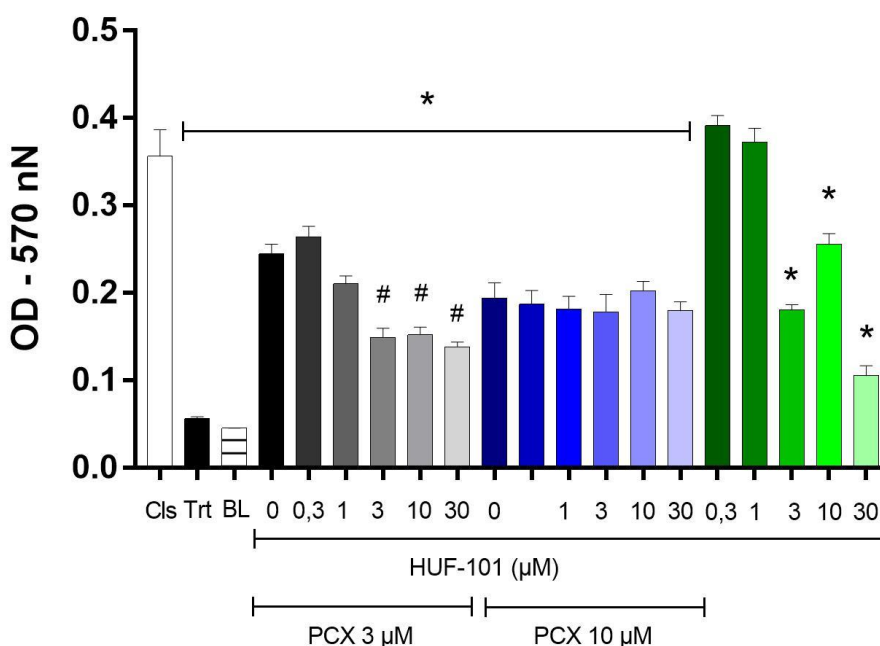


Figura 20: Tratamento durante 24h com HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μM) não altera o efeito do PCX (3 e 10 μM) em diminuir a viabilidade celular de células HCT-116. Células de carcinoma de cólon humano da linhagem HCT-116 foram tratadas com paclitaxel (3 e 10 μM) e HUF-101 (0,3, 1, 3, 10 e 30 μM) por 24h e após, o ensaio para viabilidade celular, MTT foi realizado. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Células (Cls) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo PCX 3 μM , pelo teste de S-N-K.

4.19 Experimento 19: Efeito do tratamento do HUF-101 sobre o efeito quimioterápico do paclitaxel em diminuir o volume tumoral no modelo de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c

Os resultados demonstraram que não houve efeito do tratamento com HUF-101 (1mg/kg) nem do PCX (8 mg/kg) em diminuir o volume tumoral em fêmeas BALB/c. A Anova de medidas repetidas mostrou que houve efeito do tempo ($F_{6,198} = 49,86$; $p < 0,05$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{3,33} = 0,92$; $p > 0,05$), nem interação entre tratamento e tempo ($F_{18,198} = 0,62$; $p > 0,05$).

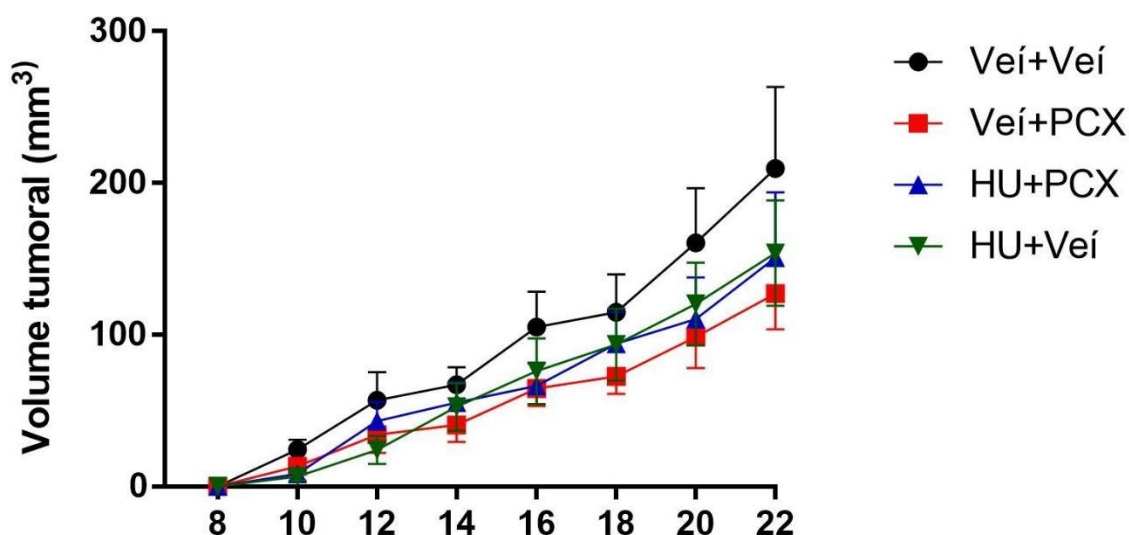


Figura 21: Tratamento do HUF-101 (1 mg/kg) e PCX (8 mg/kg) não diminui o volume do tumor de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c. Fêmeas BALB/c receberam uma injeção contendo 5×10^4 células da linhagem 4T1 no tecido subcutâneo do dorso. Após 9 dias de indução, os animais receberam uma injeção (i.p) de Veículo (Veí, $n=7$ /grupo) ou HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg, $n=7$ /grupo) nos dias 9 ao 21^o, 30 minutos antes da segunda injeção de veículo (Veí) ou Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) que foi administrada apenas nos dias 9, 11, 13, 15, 17 e 19. Os volumes tumorais foram avaliados nos dias 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22. Para o cálculo do volume a fórmula: volume do tumor (mm³) = $L \times W^2/2$, onde L representa o eixo maior (maior diâmetro transversal), e W representa o eixo menor do tumor, foi utilizada.

4.20 Experimento 20: Efeito do tratamento do HUF-101 sobre o efeito quimioterápico do paclitaxel em diminuir o peso tumoral no modelo de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c

Os resultados demonstraram que o PCX (8 mg/kg) foi capaz de diminuir o peso do tumor, sendo que o tratamento com HUF-101 (1 mg/kg) não interferiu nesse efeito. Além disso, foi observado que o tratamento com HUF-101 (1 mg/kg), per si, também foi capaz de diminuir o peso do tumor. A Anova de duas vias seguida de S-N-K, mostrou que houve efeito da segunda injeção ($F_{1,32} = 6,68$; $p < 0,05$), mas não houve efeito da primeira injeção ($F_{1,32} = 3,15$; $p = 0,08$). Além disso, houve uma tendência para a interação entre a primeira e segunda injeção ($F_{1,32} = 3,97$; $p = 0,054$).

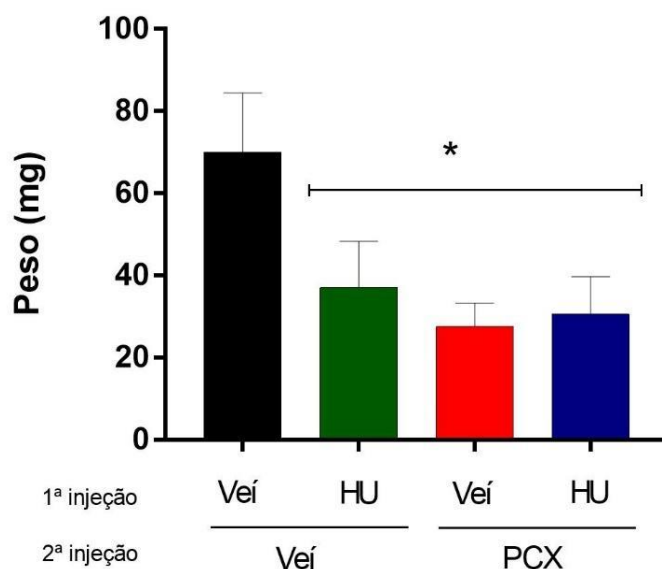


Figura 22: Tratamento do HUF-101 (1 mg/kg) não altera o efeito do PCX (8 mg/kg) sobre a redução do peso tumoral de câncer de mama (4T1) em fêmeas BALB/c, além de apresentar efeito, por si só em diminuir o peso do tumor. Fêmeas BALB/c receberam uma injeção contendo 5×10^4 células da linhagem 4T1 no tecido subcutâneo do dorso. Após 9 dias, os animais receberam uma injeção (i.p) de Veículo (Veí) ou HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg) nos dias 9 ao 21º, 30 minutos antes da segunda injeção de veículo (Veí) ou Paclitaxel (PCX, 8 mg/kg) que foi administrada apenas nos dias 9, 11, 13, 15, 17 e 19

(n=7/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí pelo teste de S-N-K.

4.21 Experimento 21: Efeito do tratamento do HUF-101 sobre equilíbrio e coordenação motora avaliados pelo teste de Rota Rod

Os resultados demonstraram que apenas o tratamento agudo com o controle positivo Diazepam (10 mg/kg) foi capaz de causar prejuízo no equilíbrio e coordenação motora dos animais; ($F_{3,16} = 18,56$; $p < 0,05$), pelo teste de Anova de uma via seguida de S-N-K.

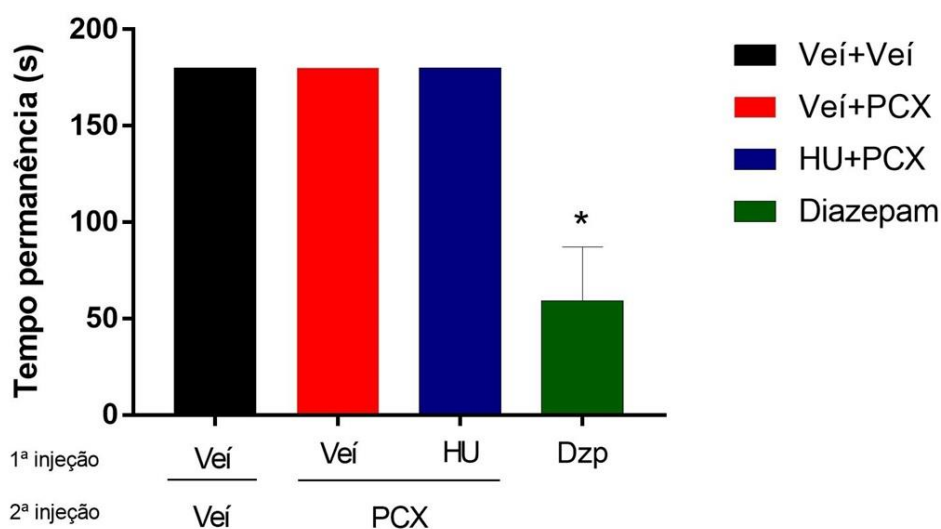


Figura 23: Tratamento com HUF-101 (1 mg/kg) não interfere na coordenação motora avaliada no teste de Rota Rod.

Camundongos C57BL/6 receberam injeções (i.p) de Veículo (Veí) ou HUF-101 (1 mg/kg) dos dias 0 ao 6. O tratamento com PCX (8 mg/kg) ou Veículo foi realizado nos dias 0, 2, 4 e 6, sendo que nos dias em que o animal recebia também o HUF-101, este foi administrado 30 min antes do PCX (n=5/grupo). 24h após a última injeção, os animais foram colocados no teste de Rota Rod e o tempo de permanência no aparato foi avaliado. Outro grupo de animais foram tratados com o controle positivo Diazepam (Dzp; 10 mg/kg; i.p; n=5/grupo) e 30 minutos após também foram submetidos ao teste de Rota Rod. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí pelo teste de S-N-K.

4.22 Experimento 22: Efeito do HUF-101 e Morfina no modelo de preferência condicionada pelo lugar (PCL)

A Anova de uma via seguida de S-N-K demonstrou que apenas o tratamento com a morfina (20 mg/kg) foi capaz de induzir condicionamento pelo lugar ($F_{3,20} = 7,2$; $p < 0,05$), indicando que o HUF-101, nas doses de 3 e 30 mg/kg, não induz efeitos recompensadores.

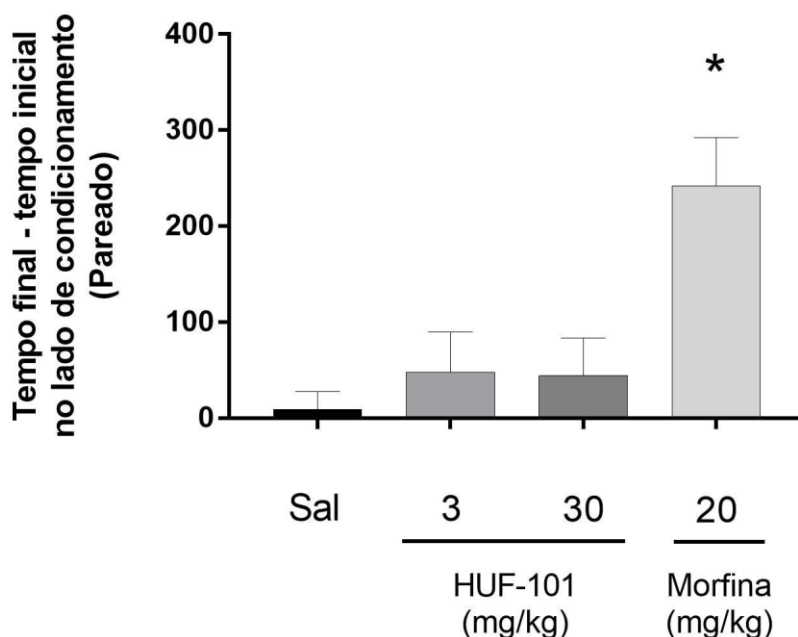


Figura 24: Tratamento com HUF-101 (3 e 30 mg/kg) não induz condicionamento por lugar diferentemente da Morfina (20 mg/kg). Camundongos C57BL/6J foram colocados no centro na caixa teste para condicionamento preferencial ao lugar e foram permitidos explorar todos os lados da caixa por 15 min. No dia seguinte, os animais receberam injeções (i.p) de Salina (Sal, $n=6$ /grupo), HUF-101 (3 e 30 mg/kg, $n=6$ /grupo) ou Morfina (20 mg/kg, $n=6$ /grupo) e foram confinados no lado de condicionamento (pareado) por 30 min. No dia seguinte todos os animais foram tratados com salina e confinados por 30 min no lado apostado (não pareado). Tal processo foi repetido 3 vezes para cada lado, como descrito no protocolo experimental na Figura 1. O teste foi realizado no dia 7 e o resultado expresso em tempo final menos tempo inicial no lado condicionado (pareado). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal pelo teste anova seguido de S-N-K.

5. DISCUSSÃO

Dados da Organização Mundial de Saúde demonstram que o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de óbitos em 2018. No mundo, cerca de 1 em cada 6 mortes é devido a esta patologia, tendo as principais causas os cânceres de pulmão, colorretal, estômago, fígado e mama (WHO, 2019). No Brasil, cerca de 220 mil pessoas morreram em 2017 devido a neoplasias, sendo o câncer de mama a principal causa da morte entre as mulheres e o câncer de traqueia, brônquios e pulmões entre os homens (INCA, 2019). Apesar da estatística acerca do câncer possuir números elevados, a taxa de sobrevivência a estas doenças vem aumentando, e isso se deve aos avanços no tratamento obtidos nas últimas décadas, como por exemplo a imunoterapia. No entanto, dentre os tratamentos mais comuns usados nas neoplasias como radioterapia, hormonioterapia e remoção cirúrgica, o tratamento com quimioterápicos permanece sendo o padrão ouro (BURNEY; AL-MOUNDHRI, 2008).

Dentre os quimioterápicos utilizados na clínica, o PCX é uma droga estabilizadora de microtúbulos e impede a multiplicação celular. No entanto, assim como outros quimioterápicos, os efeitos do PCX não atingem somente as células neoplásicas, mas destroem também as células saudáveis, visto que, ambas seguem as mesmas fases do ciclo celular normal. Dessa forma, apesar da quimioterapia ser um dos principais pilares para o tratamento sistêmico do câncer, estes compostos causam importantes alterações a nível molecular e celular, que estão associadas com diversos efeitos adversos como náusea e vômito, fadiga, alopecia, neurogenia, diarreia, constipação intestinal, alterações do sistema tegumentar e as neuropatias periféricas, decorrente da neurotoxicidade (COSTA et al., 2015).

A neurotoxicidade do sistema nervoso periférico ou neuropatia periférica induzida por PCX é o principal efeito adverso limitante para o uso desse composto, uma vez que muitas vezes é necessário a diminuição da dose administrada ou até mesmo a interrupção do tratamento, podendo resultar na progressão do câncer. Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na NPIQ, até o momento não existe terapia eficaz para a prevenção e/ou tratamento desse tipo de dor crônica, além do que, o uso destes compostos está frequentemente relacionado a um grande número de efeitos adversos (CHU et al., 2014; LYNCH et al., 2014; DONVITO et al., 2016; AHMAD et al., 2017).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do análogo fluorado do CBD, HUF-101, no modelo de NPIQ utilizando o PCX. Vários estudos pré-clínicos vêm utilizando o PCX e outros quimioterápicos para entendimento dos mecanismos pelos quais a neuropatia periférica ocorre, e desta forma, estudar possíveis novos alvos terapêuticos. Dentre estes trabalhos, diferentes protocolos são propostos, variando tanto na dose do quimioterápico a ser administrada, quanto a via de administração, bem como o número de dias em que eles são administrados (HAMITY et al., 2017; MIRANDA et al., 2018; INYANG et al., 2019; SIERRA et al., 2019; MANJAVACHI et al., 2019; ADAMEK; HELES; PALECEK, 2019). No estudo de Toma e colaboradores (2017), foi realizado uma análise de diferentes doses de PCX, 2, 4 e 8 mg/kg administradas (i.p) em quatro dias alternados. Foi observado que o tratamento com as doses de 2 e 4 mg/kg induziram alodinia mecânica até o 21^o dia e a alodinia térmica até o 15^o dia. Já a dose de 8 mg/kg produziu efeito sustendo na alodinia mecânica e térmica, avaliadas até o 28^o dia, além de induzir efeitos comportamentais afetivos, como por exemplo, efeitos tipo depressivo e ansioso (TOMA et al., 2017).

Dessa forma, utilizamos protocolo de administração (i.p) de PCX, na dose de 8 mg/kg, em quatro dias alternados para induzir a neuropatia periférica em camundongos. Em seguida, fomos avaliar se diferentes doses de HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg; i.p) seriam capazes de reverter o quadro de alodinia mecânica induzida por tal quimioterápico. Foi observado que o tratamento com HUF-101 não foi capaz de reverter a alodinia mecânica, em nenhuma das doses testadas. Outros trabalhos também demonstram que novos compostos propostos para tratar a NPIQ falharam em reverter a alodinia induzida por diferentes quimioterápicos. Por exemplo, o PBN (*Phenyl N-tert-butylnitron*), um sequestrador de radicais livres administrado em uma dose de 100 mg/kg por 3 dias, 2 vezes ao dia, reverteu a alodinia mecânica induzida por PCX (2 mg/kg) em ratos, mas tal efeito não foi sustentado após o fim do tratamento (KIM et al., 2010). Já no trabalho de Aoki e colaboradores (2014) foi utilizado uma única dose oxiplatina (6 mg/kg) como modelo de neuropatia em ratos e avaliado o efeito da pregabalina (30 mg/kg) oral, 2 dias após ao tratamento com o quimioterápico. Foi observado que tal composto foi efetivo em reverter a alodinia mecânica e térmica apenas nas 6 primeiras horas após a sua administração (AOKI et al., 2014). Em outro trabalho, foi investigado o efeito da administração oral de gabapentina (30 e 100 mg/kg) na inibição da alodinia mecânica produzida por uma única injeção de PCX (5 mg/kg), oxiplatina (3 mg/kg) e vincristina (0,1 mg/kg). Tal composto foi efetivo apenas durante 3 horas no modelo do PCX e 4 horas no modelo da oxiplatina, sendo que falhou no modelo da vincristina (GAUCHAN et al., 2009).

Além disso, vários estudos clínicos mostram que drogas como nortriptilina, amitriptilina, gabapentina e lamotrigina administradas por via oral, bem como uma associação tópica de ketamina e amitriptilina, falharam em tratar os sintomas causados pela neuropatia periférica induzida pelo tratamento com PCX, cisplatina, vincristina ou

oxiplastina (Para revisão, ver SISIGNANO et al., 2014). Apesar do efeito negativo do HUF-101, vale destacar que a dose de PCX cumulativa utilizada foi mais elevada que nos trabalhos citados acima. Sendo que uma possibilidade seria testar o efeito deste análogo do CBD em reverter a alodinia causada por outros quimioterápicos em diferentes protocolos de neuropatia periférica que utilizem doses cumulativas menores destes antineoplásicos.

Apesar de dados epidemiológicos sobre a incidência da NPIQ serem variáveis, tal patologia acomete cerca 80% dos pacientes que iniciam o tratamento quimioterápico. Assim, devido à alta incidência e por se tratar de um efeito adverso limitante ao tratamento oncológico, a prevenção de tal efeito seria a estratégia terapêutica ideal a ser utilizada (SISIGNANO et al., 2014; QUINTÃO et al., 2019). Dessa forma, fomos avaliar se o HUF-101 poderia prevenir a alodinia mecânica induzida por PCX. Primeiramente, utilizamos um protocolo em que os animais foram tratados durante 14 dias com o HUF-101 (3, 10 e 30 mg/kg). Encontramos que, as doses de 3 e 10 mg/kg foram capazes de bloquear os efeitos do PCX de maneira sustentada, mesmo após 7 dias do fim do tratamento com o HUF-101. Já a dose de 30 mg/kg foi capaz de atenuar esses efeitos. Tal esquema de tratamento foi baseado no estudo de Ward e colaboradores (2011) em que utilizou fêmeas tratadas com CBD diariamente (0 ao 14^o dia) nas doses de 5 e 10 mg/kg, no modelo de neuropatia periférica induzida por PCX 8 mg/kg (4 doses alternadas). Ambas as doses de CBD, assim como de HUF-101 foram efetivas em prevenir a alodinia mecânica induzida pelo PCX (WARD et al., 2011).

Diante do efeito crônico do HUF-101 por 14 dias consecutivos na prevenção da alodinia mecânica, fomos avaliar se o tratamento sub-crônico deste análogo do CBD, apenas nos dias em que os animais recebiam PCX, seria suficiente para prevenir os efeitos da neuropatia periférica. Para isso, tomamos como base o protocolo usado no

estudo de Ward e colaboradores (2014), no qual o CBD (2,5 ou 5 mg/kg) foi administrado 15 minutos antes das injeções de PCX (8mg/kg; 4 dias alternados) (WARD et al., 2014). Diferente do estudo utilizando o CBD, onde este canabinoide induziu um efeito sustentado em prevenir a alodinia mecânica em fêmeas, o HUF-101, produziu efeito apenas no 3º e 5º dia, ou seja, após as 3 primeiras injeções de PCX. No entanto, resultados contraditórios utilizando outros modelos de NPIQ são descritos para o tratamento sub-crônico utilizando CBD. Por exemplo, Harris e colaboradores (2016) observaram que o tratamento com 0,5, 1 e 2 mg/kg de CBD ou THC, injetados 30 min antes da cisplatina (1 ou 2.3 mg/kg; 6 dias alternados) não foi capaz de prevenir a alodinia mecânica induzida por este quimioterápico (HARRIS et al., 2016). Dessa forma, o resultado do tratamento sub-crônico com o HUF-101, em que tal composto perdeu o efeito após o fim das administrações, juntamente com o efeito antialodínico prolongado com o tratamento crônico por 14 dias, nos demonstrou que provavelmente tal composto estaria prevenindo algum mecanismo inicial do PCX, mas que seria necessário um período maior de administrações para o efeito prolongado do HUF-101.

Assim, optamos por avaliar se o efeito do HUF-101 por 8 dias consecutivos (0-7), intervalo em que englobaria os dias em que os animais receberiam o PCX (0, 2, 4, e 6), seria suficiente para prevenir a alodinia mecânica induzida por este quimioterápico. Também optamos em testar apenas a menor dose efetiva observada no tratamento por 14 dias (3 mg/kg) e uma dose menor (1 mg/kg). Os resultados obtidos mostraram que o HUF-101, nas doses de 1 e 3 mg/kg, bloqueou o efeito do PCX em induzir a alodinia mecânica. Desta forma, com o protocolo e a menor dose efetiva de HUF-101 definida (1 mg/kg; 0-7 dias), nós avaliamos a capacidade desse composto em prevenir a alodinia térmica. Foi demonstrado que o HUF-101 também foi capaz de prevenir a alodinia

térmica induzida pelo PCX nas duas doses testadas, sendo que ambos os efeitos foram sustentados mesmo após 14 dias do fim do tratamento.

O próximo passo foi avaliar qual seria o possível mecanismo de ação envolvendo o efeito antialodínico do HUF-101. Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que os efeitos antinociceptivos induzidos pelo tratamento agudo com HUF-101 no teste do Hot Plate e no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina foram mediados pela neurotransmissão envolvendo os receptores CB1 e CB2 (SILVA et al., 2017). Entretanto, antagonistas desses receptores não foram capazes de bloquear o efeito antinociceptivo do HUF-101 no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético (SILVA et al., 2017). Além disso, resultado recente do nosso grupo mostrou que o efeito do HUF-101 no Hot Plate também foi mediado pelos receptores PPAR γ (Anexo II). Dessa forma, inicialmente, avaliamos se os receptores CB1 e CB2 também estariam envolvidos no efeito antialodínico do HUF-101 no modelo de dor crônica induzida por PCX.

Diferentemente dos achados nos modelos de dor aguda, o pré-tratamento com os antagonistas dos receptores CB1 e CB2 (0,3 mg/kg ao dia; AM251 e AM630), não bloqueou os efeitos antialodínicos do HUF-101, sugerindo que os efeitos do HUF-101 foram independentes destes receptores. Vale ressaltar que a dose desses antagonistas foi baseada em um estudo do nosso grupo que mostrou que o efeito ansiolítico do CBD, administrado cronicamente no modelo de estresse crônico variado (CUS), foi bloqueado pelo AM251 e AM630 na mesma dose de 0,3 mg/kg (FOGAÇA et al., 2018). De forma similar aos nossos achados, Ward e colaboradores (2014) mostraram que o efeito do CBD em prevenir a alodinia mecânica induzida por PCX foi independente da ativação dos receptores CB1 e CB2 (WARD et al., 2014). No entanto, vários dados descritos na literatura mostram que drogas usadas na prevenção da neuropatia periférica induzida

por quimioterápicos tem seus efeitos mediados pelos receptores do sistema endocanabinoide. Por exemplo, o uso dos inibidores da MGL (JZL184 e MJN110), enzima que degrada o 2-AG, reverteram a alodinia mecânica induzida por PCX em camundongos, sendo que este efeito foi bloqueado pelos antagonistas CB1 e CB2 (Rimonabant e SR1445528) (CURRY et al., 2018). Já o uso do WIN 55,212-2 (agonista não seletivo CB1 e CB2), do ACEA (agonista CB1) e do JWH133 (agonista CB2) administrados sistemicamente, preveniram a alodinia mecânica induzida por cisplatina em ratos, sendo tal efeito bloqueado com o pré-tratamento com os antagonistas CB1 (AM251) e CB2 (SR144528) (VERA et al., 2013). Além disso, no estudo de Deng e colaboradores (2016), foi avaliado o efeito da desipramina, um antidepressivo tricíclico, em prevenir o efeito da alodinia mecânica e térmica induzida por PCX em ratos. Foi observado que tal composto mostrou efeito antialodínico sustentado, sendo estes efeitos bloqueados pelo antagonista dos receptores opioides, naloxona, e atenuados pelos antagonistas dos receptores CB1 (AM251) e CB2 (AM630) (DENG et al., 2016).

Após observar que os antagonista dos receptores CB1 e CB2 não foram capazes de bloquear os efeitos do HUF-101, avaliamos se tais propriedades antialodínicos poderiam ser mediados pelos receptores PPAR γ . Além dos dados dos nosso grupo mostrando que o efeito antinociceptivo do HUF-101 no Hot Plate foi dependente dos receptores PPAR γ , vários outros estudos mostram que diferentes efeitos dos canabinoides, incluindo efeitos antinociceptivo, em prevenir a discinesia tardia induzida por haloperidol, antitumoral, neuroprotetor, anti-inflamatório, cardiovascular e proteção contra déficits de memória, podem ser mediados por estes receptores (O'SULLIVAN et al., 2005; WALLACE et al., 2007; COSTA et al., 2008; FAKHFOURI et al., 2012; RAMER et al., 2013; O'SULLIVAN, 2016; DONVITO et al., 2016; SONEGO et al., 2018; SHARMA et al., 2017; BURGAZ, et al., 2019). Além disso, o estudo de Perez e colaboradores (2018) mostrou que o HUF-

101 apresentou propriedades neuroprotetoras em neurônios motores na medula espinal e em neurônios sensoriais dos GRDs, em um modelo de axotomia neonatal do nervo ciático em ratos. Tais efeitos foram relacionados a uma redução da expressão gênica de PPAR γ nos GRDs, mas não na medula espinal (PEREZ et al., 2018).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são membros da família de receptores nucleares que causam a ativação de vários genes, agindo como fator de transcrição ativado por ligante. Desempenham um papel importante em várias fisiopatologias, imunidade, inflamação, apoptose e diferenciação celular. Nos mamíferos, existem três isoformas diferentes de PPAR: alfa (α), beta/delta (β/δ) e gama (γ), que são expressos diferencialmente em vários tecidos (MAEDA; KISHIOKA, 2009). Na periferia, estudos mostram que PPAR α é expresso nos GRDs, sendo o padrão de distribuição destes receptores principalmente nas fibras aferentes primária A δ e C, o que explicaria os efeitos antinociceptivos locais e periféricos relatados por agonistas destes receptores em modelos animais de dor inflamatória e neuropática (LOVERME et al., 2005, 2006; (FUKUDA; LI; SEGAL, 2017). Ao contrário do PPAR α , não há evidências de estudos que demonstram a expressão de PPAR β ou PPAR γ nas fibras sensoriais periféricas (LOVERME et al., 2006).

Já o PPAR γ está presente nos vasos, neurônios, astrócitos, células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas e micróglia (YUAN; CHEN; LI, 2015). Nas células do sistema imune, esses receptores tem a função de aumentar a expressão gênica relacionada a fatores anti-inflamatórios (BROZEK et al., 2007) e diminuir a expressão de mediadores pró-inflamatórios como a ciclooxigenase-2 (COX-2), metaloproteinase-9 (MMP-9), a óxido nítrico sintase indusível (iNOS), bem como a produção de citocinas, quimiocinas e interleucinas pró-inflamatórias. Além disso, o PPAR γ tem a capacidade de

inibir fatores de transcrição, como o fator ativador de proteína-1, STAT-1 e fator nuclear- κ B (NF- κ B) (VILLAPOL, 2018).

Uma das principais estratégias para prevenir ou tratar a NPIQ é a neuroproteção. O grande desafio no desenvolvimento de drogas que possam ser neuroprotetoras é devido ao conhecimento limitado acerca dessa condição. Dentre as diversas propostas apresentadas como neuroprotetores estão os agonistas dos receptores PPARs. Dessa forma, uma vez que os PPARs são capazes de suprimir o estresse oxidativo e também o processo inflamatório (MORAES; PIQUERAS; BISHOP-BAILEY, 2006), é possível que a ativação destes no sistema nervoso periférico (SNP) possa prevenir e/ou tratar a NPIQ.

De fato, estudos mostram que diversos compostos com efeitos antialodínicos sobre a NPIQ, bem como em outros modelos de neuropatia periférica como lesão do nervo ciático, administração de anti-retroviral e no modelo usando o vírus da varicela zoster, podem exercer seus efeitos através dos receptores PPARs, principalmente pelos receptores PPAR α e PPAR γ . Nesse contexto, atualmente os agonistas dos receptores PPAR γ têm sido considerados potenciais medicamentos para tratar uma grande quantidade de condições neurológicas, como doenças neurodegenerativas, lesões traumáticas, doenças desmielinizantes e dor crônica (JIN et al., 2013; VALLÉE; LECARPENTIER, 2016; PATEL et al., 2017; VILLAPOL, 2018). Por exemplo, no modelo de neuropatia periférica induzida pela ciclofosfamida, o tratamento com uma fração de glicosídeo iridoides, da planta medicinal *Picrorhiza kurroa* reduziu significativamente a alodinia e a hiperalgesia térmica em camundongos *Swiss*. Estes efeitos foram bloqueados com o tratamento concomitante com um antagonista PPAR γ (SHARMA et al., 2017).

A pioglitazona e a rosiglitazona, agonistas PPAR γ , tem sido amplamente empregada em estudos pré-clínicos usando diferentes modelos de dor neuropática em roedores.

Tais compostos têm mostrado efeito antinociceptivo por diferentes mecanismos como redução do estresse oxidativo e a inflamação em estruturas como GRDs, medula espinal e no nervo ciático, dependendo do modelo de neuropatia periférica em que tais compostos foram empregados (PARK et al., 2007; MAEDA et al., 2008; ZANARDELLI et al., 2014; KHASABOVA et al., 2019). Dessa forma, em concordância com os dados da literatura, no presente trabalho observamos que o pré-tratamento com o antagonista PPAR γ , GW9664, bloqueou os efeitos do HUF-101 em prevenir a alodinia mecânica e térmica. Tal dose do antagonista foi baseada em estudos prévios do nosso grupo que mostrou que o pré-tratamento com GW9664, também na dose de 2 mg/kg bloqueou o efeito do tratamento crônico com CBD em prevenir a discinesia tardia induzida pelo tratamento repetido com o antipsicótico haloperidol (SONEGO et al., 2018).

A atividade desses receptores é determinada pela sua localização intracelular, onde a migração nuclear leva a efeitos genômicos, enquanto a ativação citosólica ou da membrana celular promove efeitos no DNA (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010; CANTINI et al., 2010). Alguns efeitos dos PPARs estão correlacionados com o mecanismo de trans-repressão, principalmente os efeitos anti-inflamatórios, culminando no bloqueio da atividade de fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1 e conseqüentemente diminuição de mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos e astrócitos, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, bem como moléculas de adesão (VCAM e ICAM) e enzimas como a óxido nítrico sintase e a COX (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997; DAYNES; JONES, 2002).

Sabe-se que o sistema nervoso periférico é vulnerável à ação tóxica de várias drogas, uma vez que é desprovido de BHE. Desta forma, a toxicidade induzida pelos quimioterápicos pode causar danos aos neurônios sensoriais periféricos, especialmente por afetarem seus corpos celulares localizados nos GRDs (JAGGI; SINGH, 2012). De

fato, estudos usando o PCX mostraram aumento da produção de citocinas por macrófagos nos GRDs de camundongos (LEDEBOER et al., 2007), além da infiltração dessas células nesse tecido, bem como nos nervos periféricos (ZHANG et al., 2016).

Em concordância com dados da literatura (MAKKER et al., 2017), o presente trabalho mostrou que o tratamento com PCX induziu um aumento da expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos GRDs 6 horas após a administração deste composto. Já o aumento da expressão de Iba-1, ocorreu 6 horas e 3 dias após a administração de PCX, mostrando um possível aumento do infiltrado de macrófagos nessa região. Também foi observado que o tratamento com este quimioterápico não interferiu na expressão gênica dos receptores PPAR γ . Esse resultado, porém, difere do observado no estudo em que o uso da cisplatina diminuiu os níveis de mRNA dos receptores PPAR γ que foram restaurados com a administração de agonistas desse receptor (KHASABOVA et al., 2019).

Em seguida, avaliamos se o tratamento com HUF-101 seria capaz de atenuar o aumento da expressão gênica das citocinas inflamatória e de Iba-1 induzidos pelo PCX. Nós observamos que o tratamento com HUF-101 (1 mg/kg; 0-7 dias) foi capaz de atenuar o aumento da expressão gênica do TNF- α , IL-6 e Iba-1, mas não foi observado efeito significativo na atenuação de IL-1 β . Tais resultados, corroboram a ideia de que o HUF-101 estaria evitando danos agudos causados pelo início do tratamento com PCX. De fato, estudos mostram resultados semelhantes usando agonistas dos receptores PPAR γ em outros modelos de dor neuropática. No estudo de Maeda e colaboradores (2008), a pioglitazona foi capaz de atenuar a alodinia mecânica e térmica, bem como os níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α nos GRDs e na medula espinal, no modelo de ligação parcial do nervo ciático, sendo tais efeitos dependentes da ativação dos receptores PPAR γ (MAEDA et al., 2008). Já Sharma e colaboradores (2017) mostraram que o efeito

antialodínico da fração de glicosídeo iridoídes da planta *Picrorhiza kurroa*, que atua como agonista PPAR γ , foi acompanhado da diminuição IL-1 β , TNF α , bem de NF-kB, no nervo ciático no modelo de neuropatia periférica induzido por ciclofosfamida (SHARMA et al., 2017). No entanto, vários estudos associam os efeitos dos agonistas PPAR γ no modelo de NPIQ ao mecanismo de diminuição do estresse oxidativo. Por exemplo, o tratamento com pioglitazona diminui os níveis de espécies reativas de oxigênio nos GRDs no modelo de neuropatia periférica induzida por cisplatina em camundongos (KHASABOVA et al., 2019). Já Zanardeli e colaboradores (2014) observaram que preveniu a diminuição dos níveis de catalase em cultura de GRDs tratada com oxiplatina, sendo este, um dos mecanismos propostos para o efeito antialodínico da rosiglitazona nesse estudo (ZANARDELLI et al., 2014).

Sabe-se que estresse oxidativo e alguns fatores inflamatórios são mecanismos que frequentemente são interligados e coexistem, sendo que o aumento de ambos está associado com a lesão neuronal periférica induzida por quimioterápicos (BOYETTE-DAVIS et al., 2011). Como discutido anteriormente, em resposta à injúria tóxica desencadeada pela quimioterapia antineoplásica, pode ocorrer a infiltração neural de monócitos/macrófagos com produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas e óxido nítrico (OZTÜRK et al., 2005). Além disso, as células de Schwann podem sofrer alteração fenotípica e também passarem a liberar citocinas e prostaglandinas, sendo que este desbalanço no sistema neuro-imune parece ser um dos mecanismos primários capaz de desencadear a lesão neural periférica observada nessa síndrome (ABRAHAM; MCMILLEN; BREWER, 2004; LEDEBOER et al., 2007).

Estes danos nos neurônios sensoriais periféricos ocorrem especialmente por afetarem seus corpos celulares localizados nos GRDs, resultando em uma perda de

fibras sensoriais, evidenciada por degeneração das terminações nervosas. Dessa forma, tal efeito é considerado um marcador padrão comum nas NPIQ (JAGGI; SINGH, 2012; KO et al., 2014; SINGHMAR et al., 2018; KYTE et al., 2018). Em relação aos taxanos, acredita-se que o efeito tóxico destes fármacos sobre os neurônios aferentes primários ocorra por atuarem sobre a dinâmica dos microtúbulos, o que impediria o funcionamento normal do citoesqueleto celular e, conseqüentemente, comprometeria o transporte axonal de proteínas, vesículas e organelas (CARLSON; OCEAN, 2011; JAGGI; SINGH, 2012). Na pele, as FNIDs são representadas principalmente pelas fibras sensoriais C e A δ , que possuem alguns marcadores que permitem identificá-las, sendo um deles o canal de cálcio do tipo Nav1.8 (BELKOUCH et al., 2014; KLEIN et al., 2017; GARRISON et al., 2014; KO et al., 2014). Desta maneira, cruzamos animais Nav1.8-cre com animais tdTomato, para que a expressão de tdTomato fosse direcionada apenas para as fibras que expressassem Nav1.8, como as FNIDs. Como resultado, observamos que o tratamento com PCX causou a diminuição das FNIDs.

Sabe-se que os receptores específicos para a dor estão localizados principalmente nas terminações dessas fibras nervosas C e A δ , que representam a maior parte dos nociceptores que são ativados por uma variedade de estímulos mecânicos, químicos e térmicos (MILLAN, 1999; STUCKY et al., 2001). Em condições normais, apenas essas fibras transmitem informações nociceptivas, sendo as fibras A β responsáveis pela estimulação mecânica inócua como o toque leve. Porém, tem sido demonstrada a participação das três categorias de fibras sensoriais C, A δ e A β nos processos de dor persistente (WOOLF; SALTER, 2000; COBOS et al., 2018). Além disso, a perda parcial dessas fibras nervosas pode ser responsável pela hiper-excitabilidade observada nas neuropatias periféricas, pois estudos demonstram que as fibras nervosas com axônios seccionados ou degenerados adquirem descarga espontânea, mecanossensibilidade,

além de diminuir seu limiar de ativação. Dessa forma, tais processos culminariam nos sintomas de hipersensibilidade que são descritos pelos pacientes e observados nos estudos pré-clínicos, principalmente a alodinia e hiperalgesia térmica e mecânica (MCCARTHY et al., 1995; POLOMANO et al., 2001; JAGGI; SINGH, 2012; KHASABOVA et al., 2019).

De fato, no estudo de Zhang e colaboradores (2016) foi observado que a inibição do infiltrado de macrófago nos GRDs, bem como nos níveis de citocinas, resultou em proteção da perda das FNIDs no modelo de neuropatia periférica induzida por PCX em ratos (ZHANG, 2016). Além disso, o tratamento de camundongos com minociclina atenuou a perda das FNIDs causada pelo tratamento com PCX, sendo que o mecanismo proposto para tal efeito da minociclina seria a inibição do NF- κ B e a subsequente liberação de citocinas que lesariam essas fibras (BOYETTE-DAVIS et al., 2011). Além disso, já foi demonstrado o efeito neuroprotetor do HUF-101 em neurônios motores da medula, bem como neurônios sensoriais dos GRDs (PEREZ et al., 2018). Nesse sentido, após observamos que o tratamento com HUF-101 possivelmente diminui o infiltrado de macrófagos nos GRDs, bem como os níveis da expressão gênica de citocinas, avaliamos se tal composto também preveniria os danos nas FNIDs induzidos pelo tratamento com PCX. Nós observamos que tratamento com HUF-101 (1mg/kg; 0-7 dias) foi capaz de atenuar a redução das FNIDs. Esses achados estão em concordância com aqueles observados por Khasabova e colaboradores (2019), que mostraram que o agonista PPAR γ pioglitazona foi capaz de aumentar o limiar elétrico de ativação das fibras A δ e C, após este ter sido diminuído pelo tratamento com cisplatinina (KHASABOVA et al., 2019).

Além dos efeitos em prevenir ou tratar os sintomas referentes a neuropatia periférica é importante que os novos compostos não apresentem efeitos adversos limitantes ao

seu uso, como por exemplo dependência física, efeitos adversos à retirada, desenvolvimento de tolerância e efeitos motores. No entanto, alguns estudos demonstram que parte desses compostos estão associados com tais situações. No trabalho de Sain e colaboradores (2009) foi observado que o efeito antinociceptivo do agonista canabinoide CP 55,940, no modelo de neuropatia periférica induzida por ligação do nervo ciático, foi acompanhado de déficits motores observados no teste do Rota Rod (SAIN et al., 2009). Este prejuízo motor também foi observado pelo uso da Gabapentina, um anticonvulsivante, no modelo de neuropatia periférica induzido pela cisplatina (AHMAD et al., 2017). Já Deng e colaboradores (2016) mostraram que o uso do antidepressivo tricíclico desipramina no modelo de neuropatia periférica induzida por PCX, também causou prejuízo no desempenho motor no teste de Rota Rod (DENG et al., 2016). Além disso, no cenário clínico, os opióides são frequentemente usados concomitantemente ou após a quimioterapia para tratar a dor relacionada ao câncer e a NPIQ. No entanto, exposições repetidas aos opióides também podem aumentar o risco de abuso, bem como induzir tolerância. Nesse sentido, Legakis e Negus (2018), mostraram que no modelo de neuropatia periférica induzida por PCX, a morfina administrada durante 6 dias em ratos, teve seu efeito antialodínico diminuído ao longo do tratamento, bem como induziu efeitos de recompensa nesses animais (LEGAKIS; NEGUS, 2018).

Nesse sentido, nosso trabalho mostrou que a administração crônica de HUF-101 nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg durante 14 dias ou de 1 mg/kg durante 7 dias não parece induzir tolerância. Além disso, mostramos que tal composto não causou prejuízo na coordenação motora dos animais avaliados pelo teste de Rota Rod. Por fim, ainda observamos que, diferente da morfina, o tratamento com HUF-101 não induziu efeitos

recompensadores positivos no teste de preferência condicionada por lugar, indicando que este composto apresenta um abaixo potencial de abuso.

Além dos efeitos adversos citados acima, é importante que os novos compostos também não prejudiquem o efeito antineoplásico dos quimioterápicos. Nesse sentido, testamos o efeito do PCX em diminuir a viabilidade celular de células neoplásicas de câncer de mama (MCF-7) e colon (HCT-116) humano, bem como de câncer de mama (4T1) murino. Nós observamos que o tratamento com PCX foi capaz de diminuir a viabilidade celular em todas as culturas de células testadas. Além disso, após associar tais concentrações efetivas do PCX com diferentes concentrações de HUF-101, observamos que o análogo do CBD não interferiu do efeito de diminuição da viabilidade celular do PCX. Interessantemente, ainda foi observado que nas células neoplásicas de mama e de cólon humano, o HUF-101 apresentou efeito per se em diminuir a viabilidade celular. Sendo que para as células HCT-116, ainda foi observado um efeito sinérgico do PCX e desse composto. Nós, posteriormente, avaliamos o efeito do PCX e HUF-101 em um modelo animal de câncer de mama induzido em fêmeas BALB/c. Foi observado que o PCX diminuiu o peso do tumor das fêmeas, sendo que tal efeito não sofreu interferência pelo o tratamento com HUF-101. Além disso, o HUF-101, per se, também foi capaz diminuir o tumor nas fêmeas. Esses achados estão de acordo com trabalhos da literatura como o de Zanardelli et al. (2014) em que foi mostrado que o agonista PPAR γ rosiglitazona não alterou o efeito da oxiplatina em diminuir a viabilidade celular em células de câncer de cólon humano (HT-29) (ZANARDELLI et al., 2014). Já Bocca et al. (2007) mostrou que o ácido linoleico conjugado apresentou efeito antiproliferativo em células de câncer de mama humano (MCF-7) dependente da ativação de receptores PPAR γ (BOCCA et al., 2007). Sobre o potencial efeito antitumoral do HUF-101, também foi observado o CBD mostrou efeito apoptótico *in vitro* em células A549 e H460, de

câncer de pulmão humano, além de diminuir o volume do mesmo tumor induzido em fêmeas. Ambos os efeitos foram bloqueados pelo antagonista dos receptores PPAR γ , GW9662 (RAMER et al., 2013). Já o RS5444, outro agonista PPAR γ inibiu o crescimento de células neoplásicas de carcinoma de tireoide (células ATC) *in vitro* e *in vivo*, sendo que em associação com o PCX foi observado um efeito antineoplásico sinérgico desses compostos (COPLAND et al., 2006).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o análogo fluorado do CBD, HUF-101, possui efeitos na prevenção da alodinia mecânica e térmica induzida pelo PCX, sendo tais efeitos dependentes da ativação de PPAR γ . Esses efeitos parecem envolver a prevenção de mecanismos inflamatórios, como o aumento de citocinas e infiltrado de macrófagos nos GRDs, induzidos pelo tratamento com o quimioterápico PCX. Além disso, sugere-se que o HUF-101, ao inibir esses eventos inflamatórios, previna a perda das FNIDs. Juntos, o efeito do HUF-101 em inibir mecanismos inflamatórios, bem como seus potenciais efeitos neuroprotetores, resulta em uma menor hiper-excitabilidade de nervos sensoriais periféricos e consequentemente prevenção da alodinia e hiperalgesia mecânica e térmica. Vale a pena ressaltar que o HUF-101 foi efetivo em uma dose baixa, e em um esquema de tratamento de apenas 8 dias, sendo tais efeitos sustentados mesmo após 2 semanas do fim do tratamento. Além disso, o HUF-101 não interferiu no efeito quimioterápico do PCX e nem apresentou efeitos adversos como tolerância, dependência e efeitos na coordenação motora. Sendo assim, tal composto poderia ser uma alternativa promissora para prevenir a alodinia mecânica e térmica de pacientes em tratamento quimioterápico, já que tal condição é o principal efeito adverso limitante ao uso dos quimioterápicos, prejudica a qualidade de vida dos pacientes, além de muitas vezes ser necessário a interrupção do tratamento antineoplásico, o que não garante a reversão da alodinia e ainda pode causar a progressão do câncer.

7. REFERÊNCIAS

ABBADIE, C. et al. Chemokines and pain mechanisms. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 125-34, 2009.

ABRAHAM, K. E.; MCMILLEN, D.; BREWER, K. L. The effects of endogenous interleukin-10 on gray matter damage and the development of pain behaviors following excitotoxic spinal cord injury in the mouse. **Neuroscience**, v. 124, n. 4, p. 945–952, 2004.

ADAMEK, P.; HELES, M.; PALECEK, J. Mechanical allodynia and enhanced responses to capsaicin are mediated by PI3K in a paclitaxel model of peripheral neuropathy. **Neuropharmacology**, v. 146, p. 163–174, 2019.

AGURELL, S. et al. Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabinol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinol and cannabidiol by mass fragmentography. **Experientia**, v. 37, p. 1090–1092, 1981.

AHMAD, N. et al. Gabapentin and its salicylaldehyde derivative alleviate allodynia and hypoalgesia in a cisplatin-induced neuropathic pain model. **European Journal of Pharmacology**, v. 814, p. 302–312, 2017.

AOKI, M. et al. Comparison of the Effects of Single Doses of Elcatonin and Pregabalin on Oxaliplatin-Induced Cold and Mechanical Allodynia in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 322–326, 2014.

ATAKAN, Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 2, n. 6, p. 241-254, 2012.

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

BELKOUCH, M. et al. Functional up-regulation of Na v 1 . 8 sodium channel in A β afferent fibers subjected to chronic peripheral inflammation. **JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION**, v. 11, n. 45, p. 1–17, 2014.

BESSION, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, 2017.

BOCCA, C. et al. Involvement of PPAR γ and E-cadherin/ β -catenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 2, p. 248–256, 2007.

BÖHM, H. J. et al. Fluorine in Medicinal Chemistry. **ChemBioChem**, v. 5, p. 637–643, 2004.

BOREA, P. A. et al. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1591-1625, 2018.

BOUHASSIRA, D. Neuropathic pain: Definition, Assessment and Epidemiology. **Revue Neurologique**, v. 175, n. 1, p. 16–25, 2018.

BOURQUIN, A. F. et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. **Pain**, v. 122, p. 1-14, 2006.

BOYETTE-DAVIS, J. et al. Intraepidermal nerve fiber loss corresponds to the development of Taxol-induced hyperalgesia and can be prevented by treatment with minocycline. **Pain**, v. 152, n. 2, p. 308–313, 2011.

BRIDGESTOCK, C. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 480–483, 2013.

BROZEK, J. et al. Short Article PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137–143, 2007.

BURGAZ, S. et al. Development of An Oral Treatment with the PPAR- γ -Acting Cannabinoid VCE-003.2 Against the Inflammation-Driven Neuronal Deterioration in Experimental Parkinson's Disease. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 1–13, 2019.

BURNEY, I. A.; AL-MOUNDHRI, M. S. Major advances in the treatment of cancer: What does a non-oncologist need to know? Sultan Qaboos University Medical Journal, v. 8, n. 2, p. 137–148, 2008.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1607, p. 3364–3378, 2012.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1517-21, 2009.

CANTA, A.; POZZI, E.; CAROZZI, V. Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). **Toxics**, v. 3, n. 2, p. 198–223, 2015.

CANTINI, G. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 9, p. 645–653, 2010.

CARLSON, K.; OCEAN, A. J. Peripheral neuropathy with microtubule-targeting agents: Occurrence and management approach. **Clinical Breast Cancer**, v. 11, n. 2, p. 73–81, 2011.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, v. 596, p. 90–10, 2015.

CASAROTTO, P. C. et al. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. **Behavioural Pharmacology**, v. 21, p. 353-358, 2010.

CASAROTTO, P. C.; GOMES, F.V.; GUIMARÃES, F. S. Cannabinoids and obsessive-compulsive disorder. In: FATTORE, L. **Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease**. London: Elsevier, 2015. Cap.15, p. 365-387.

CASPANI, O. et al. The Contribution of TRPM8 and TRPA1 Channels to Cold Allodynia and Neuropathic Pain. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. 1-10, 2009.

CHEN, G. et al. Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. **Neuron**, v. 100, n.6, p. 1292-1311, 2018.

CHU, S. H. et al. Current use of drugs affecting the central nervous system for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in cancer patients: a systematic review. **Supportive Care in Cancer**, v. 23, n. 2, p. 513–524, 2014.

COBOS, E. J. et al. Mechanistic Differences in Neuropathic Pain Modalities Revealed by Correlating Behavior with Global Expression Profiling. **Cell Reports**, v. 22, n. 5, p. 1301–1312, 2018.

COHEN, M.; QUINTNER, J.; RYSEWYK, S. VAN. Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. **Pain Reports**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2018.

COPLAND, J. A. et al. Novel high-affinity PPAR γ agonist alone and in combination with paclitaxel inhibits human anaplastic thyroid carcinoma tumor growth via p21WAF1/CIP1. **Oncogene**, v. 25, n. 16, p. 2304–2317, 2006.

COSTA, B. et al. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB 1, TRPV1 and PPAR γ receptors and neurotrophic factors. **Pain**, v. 139, n. 3, p. 541–550, 2008.

COSTA, B. et al. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, p. 247-50, 2004.

COSTA, T. C. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: An integrative review of the literature. **Journal of School of Nursing - University of São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 335–345, 2015.

CURRY, Z. A. et al. Monoacylglycerol lipase inhibitors reverse paclitaxel-induced nociceptive behavior and proinflammatory markers in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 366, n. 1, p. 169–183, 2018.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8-16, 2008.

DAVIS, K. D. et al. Brain imaging tests for chronic pain: medical, legal and ethical issues and recommendations. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 10, p. 624–638, 2017.

DAYNES, R. A.; JONES, D. C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 748–759, 2002

DE NOVELLIS, V. et al. Effects of intra-ventrolateral periaqueductal grey palmitoylethanolamide on thermoceptive threshold and rostral ventromedial medulla cell activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 676, n. 1-3, p. 41-50, 2012.

DEMBO, T. et al. Primary Afferent-Derived BDNF Contributes Minimally to the Processing of Pain and Itch. **Eneuro**, v. 5, n. 6, p. 1-14, 2018.

DENG, L. et al. Chronic cannabinoid CB2 activation reverses paclitaxel neuropathy without tolerance or CB1-dependent withdrawal. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 5, p. 475–487, 2015.

DENG, L. et al. Prophylactic treatment with the tricyclic antidepressant desipramine prevents development of paclitaxel-induced neuropathic pain through activation of endogenous analgesic systems. **Pharmacological Research**, v. 114, p. 75–89, 2016.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 284, p. 1–17, 2017.

DI CESARE MANNELLI, L. et al. Palmitoylethanolamide Is a Disease-Modifying Agent in Peripheral Neuropathy: Pain Relief and Neuroprotection Share a PPAR-Alpha-Mediated Mechanism. **Mediators Inflammation**, p. 1–12, 2013.

DICKIE, A. C. et al. Morphological and functional properties distinguish the substance P and gastrin-releasing peptide subsets of excitatory interneuron in the spinal cord dorsal horn. **Pain**, v. 160, n. 2, p. 442-462, 2019.

DONVITO, G. et al. Palmitoylethanolamide Reverses Paclitaxel-Induced Allodynia in Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, p. 310–318, 2016.

DUGGETT, N. A. et al. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. **Neuroscience**, v. 333, p. 13–26, 2016.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Evaluation of anxiolytic and antidepressant-like activity of aqueous leaf extract of *Nymphaea Lotus* linn. In mice. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 2, p. 613–626, 2018

FAKHFOURI, G. et al. WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR- γ pathway. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 653–666, 2012.

FOGAÇA, M. V. et al. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 22–33, 2018.

FUKUDA, Y.; LI, Y.; SEGAL, R. A. A mechanistic understanding of axon degeneration in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 1–12, 2017.

GARRISON, S. R. et al. A gain-of-function voltage-gated sodium channel 1.8 mutation drives intense hyperexcitability of A- and C-fiber neurons. **Pain**, v. 155, n. 5, p. 896–905, 2014.

GAUCHAN, P. et al. Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: Different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage -

dependent calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 4, p. 732–734, 2009.

GORNSTEIN E.; SCHWARZ, T.L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 175-183, 2014.

GUINDON, J. et al. Alterations in endocannabinoid tone following chemotherapy- induced peripheral neuropathy: Effects of endocannabinoid deactivation inhibitors targeting fatty-acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase in comparison to reference analgesics following. **Pharmacological Research**, v. 67, n. 1, p. 94-109, 2013.

GUTIERREZ-MECINAS, M. et al. Expression of Calretinin Among Different Neurochemical Classes of Interneuron in the Superficial Dorsal Horn of the Mouse Spinal Cord. **Neuroscience**, v. 1, n. 398, p. 171-181, 2019.

HAMITY, M. V. et al. Nicotinamide riboside, a form of vitamin B3 and NAD + precursor, relieves the nociceptive and aversive dimensions of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in female rats. **Pain**, v. 158, n. 5, p. 962–972, 2017.

HARRIS, H. M. et al. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. **Planta Medica**, v. 82, n. 13, p. 1169–1172, 2016.

HUANG, Y. et al. Endogenous TRPA 1 and TRPV 1 activity potentiates glutamatergic input to spinal lamina I neurons in inflammatory pain. **Journal of Neurochemistry**, v. 149, n. 3, p. 381-398, 2019.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 138–152, 2018.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estatísticas de câncer. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>.

INYANG, K. E. et al. Alleviation of paclitaxel-induced mechanical hypersensitivity and hyperalgesic priming with AMPK activators in male and female mice. **Neurobiology of Pain**, v. 6, p. 1–9, 2019.

JAGGI, A. S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**, v. 291, p. 1–9, 2012.

JIN, J. et al. Neuroprotective effects of PPAR- γ agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, n.3, p. 410-419, 2013.

KANDEL, E. et al. **Princípios de Neurociências**. 5. ed. Artmed, 2014.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194-204, 2010.

KHASABOVA, I. A. et al. Cannabinoid Type-1 Receptor Reduces Pain and Neurotoxicity Produced by Chemotherapy. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 20, p. 7091–7101, 2012.

KHASABOVA, I. A. et al. JZL184 is anti-hyperalgesic in a murine model of cisplatin-induced peripheral neuropathy. **Pharmacological Research**, v. 90, p. 67–75, 2014.

KHASABOVA, I. A. et al. Pioglitazone, a PPAR γ agonist, reduces cisplatin-evoked neuropathic pain by protecting against oxidative stress. **Pain**, v. 160, p. 688–701, 2019.

KIM, H. K. et al. Phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy-induced neuropathic pain in rats. **Anesthesiology**, v. 112, n. 2, p. 432–439, 2010.

KINSEY, S. G. et al. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 244–51, 2011.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2008.

KLEIN, A. H. et al. Sodium channel Nav1.8 underlies TTX-resistant axonal action potential conduction in somatosensory C-fibers of distal cutaneous nerves. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 20, p. 5204–5214, 2017.

KO, M. H. et al. Peptidergic intraepidermal nerve fibers in the skin contribute to the neuropathic pain in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Neuropeptides**, v. 48, n. 3, p. 109–117, 2014.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.

KYTE, S. L. et al. Nicotine prevents and reverses paclitaxel-induced mechanical allodynia in a mouse model of CIPN. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 364, n. 1, p. 110–119, 2018.

LAPOINTE, N. E. et al. Effects of eribulin, vincristine, paclitaxel and ixabepilone on fast axonal transport and kinesin-1 driven microtubule gliding: Implications for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **NeuroToxicology**, v. 37, 2013.

LEDEBOER, A. et al. Intrathecal Interleukin-10 Gene Therapy Attenuates Paclitaxel-Induced Mechanical Allodynia and Proinflammatory Cytokine Expression in Dorsal Root Ganglia in Rats. **Brain Behavior and Immunity**, v. 21, n. 5, p. 686–698, 2007.

LEGAKIS, L. P.; NEGUS, S. S. Repeated morphine produces sensitization to reward and tolerance to antiallodynia in male and female rats with chemotherapy-induced neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 365, n. 1, p. 9–19, 2018.

LI, A. L. et al. Cannabinoid CB2 Agonist AM1710 Differentially Suppresses Distinct Pathological Pain States and Attenuates Morphine Tolerance and Withdrawal. **Molecular Pharmacology**, v. 95, n. 2, p. 155–168, 2019.

LI, Z. et al. Targeting human Mas-related G protein-coupled receptor X1 to inhibit persistent pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 10, p. 1996–2005, 2017.

LOVERME, J. et al. The search for the palmitoylethanolamide receptor. **Life Sciences**, v. 77, p. 1685–1698, 2005.

LOVERME, J. et al. Rapid Broad-Spectrum Analgesia through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α . **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 319, n. 3, p. 1051–1061, 2006.

LUCONI, M.; CANTINI, G.; SERIO, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): Is the genomic activity the only answer?, **Steroids**, v. 75, p. 585–594, 2010.

LYNCH, M. E.; CESAR-RITTENBERG, P.; HOHMANN, A. G. A double-blind, placebo-controlled, crossover pilot trial with extension using an oral mucosal cannabinoid extract for treatment of chemotherapy-induced neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 47, n. 1, p. 166–173, 2014.

MAEDA, T. et al. Pioglitazone attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia in mice subjected to peripheral nerve injury. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, n. 3, p. 341–347, 2008.

MAEDA, T.; KISHIOKA, S. Ppar and pain. **International Review of Neurobiology**, v. 85, n. 09, p. 165–177, 2009.

FUKUDMAGRO, D. A. C. et al. An interleukin-33/ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 7, p. 601–606, 2013.

MAKKER, P. G. S. et al. Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–24, 2017.

MANJAVACHI, M. N. et al. Spinal blockage of CXCL1 and its receptor CXCR2 inhibits paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. **Neuropharmacology**, v. 151, p. 136–143, 2019.

MASOCHA, W. Targeting the Endocannabinoid System for Prevention or Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. **Pain Research and Management**, p. 1–9, 2018.

MCCARTHY, B. G. et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: Evaluation by skin biopsy. **Neurology**, v. 45, n. 10, p. 1848–1855, 1995.

MECHOULAM, R. et al. Cannabidiol – Recent Advances. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 1678-1692, 2007.

MECHOULAM, R. Marijuana chemistry. **Science**, v. 168, p.1159-66, 1970.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MIN, M. Y. et al. Physiological and morphological properties of, and effect of substance P on, neurons in the A7 catecholamine cell group in rats. **Neuroscience**, v. 153, n. 4, p. 1020-33, 2008.

MIRANDA, H. F. et al. Antinociception induced by rosuvastatin in murine neuropathic pain. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 503–508, 2018.

MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 110, n. 3, p. 371-85, 2006.

NEELAKANTAN, H. et al. Effects of paclitaxel on mechanical sensitivity and morphine reward in male and female C57Bl6 mice. **Experimental and Clinical Psychopharmacol**, v. 24, n. 6, p. 485–495, 2016.

NISHIDA, M. et al. TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets. **Innovative Medicine: Basic Research and Development**. Tokyo: Springer; 2015.

NUGRAHA, B. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: functioning properties of chronic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 88–94, 2019.

O'NEILL, L. A. J.; KALTSCHMIDT, C. NF- κ B: A crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 252–258, 1997.

O'SULLIVAN, S. E. et al. Novel time-dependent vascular actions of Δ 9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 3, p. 824–831, 2005.

O'SULLIVAN, S. E. An update on PPAR activation by cannabinoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 12, p. 1899–1910, 2016.

ORR, P. M.; SHANK, B. C; BLACK, A. C. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. **Critical Care Nursing Clinics of NA**, v. 29, n. 4, p. 407–418, 2017.

OZTÜRK, G. et al. Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. **Cytokine**, v. 29, n. 1, p. 31–41, 2005.

PARK, B. K.; KITTERINGHAM, N. R.; O'NEILL, P. M. Metabolism of F Luorine - Containing Drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 443-470, 2001.

PARK, H. J. Chemotherapy induced peripheral neuropathic pain. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 67, n. 1, p. 4-7, 2014.

PARK, S. W. et al. Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 3, p. 1002–1012, 2007.

PASCUAL, D. et al. A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. **Pain**, v. 118, p. 23–34, 2005.

PATEL, S. P. et al. Pioglitazone Treatment Following Spinal Cord Injury Maintains Acute Mitochondrial Integrity and Increases Chronic Tissue Sparing and Functional Recovery. **Experimental Neurology**, v. 293, p. 74–82, 2017.

PAZOS, M. R. et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic new born pigs: role of 5HT (1A) and CB2 receptors. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 282-91, 2013.

PEREZ, M. et al. Neuronal preservation and reactive gliosis attenuation following neonatal sciatic nerve axotomy by a fluorinated cannabidiol derivative.

Neuropharmacology, v. 140, p. 201–208, 2018.

PETERS, C. M. et al. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. **Experimental Neurology**, v. 203, n.1, p. 42-54, 2007.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873–884, 2003.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: **Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. OTERO, P. E. São Paulo:Interbook, p. 30-74, 2005.

POLOMANO, R. C. et al. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. **Pain**, v. 94, n. 3, p. 293–304, 2001.

PRIESTLEY, T. Voltage-Gated Sodium Channels and Pain. **Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders**, v. 3, n. 6, p. 441–456, 2017.

QUINTÃO, N. L. M. et al. Pharmacological Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: PPAR γ Agonists as a Promising Tool. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 1–17, 2019.

RAHN, E. J. et al. Selective Activation of Cannabinoid CB2 Receptors Suppresses Neuropathic Nociception Induced by Treatment with the Chemotherapeutic Agent Paclitaxel in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 2, p. 584–591, 2009.

RAMER, R. et al. COX-2 and PPAR- γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 1, p. 69–82, 2013.

RU-RONG JI, ZHEN-ZHONG XU, Y.-J. G. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 533–548, 2014.

SAIN, N. M. H. et al. Antinociceptive effects of the non-selective cannabinoid receptor agonist CP 55,940 are absent in CB1 $^{-/-}$ and not CB2 $^{-/-}$ mice in models of acute and persistent pain. **Neuropharmacology**, v. 57, p. 235-41, 2009.

SASSO, O. et al. Implication of allopregnanolone in the antinociceptive effect of N-palmitoylethanolamide in acute or persistent pain. **Pain**, v. 153, n. 1, p. 33–41, 2012.

SCHAIBLE, H. Peripheral and Central Mechanisms of Pain Generation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 177, p. 3–28, 2006.

SHARMA, S. et al. Iridoid glycoside fraction from *Picrorhiza kurroa* attenuates cyclophosphamide-induced renal toxicity and peripheral neuropathy via PPAR- γ

mediated inhibition of inflammation and apoptosis. **Phytomedicine**, v. 36, p. 108–117, 2017.

SIAU, C.; XIAO, W.; BENNETT, G. J. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: Loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. **Experimental Neurology**, v. 201, n.1, p. 507-514, 2006.

SIERRA, S. et al. Targeting Cannabinoid 1 and Delta Opioid Receptor Heteromers Alleviates Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. **ACS Pharmacology & Translational Science**, v. 2, n. 4, p. 219–229, 2019.

SILVA, N. R. et al. Antinociceptive effects of HUF-101, a fluorinated cannabidiol derivative. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 79, p. 369–377, 2017.

SINGHMAR, P. et al. An orally active Epac inhibitor reverses mechanical allodynia and loss of intraepidermal nerve fibers in a mouse model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Pain**, p. 1-37, 2018.

SISIGNANO, M. et al. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 12, p. 694–707, 2014.

SLIVICKIA, R. A. et al. Brain permeant and impermeant inhibitors of fatty-acid amide hydrolase suppress the development and maintenance of paclitaxel-induced neuropathic pain without producing tolerance or physical dependence in vivo and synergize with paclitaxel to reduce tumor. **Pharmacological Research**, v. 142, p. 267–282, 2019.

SONEGO, A. B. et al. Cannabidiol prevents haloperidol-induced vacuos chewing movements and inflammatory changes in mice via PPAR γ receptors. **Brain Behavior and Immunity**, v. 74, p. 241-251, 2018.

SOUSA-VALENTE, J.; BRAIN, S. D. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 3, p. 229–236, 2018.

SOUZA, J. B. DE et al. Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. **Pain Research and Management**, p. 1–9, 2017.

STAROBOVA, H., VETTER, I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 10, n. 174, p. 1–21, 2017.

STUCKY, C. L. et al. Mechanisms of pain. **PNAS**, v. 98, n. 21, p. 121–145, 2001.

TIWARI, V. et al. Mas-related G protein-coupled receptors offer potential new targets for pain therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Advance in Experimental Medicine Biology., v. 904, p. 87-103, 2016.

TOMA, W. Effects of paclitaxel on the development of neuropathy and affective behaviors in the mouse. **Neuropharmacology**., v. 117, p. 305–315, 2017.

TORRANCE, N. et al. The Epidemiology of Chronic Pain of Predominantly Neuropathic Origin. Results from a General Population Survey. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 4, p. 281–289, 2006.

TREEDE, R. et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 156, n. 6, p. 1003–1007, 2015.

TREEDE, R.-D. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. **Pain Reports**, v. 3, n. 2, p. 3–5, 2018.

VALLÉE, A.; LECARPENTIER, Y. Alzheimer disease: Crosstalk between the canonical Wnt/beta-catenin pathway and PPARs alpha and gamma. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 1–12, 2016.

VERA, G. et al. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 105, p. 205–212, 2013.

VILLAPOL, S. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma on brain and peripheral inflammation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 121–132, 2018.

WALL; MELZACK'S. **Textbook of Pain**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

WALLACE, V. C. J. et al. The effect of the palmitoylethanolamide analogue, palmitoylallylamide (L-29) on pain behaviour in rodent models of neuropathy. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 1117–1128, 2007.

WANDERLEY, C. W. et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. **Cancer Research**, v. 78, n. 20, p. 5891–5901, 2018.

WANG, S. et al. Xiaopi formula inhibits breast cancer stem cells via suppressing tumor-associated macrophages/C-X-C motif chemokine ligand 1 pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1–15, 2019.

WARD, S. J. et al. Cannabidiol inhibits neuropathic pain through 5-HT1A receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 3, p. 636–645, 2014.

WARD, S. J. et al. Cannabidiol Prevents the Development of Cold and Mechanical Allodynia in Paclitaxel-Treated Female C57Bl6 Mice. **Anesthesia & Analgesia**, v. 113, n. 4, p. 947–950, 2011.

WILLIAMS, A. C. D. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 1, p. 2420–2423, 2016.

WOESSNER, J. Overview of Pain: Classification and Concepts. **Pain Management**, p. 35–47, 2018.

WOOD, J. N. et al. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. **Journal of Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 55-71, 2004.

WOOLF, C. J., SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765–1769, 2000.

World Health Organization (WHO). Cancer. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Modulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ) by Conjugated Fatty Acid in Obesity and Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 7, 2015.

ZANARDELLI, M. et al. Oxaliplatin neurotoxicity involves peroxisome alterations. PPAR γ agonism as preventive pharmacological approach. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

ZHANG, H. et al. Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy induced peripheral neuropathy. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 7, p. 775–786, 2016.

Anexo I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Envolvimento dos sistemas endocanabinóide e neuroimune no comportamento tipo-depressivo induzido por dor neuropática em camundongos: possíveis efeitos do CBD e HUUF-101*", registrado com o número **100/2016**, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 27 de junho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 384 camundongos C57Bl/6 machos pesando 25g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/06/2016 a 28/02/2020.

We certify that the Protocol n° 100/2016, entitled "*Role of the endocannabinoid and neuroimmune systems on the depressive-like behavior induced by neuropathic pain in mice: possible effects of CBD and HUUF-101*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 06/27/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 384 male C57Bl/6 mice weighing 25g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 02/28/2020.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2016



Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
(16)3315-3301

Anexo II

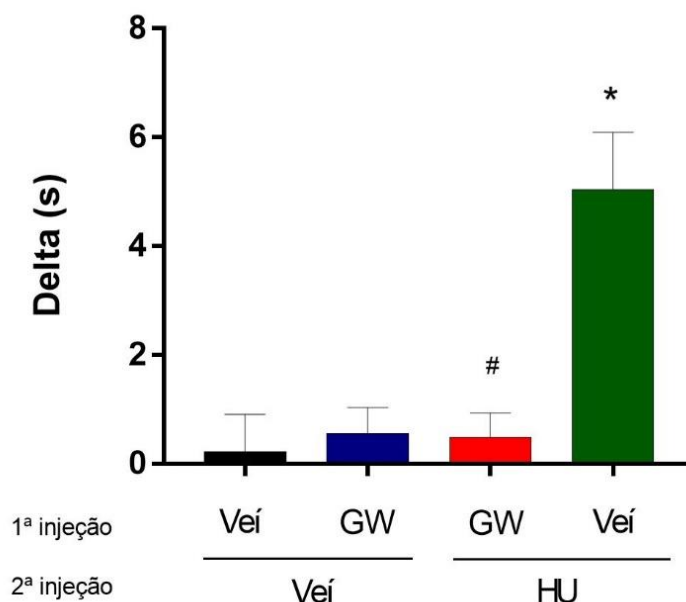


Figura 25: GW9662 (2 mg/kg) bloqueia efeito antinociceptivo do HUF-101 (30 mg/kg) no Hot Plate.

Inicialmente, camundongos Swiss foram colocados em uma placa quente a 56°C e a latência para que os animais lambessem as patas, “sapateassem” ou pulassem foi medida (valor basal). Após a medida basal, os animais receberam uma primeira injeção (i.p) de GW9662 (2mg/kg, n=6/grupo) ou Veículo (Veí, n=6/grupo), e 30 min depois receberam uma segunda injeção de HUF-101 (30 mg/kg, n=6/grupo) ou Veículo (Veí, n=6/grupo). Após 30 min da segunda injeção os animais foram novamente colocados na placa quente e a latência para lambr, sapatear ou pular novamente registrada. Os resultados foram expressos em delta do tempo (em segundos) que foi calculado pela subtração do valor em após o tratamento pelo valor da basal. O tempo máximo de permanência sobre a placa quente em cada medida foi de 30s para evitar danos teciduais. A anova de duas vias seguida de S-N-K, mostrou que houve efeito da primeira injeção ($F_{1,20} = 8,89$; $p < 0,05$), da segunda injeção ($F_{1,20} = 11,13$; $p < 0,05$) e interação entre os fatores primeira e segunda injeção ($F_{1,20} = 11,99$; $p < 0,05$). Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+Veí e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí+HU (KINSEY et al., 2011; SILVA et al., 2017).