

NATÁLIA GABRIELE HÖSCH

**Avaliação da participação da via de sinalização Wnt  
no efeito analgésico da crotalina *in vivo* e *in vitro***

**Versão Original**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dr(a). Yara Cury

São Paulo  
2022

## RESUMO

HÖSCH, N. G. **Avaliação da participação da via de sinalização Wnt no efeito analgésico da crotalfina *in vivo* e *in vitro***. 2022. 108 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

As proteínas Wnt constituem uma família de moléculas sinalizadoras que regulam diversos processos celulares. Dentre esses processos, estão a proliferação, diferenciação e migração celular, que ocorrem durante o desenvolvimento do sistema nervoso. As proteínas Wnt se ligam a receptores Frizzled e a correceptores, os quais ativam duas vias de sinalização intracelular – a via canônica/dependente de  $\beta$ -catenina ou a via não-canônica/independente da  $\beta$ -catenina. Estudos recentes apontam correlação entre a ativação aberrante das vias de sinalização Wnt, como a via Wnt/ $\beta$ -catenina e a via atípica Wnt/Ryk, com a instalação e persistência da dor neuropática (DN). Esses dados apontam para a possibilidade do uso de compostos que interfiram com a sinalização Wnt, como agentes terapêuticos para a DN. A crotalfina (CRO) é um peptídeo de 14 aminoácidos, inicialmente isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, que possui efeito antinociceptivo de longa duração, mediado pela ativação de receptores canabinóides CB<sub>2</sub>, com subsequente liberação de dinorfina A e ativação de receptores  $\kappa$ -opioides. A interação entre os sistemas canabinóide e opióide pode acarretar diminuição na secreção das proteínas Wnt, contudo, os efeitos destes sistemas sobre estas proteínas não estão totalmente caracterizados. No presente estudo, foi investigado se a CRO é capaz de interferir com a ativação das vias Wnt/ $\beta$ -catenina e Wnt/Ryk durante a DN, assim como os mecanismos envolvidos nessa ação. Para indução da DN, foi utilizado o modelo de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. No 14º dia pós-CCI, os animais foram tratados com a CRO. Amostras de DRG e medula espinhal foram utilizadas para a análise da expressão de proteínas relacionadas às vias de sinalização Wnt, por meio da técnica de Western Blot. Para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na ação da CRO, foram utilizados antagonistas ou agonistas de receptores canabinóides e opióides. Os resultados mostraram que a CCI aumenta a expressão das proteínas relacionadas à

sinalização Wnt, no DRG e na medula espinhal dos ratos. A CRO (50 µg/kg, p.o.) reverteu o aumento nos níveis das proteínas Wnt-3a e Wnt-5b, no DRG e medula espinhal. Ainda, o tratamento com a CRO inibiu as vias de sinalização Wnt/β-catenina e Wnt/Ryk. Foi observada, ainda, redução, pela CRO, na ativação do receptor NR2B e dos sinais dependentes de cálcio CaMKII, ERK 1/2, PKCγ e CREB, os quais estão relacionados com a ativação do receptor Ryk. O antagonista de receptores opioides, Naloxona, não interferiu com o efeito da CRO sobre as vias de sinalização Wnt. Entretanto, o tratamento prévio com o antagonista AM630, inibiu a ação da CRO sobre essas proteínas, mostrando que a ativação dos receptores CB<sub>2</sub> medeia o efeito deste peptídeo sobre a sinalização atípica Wnt/Ryk. Esses resultados sugerem que a CRO é capaz de modular as vias de sinalização Wnt durante a DN e que esse efeito é mediado, pelo menos em parte, pela ativação dos receptores canabinóides CB<sub>2</sub>.

**Palavras – chave:** Sinalização Wnt. Dor neuropática. Crotalina. Receptores Canabinóides. Analgesia.

## ABSTRACT

HÖSCH, N. G. **Evaluation of Wnt signaling components in the analgesic effect induced by crotalphine *in vivo* and *in vitro*.** 2022. 108 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

Wnt proteins are a family of signaling molecules that regulate several cellular processes such as proliferation, differentiation, and migration during the development of the nervous system. Wnt ligands bind to frizzled receptors and coreceptors to activate intracellular cascades – the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and noncanonical  $\beta$ -catenin-independent pathways. Recent reports demonstrate that aberrant activation of Wnt signaling pathways, such as the Wnt/ $\beta$ -catenin and the atypical Wnt/Ryk signaling pathways, in the spinal cord (SC), plays a critical role for the development and maintenance of neuropathic pain (NP). Thus, targeting these Wnt signaling pathways may be an effective approach for the treatment of NP after peripheral nerve injury. Crotalphine (CRO) is a structural analogue to a peptide that was first identified in *Crotalus durissus terrificus* snake venom, which induces antinociceptive effect by the activation of CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors, release of dynorphin A and subsequent activation of  $\kappa$ -opioid receptors. Evidence shows a crosstalk between activation of cannabinoid and opioid system and the release of Wnt proteins; however, the actions of these systems on Wnt proteins are unclear. In the present work, we investigated whether CRO could modulate the Wnt/ $\beta$ -catenin and the atypical Wnt/Ryk receptor signaling pathways during NP, and the mechanisms by which this peptide interferes with these signaling pathways. For this purpose, a rat model of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve was used to induce NP. On the 14<sup>th</sup> day after CCI, CRO (50  $\mu$ g/kg) was administered by oral route. To evaluate the main mechanism by which CRO modulates Wnt signaling pathways during NP, naloxone (a non-specific opioid receptor antagonist) or AM630 (an antagonist of CB<sub>2</sub> receptors) was administered before CRO treatment. Samples of ipsilateral lumbar dorsal root ganglia (DRG) and SC were used for the determination of proteins related to the Wnt signaling pathways by Western blot analysis. The results showed that CRO significantly attenuated the



increased levels of both Wnt-3a and Wnt-5b in DRG and SC, when compared to CCI animals. In addition, CRO treatment downregulated the levels of proteins related to the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and to the atypical Wnt/Ryk pathway in the SC, when compared to CCI rats. Activation of NR2B receptors and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signals CaMKII, ERK, PKC $\gamma$  and CREB, which are modulated via the Ryk receptor, was also inhibited by CRO in the SC. Systemic administration of naloxone did not interfere with CRO-induced downregulation of proteins related to these Wnt signaling pathways. However, the pretreatment with AM630 abolished CRO-induced downregulation of the atypical Wnt/Ryk pathway, suggesting that activation of CB<sub>2</sub> receptors is essential for CRO actions in the Wnt/Ryk signaling pathway. Taken together, our results demonstrate that CRO can modulate Wnt signaling pathways during neuropathic pain, and that this effect is mediated, at least in part, by CB<sub>2</sub> receptor activation.

**Keywords:** Wnt Signaling. Neuropathic Pain. Crotalpine. Cannabinoid Receptors. Analgesia.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PROTEÍNAS WNT

A família das proteínas sinalizadoras Wnt (do inglês, wingless-related integration site) participa de múltiplos eventos ao longo do desenvolvimento embrionário e, nos tecidos adultos, possui papel importante na manutenção da homeostasia. Os sinais produzidos por estas proteínas são considerados pleiotrópicos, já que acarretam diversos efeitos, entre eles, estimulação mitogênica e diferenciação celular (LOGAN; NUSSE, 2004).

No genoma da maioria dos mamíferos, incluindo no genoma humano, há a presença de 19 genes Wnt. São descritas 12 subfamílias Wnt. A conservação da via de sinalização Wnt ao longo da evolução, enfatiza o papel crucial das proteínas Wnt na formação de organismos do reino animal (KUSSEROW et al., 2005).

As proteínas Wnt possuem tamanho aproximado de 40 kDa e, em sua composição, existe um domínio conservado rico em cisteínas (TANAKA; KITAGAWA; KADOWAKI, 2002). A primeira proteína Wnt ativa a ser purificada, foi a Wnt-3a, a qual revelou que as proteínas Wnt sofrem modificações lipídicas ((WILLERT et al., 2003). A natureza insolúvel destas proteínas provém da palmitoilação que ocorre por meio da adição de palmitato (C16) aos resíduos de cisteína conservados<sup>5</sup>. A hidrofobicidade originada pela inserção de lipídios é o que torna estas proteínas ativas, evidenciando a importância da palmitoilação para a sinalização gerada por elas (WILLERT et al., 2003).

### 1.1.1 Wntless e a secreção das proteínas Wnt

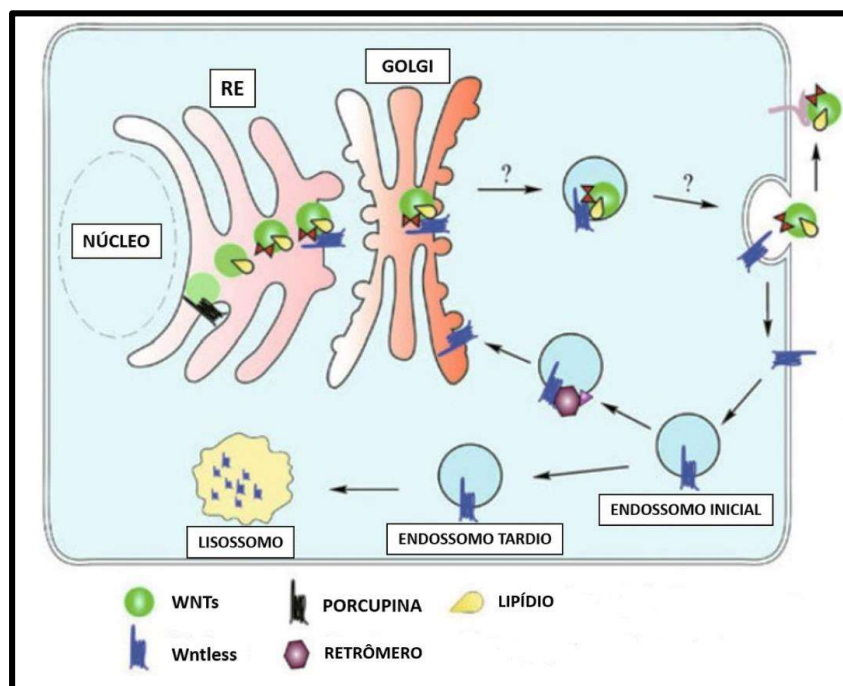
As proteínas Wnt são produzidas e modificadas no retículo endoplasmático (RE), pela ação da Porcupina aciltransferase. Esta enzima é responsável por facilitar a inserção de lipídios nestas proteínas, por catalisar as adições dos grupos acil, tanto nos resíduos Cis77 (TANAKA et al., 2000; TANAKA; KITAGAWA; KADOWAKI, 2002), quanto nos resíduos Ser209 (COOMBS et al., 2010). Após esta etapa, as Wnts são transportadas para o complexo de Golgi.

Devido à natureza hidrofóbica, as proteínas Wnt necessitam de uma via secretória especializada, para que possam se difundir através de ambientes

aquosos e atingir as células alvo. Esse processo é realizado pela Wntless (Wls em *Drosophila* ou GPR177 em mamíferos), uma proteína que interage com os ligantes Wnt, no complexo de Golgi, favorecendo o tráfego destes ligantes para a membrana plasmática, para serem secretados no meio extracelular (DAS et al., 2012).

Após a liberação da Wnt no meio extracelular, as proteínas Wls sofrem endocitose mediada por clatrina, com posterior formação de endossomos revestidos por retrômero, os quais irão intermediar o transporte retrógrado da Wls para o complexo de Golgi (PORT; BASLER, 2010) (**FIGURA 1**). Esses dados indicam que as Wls participam de diversos ciclos da secreção das proteínas Wnt (BÄNZIGER et al., 2006; FRANCH-MARRO et al., 2008; PAN et al., 2008; YANG et al., 2008).

**Figura 1** – O papel da Wntless no transporte das proteínas Wnt ao longo da via secretória em células produtoras de Wnt.



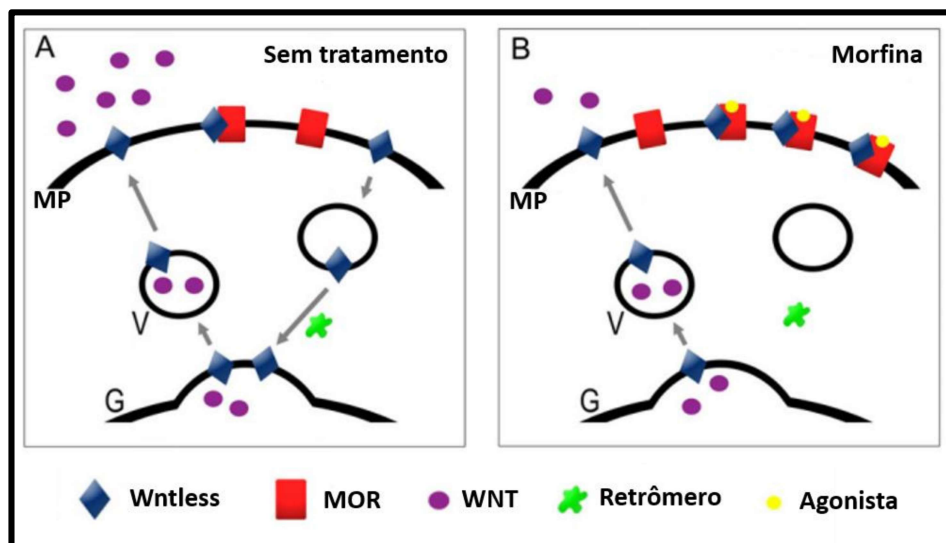
Fonte: Modificado de (DAS et al., 2012).

#### 1.1.1.1 Regulação da função das Wntless

Existem estudos que afirmam que a função da Wls e a secreção da Wnt podem ser reguladas pela interação da Wls a alguns receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (PETKO et al., 2018). Jin e colaboradores (2010) (JIN et al., 2010) demonstraram que a morfina é capaz de inibir a secreção da Wnt, em

decorrência da interação do receptor  $\mu$ -opióide (MOR) com a Wls. Assim, esse opióide, ao se ligar ao seu receptor, induz mudança na localização da Wls, a partir de compartimentos intracelulares para a membrana plasmática. Esses autores hipotetizaram que essa interação faz com que a proteína Wls forme um complexo com MOR, ficando retida na membrana plasmática. Dessa forma, a reciclagem da Wls é inibida, o que acarreta redução nos níveis da proteína Wnt secretada (**FIGURA 2**).

**Figura 2** – Modelo do efeito da interação MOR/Wntless na secreção da Wnt.



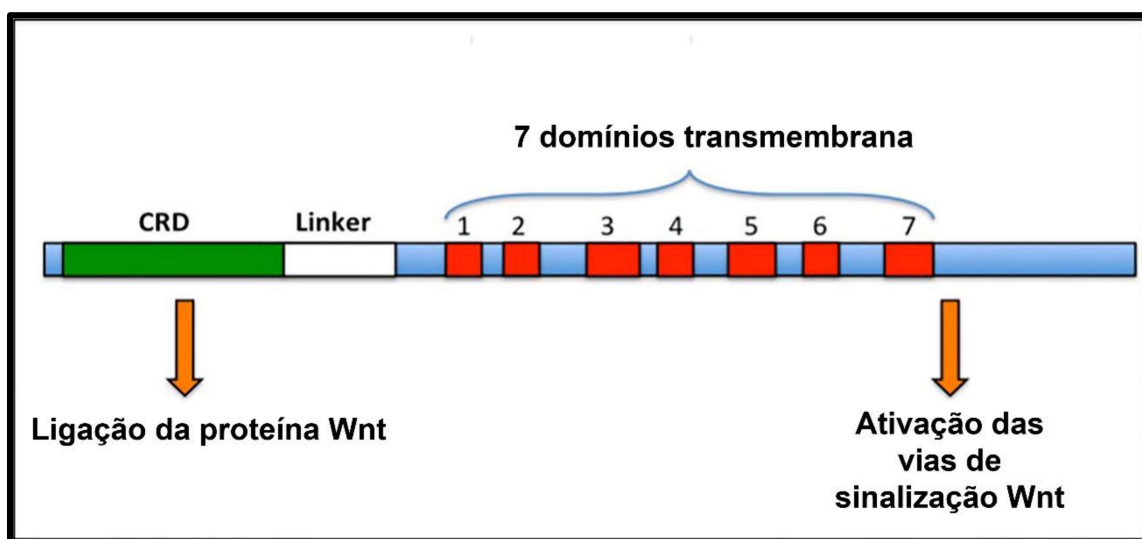
MP – Membrana Plasmática; V – Vesícula; G – Complexo de Golgi. Fonte: Modificado de (JIN et al., 2010).

A partir destas observações, novos estudos foram realizados, evidenciando que, além do MOR, a Wls interage com receptores  $\kappa$ - e  $\delta$ -opióides (PETKO et al., 2013), receptores canabinóides, entre outros (PETKO et al., 2018). Esses dados sugerem que muitas desses receptores, por interagirem com a Wls, podem interferir com a secreção das proteínas Wnt e, por consequência, nos mais variados processos que são regulados pelas vias de sinalização Wnt (CLEVERS; BATLLE, 2006; LIU et al., 2008; INESTROSA; MONTECINOS-OLIVA; FUENZALIDA, 2012).

## 1.2 RECEPTORES WNT E VIAS DE SINALIZAÇÃO

As proteínas Wnt ativas, que são liberadas a partir ou que estão presentes na superfície das células sinalizadoras, atuam por meio da ligação a um complexo de receptores, o qual é constituído principalmente pelos receptores da família Frizzled (Fz). Os receptores Fz fazem parte da superfamília dos receptores acoplados a proteína G e são compostos por 10 membros (Fz1-Fz10). Esses receptores possuem sete domínios transmembrana, uma porção N-terminal rica em cisteínas, nas quais as regiões lipídicas das proteínas Wnt se ligam, e uma porção C-terminal intracelular, região importante para a ativação das vias de sinalização Wnt (BHANOT et al., 1996; JANDA et al., 2012). O domínio C-terminal interage com a proteína Dishevelled (DVL) para que sinais extracelulares, provenientes das proteínas Wnt, sejam transmitidos para compartimentos intracelulares e nucleares (BHANOT et al., 1996) (**FIGURA 3**). Cada membro dos receptores Fzs possui a capacidade de interagir com diferentes proteínas Wnt e, conseqüentemente, ativar diferentes vias de sinalização Wnt.

**Figura 3** – Estrutura do receptor Frizzled.



Fonte: Modificado de (ALREFAEI, 2021).

Além dos receptores Frizzled, os ligantes Wnt podem também sinalizar através de correceptores, como o receptor relacionado a tirosina quinase (Ryk), o receptor órfão tirosina quinase (Ror2), a proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5/6 (LRP5/6) e a proteína tirosina quinase 7 (PTK7) (LOGAN; NUSSE, 2004; INOUE et al., 2006; NIEHRS, 2012). Existem

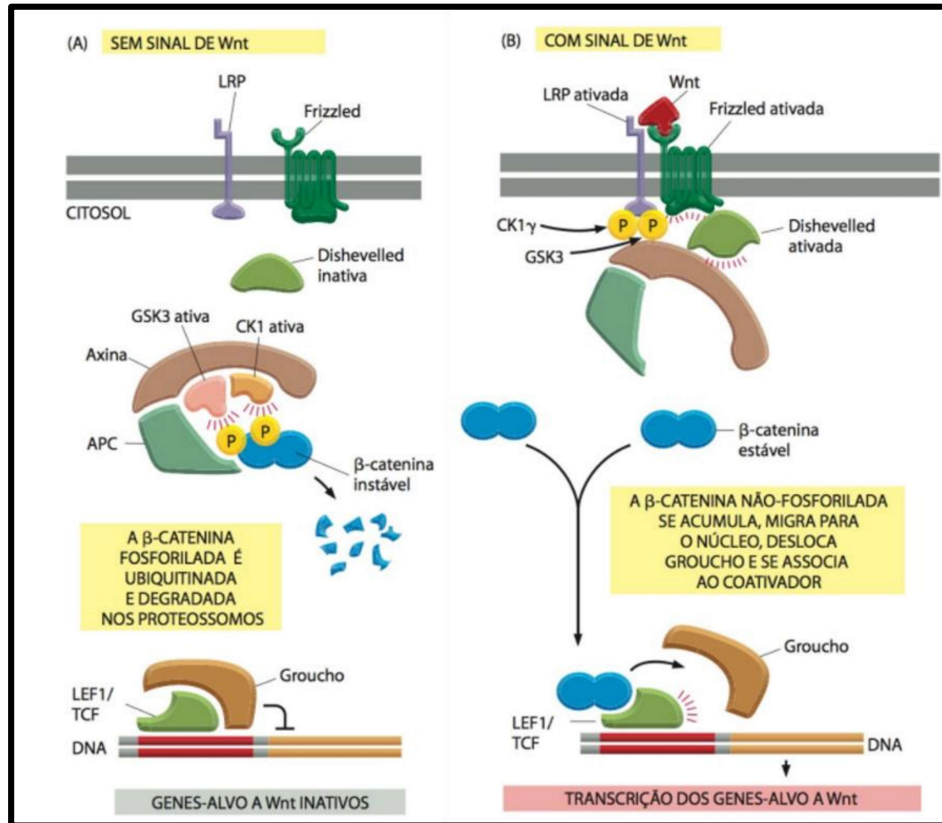
ainda, evidências de que o receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1r) seja um correceptor em potencial para as proteínas Wnt, na modulação de alguns eventos neuronais (HU et al., 2012).

Atualmente, existem caracterizadas mais de 19 proteínas Wnt e mais de 15 receptores e correceptores, distribuídos em sete famílias de proteínas diferentes, que se combinam entre si para ativação de diferentes vias (NIEHRS, 2012), dentre elas, a via Wnt/ $\beta$ -catenina (via canônica), a via de polaridade planar da célula (via Wnt/PCP) e a via do cálcio (Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ).

É importante ressaltar que o recrutamento da proteína DVL, pela ativação do receptor Fz, é essencial para que haja a propagação da informação provinda da proteína Wnt e o início da ativação de diferentes cascatas de sinalização (SHARMA et al., 2018). Dados da literatura indicam que as proteínas Wnt-1, 3, 3a, 8a, 8b, 10a e 10b são responsáveis pela ativação da via canônica; as proteínas Wnt- 4, 3a, 5b, 6, 7a, 7b e 11 são responsáveis pela ativação da via do cálcio e as proteínas WNT-5a e 11, pela via Wnt/PCP (STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008).

Na via canônica, a ligação da proteína Wnt ao receptor Fz e ao correceptor LRP5/6, acarreta ativação e recrutamento da proteína DVL, que, por sua vez, induz a dissociação do complexo de destruição formado pela axina, polipose adenomatosa do cólon (APC), glicogênio sintase quinase- $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) e a caseína quinase 1 (CK1). Um regulador chave na sinalização Wnt é a  $\beta$ -catenina, uma proteína reguladora transcricional, que é rapidamente fosforilada pela GSK- $3\beta$ , sofrendo degradação (ORFORD et al., 1997; SALIC et al., 2000). Contudo, na presença da sinalização Wnt, a GSK- $3\beta$  é inibida, levando ao acúmulo e estabilização da  $\beta$ -catenina no citoplasma, em sua forma ativa, e posterior translocação nuclear, onde se associa com o fator de transcrição celular-T/fator intensificador linfoide (TCF/LEF), regulando genes alvos (GORDON; NUSSE, 2006) (**FIGURA 4**).

**Figura 4 - Via de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina.**



(A) Na ausência do sinal de Wnt. (B) Ligação da Wnt a seus receptores. Fonte: (ALBERTS et al., 2017).

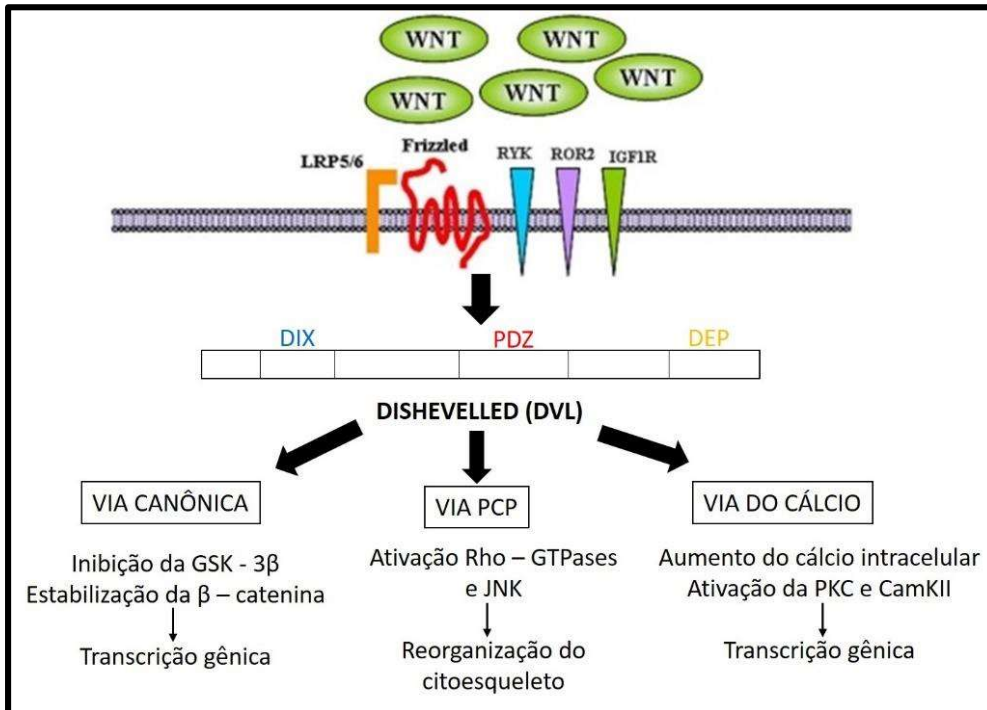
Na via Wnt/PCP, a Wnt se liga ao receptor Fz e ao seu correceptor Ror/Ryk/Ptk7, ativando a DVL, acarretando alterações tanto na reorganização da actina quanto dos microtúbulos, assim como a regulação de genes alvo. Estas alterações envolvem a ativação das proteínas Rho-GTPases e c-Jun-N-terminal quinase (JNK) (ROSSO et al., 2005; GORDON; NUSSE, 2006).

Finalmente, na via do cálcio, a WNT se liga ao receptor Fz específico desta via e ao seu correceptor Ror/Ryk, ativando a DVL, o que leva ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio. Este aumento promove a ativação de quinases sensíveis ao cálcio, tais como a proteína quinase C (PKC), proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII) e a translocação nuclear do fator de transcrição nuclear de células T ativadas (NFAT) (ROSSO; INESTROSA, 2013).

Desta forma, o mesmo ligante Wnt pode ativar diferentes vias de sinalização, dependendo do receptor envolvido e do tipo celular (**FIGURA 5**).



**Figura 5** – Esquema representativo das vias de sinalização ativadas pelas proteínas Wnt.



A proteína DVL contém três domínios que estão envolvidos nas funções neuronais. Fonte: Modificado de (ROSSO; INESTROSA, 2013).

### 1.3 SINALIZAÇÃO WNT E DESENVOLVIMENTO NEURONAL

Atualmente existem evidências sugerindo que as vias de sinalização Wnt têm papel importante no desenvolvimento e manutenção neuronal (SALINAS; ZOU, 2008).

A ligação das proteínas Wnt a seus receptores, pode ocasionar orientação axonal, mecanismo pelo qual um neurônio envia uma extensão celular ou axônio a grandes distâncias, antes de chegar à área correta. Esta orientação pode ser atrativa ou repulsiva, direcionando o neurônio para o tecido-alvo adequado (SALINAS; ZOU, 2008).

Em modelo de *Caenorhabditis elegans*, foi observado que várias proteínas e receptores Wnt regulam o crescimento e ramificação axonal (HILLIARD; BARGMANN, 2006; PAN et al., 2006; PRASAD; CLARK, 2006). Estudos utilizando neurônios motores do *C. elegans*, mostraram que a via canônica da sinalização Wnt medeia a orientação axônica (MARO; KLASSEN; SHEN, 2009). Nos mamíferos, estudos apontam que as proteínas Wnt estão envolvidas com o crescimento e remodelação dos axônios. Além disso, há

evidências que indicam que a proteína Wnt-7a aumenta o espalhamento e a ramificação axonal em cultura de células granulares (LUCAS; SALINAS, 1997). Outros estudos têm indicado que a Wnt-3a orienta e promove a ramificação axonal e o remodelamento do cone de crescimento em neurônios sensoriais espinhais (KRYLOVA et al., 2002; PURRO et al., 2008).

Tem sido demonstrado ainda que a sinalização Wnt possui papel importante no desenvolvimento dos dendritos, atuando na sua formação, manutenção e funcionamento. Muitos estudos evidenciaram que as proteínas Wnt regulam a arquitetura dendrítica, por meio da ativação das diferentes vias da sinalização Wnt. Neste contexto, Yu e Malenka (2003) (YU; MALENKA, 2003) postularam que a  $\beta$ -catenina é um mediador crítico para a morfologia dendrítica, uma vez que a superexpressão desta proteína aumenta a arborização dendrítica em neurônios do hipocampo. Wayman e colaboradores (2006) (WAYMAN et al., 2006) observaram também que o crescimento e ramificação dendrítica são mediados pela ativação da via de sinalização dependente de cálcio. Assim, a sinalização Wnt, por meio da ativação da proteína DVL, estimula o crescimento e arborização dendrítica em neurônios hipocampais. Particularmente, a proteína Wnt-7b, expressa no hipocampo durante a dendritogênese, aumenta a arborização dendrítica e tal processo ocorre pelo aumento do comprimento e elaboração da ramificação dos dendritos. Além disso, outras análises revelaram que a sinalização Wnt-7b/DVL regula o desenvolvimento dendrítico, pela via não-canônica. A modulação imposta pela Wnt-7b e DVL, no desenvolvimento dendrítico, decorre de mudanças na atividade das Rho GTPases e JNK (ROSSO et al., 2005). Estas evidências revelam a importância do papel das vias de sinalização Wnt para regular o desenvolvimento dendrítico.

As proteínas Wnt estão também relacionadas com a formação estrutural dos componentes que integram os compartimentos pré-sinápticos, uma vez que a maioria dos ligantes que modulam a diferenciação pré-sináptica, atua por meio da ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (ROSSO; INESTROSA, 2013). No cerebelo, durante a formação das sinapses entre as células granulares e as fibras musgosas, a proteína Wnt-7a induz o espalhamento axonal, enriquece o tamanho do cone de crescimento e a ramificação axonal, além de auxiliar no acúmulo de proteínas sinápticas. Estes dados sugerem que esta proteína é um fator sinaptogênico (HALL; LUCAS; SALINAS, 2000; BUDNIK; SALINAS, 2011),

atuando por meio do aumento do agrupamento da sinapsina I, proteína importante para a organização estrutural e funcional do terminal pré-sináptico, e de outras proteínas pré-sinápticas, tais como sinaptofisina, sinaptotagmina, além da proteína da vesícula sináptica 2 (SV2) (HALL; LUCAS; SALINAS, 2000; CERPA et al., 2008). Adicionalmente, na membrana pré-sináptica de neurônios hipocámpais e do cerebelo, a Wnt-7a estimula a reciclagem e acelera a exocitose de vesículas sinápticas, aumenta a dinâmica de liberação de neurotransmissores, estando também envolvida no tráfico de certos tipos de receptores no terminal sináptico (AHMAD-ANNUAR et al., 2006; CERPA et al., 2008; FARÍAS et al., 2009).

A sinalização Wnt possui ainda papel importante na formação das estruturas pós-sinápticas. A proteína WNT-5a modula as sinapses por induzir a formação de protrusões dendríticas, aumentando, conseqüentemente, a formação de espinhas dendríticas e o tamanho das pré-existentes. Evidências apontam também, que a proteína Wnt-5a incrementa os níveis de cálcio intracelular e a rápida fosforilação da CaMKII, nos neurônios sinápticos, sugerindo ativação da via de sinalização Wnt/Ca<sup>2+</sup> (VARELA-NALLAR et al., 2010). Além da ativação da via do cálcio, essa proteína aumenta o agrupamento da proteína da densidade pós-sináptica (PSD-95). Essa proteína possui papel importante no ancoramento de receptores de glutamato às proteínas de sinalização e ao citoesqueleto neuronal, por meio da via de sinalização Wnt/JNK (HERING; SHENG, 2001; GERROW et al., 2006; FARÍAS et al., 2009). Estudos têm revelado que a Wnt-5a aumenta o tráfico da subunidade NR2B dos receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), por intermédio da ativação das duas vias de sinalização não-canônica citadas anteriormente (ROSSO; INESTROSA, 2013).

Desta maneira, as proteínas Wnt são importantes moduladores que intervêm na plasticidade e funcionamento sináptico, presente tanto nas regiões pré- como pós-sinápticas.

#### 1.4 SINALIZAÇÃO WNT E O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS

Devido às diversas funções biológicas que a sinalização Wnt desempenha, alterações na atividade dessa via de sinalização acarretam o

desenvolvimento de diferentes patologias (LUO et al., 2007). Assim, mutações em componentes chaves da sinalização Wnt podem desencadear proliferação celular descontrolada, dando origem a cânceres de alta malignidade (ZHAN; RINDTORFF; BOUTROS, 2017). Foi observado que uma mutação no gene da proteína APC resulta em hiperatividade da via da  $\beta$ -catenina, favorecendo a progressão de células tumorais e dando origem, por exemplo, ao câncer colorretal (NUSSE, 2005). Além da proliferação celular descontrolada, a desregulação da sinalização Wnt está associada com a patogênese de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, doenças metabólicas, incluindo obesidade e resistência à insulina, doenças cardiovasculares e doenças hepáticas. Adicionalmente, foi observado o envolvimento dessa via de sinalização com o desenvolvimento e a manutenção de diferentes tipos de dor crônica (NG et al., 2019; TANG et al., 2022).

#### 1.4.1 Sinalização Wnt e dor crônica

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). A dificuldade em definir dor é decorrente da sua natureza subjetiva, a qual envolve componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais (WILLIAMS; CRAIG, 2016). Ainda, a transmissão e a percepção da dor são complexas já que, além do grau de subjetividade envolvido, o sistema nervoso central encontra-se em constante mudança, orquestrada por mediadores químicos (ELLISON, 2017).

Nociceção é o termo fisiológico utilizado para descrever os processos neurais envolvidos na codificação e processamento de estímulos nocivos. Um nociceptor é o receptor sensorial ou terminação nervosa livre responsável por transduzir os estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008). Frente a um estímulo (mecânico, químico ou térmico) de intensidade capaz de gerar uma possível lesão tecidual, os nociceptores periféricos serão recrutados, favorecendo a condução do sinal nociceptivo pelo neurônio somatossensorial primário até o corno dorsal da medula espinhal. No corno dorsal, o neurônio primário faz sinapse com o neurônio de segunda ordem, que conduz o sinal ao

núcleo talâmico, onde ocorrerá a segunda sinapse com o neurônio de terceira ordem. Este neurônio por sua vez, se projeta para o córtex somatossensorial, o qual está relacionado com o componente sensorial-discriminativo da dor, e para estruturas límbicas (córtex cingulado anterior e insula), as quais estão envolvidas com o componente afetivo-motivacional da dor (MILLIGAN; WATKINS, 2009; SWIEBODA et al., 2013; FENTON; SHIH; ZOLTON, 2015; W N; M D, 2015; ELLISON, 2017).

A dor fisiológica serve como sinal de alerta para o corpo, a qual tem o intuito de prevenir a ocorrência de lesão. Assim, quando o estímulo é removido, há o cessamento da dor. Por outro lado, frente a um quadro de inflamação e/ou dano tecidual, ocorrem diversas mudanças, como o aumento excessivo da excitabilidade e das sinapses nas vias neurais que medeiam a dor, originando a dor patológica - neste caso, a dor tem o propósito de favorecer a cicatrização e regeneração (JANG et al., 2018).

Alterações na excitabilidade e plasticidade sináptica podem ser iniciadas pelos disparos excessivos dos nociceptores aferentes primários, decorrentes da ação de mediadores inflamatórios. Diversos mediadores inflamatórios, secretados pelas células imunes recrutadas durante o processo inflamatório, ativam e/ou sensibilizam os canais iônicos presentes no nociceptor, o que garante o aumento da excitabilidade (LINLEY et al., 2010; JULIUS, 2013). A abertura dos canais iônicos e consequente influxo de cátions e o efluxo de ânions, é capaz de despolarizar os nociceptores aferentes, acarretar aumento do cálcio intracelular e intensificar assim, os sinais nociceptivos.

O aumento da atividade dos canais de cálcio propicia o aumento da transmissão e liberação de neuropeptídeos. Estes, por sua vez, promovem aumento da atividade imune e, usualmente, intensificam a inflamação periférica (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012). Interações semelhantes às que ocorrem na periferia, também acontecem nas sinapses nociceptivas espinhais, promovendo a neuroinflamação. O aumento de neurotransmissores e mediadores, estimulado pelo aumento da transmissão sináptica, ativa as células gliais, principalmente microglia e astrócitos, as quais liberam citocinas, quimiocinas, e diversos outros mediadores inflamatórios (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; ZHANG; JIANG; GAO, 2017). Alguns desses mediadores intensificam a atividade

sináptica entre os neurônios, recrutam células gliais e imunes, como macrófagos e neutrófilos, exacerbando desta forma, a neuroinflamação (JANG et al., 2018).

A dor aguda, que pode ser evocada pela presença de uma doença ou lesão, é autolimitada. Este tipo de dor é transitória e pode durar algumas semanas (até 12 semanas). Frente a uma lesão persistente, os componentes do sistema nervoso central e periférico envolvidos na transmissão da dor, exibem grande plasticidade, favorecendo o aumento dos sinais de dor e hipersensibilidade (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Quando as mudanças geradas pela plasticidade persistem por mais de 12 semanas, um quadro de dor crônica se instala (SWIEBODA et al., 2013).

A dor, especialmente a dor crônica, é um problema de saúde importante que pode chegar a afetar até 30% dos adultos no mundo (JI; XU; GAO, 2014). A dor crônica resulta da plasticidade neural, com alterações na atividade neuronal, que induzem sensibilização de neurônios sensoriais primários periféricos e, também, de neurônios nociceptivos centrais, presentes na medula espinhal, núcleo trigeminal, tronco cerebral e córtex (BASBAUM et al., 2009; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Dentre a dor crônica, está a dor neuropática. Ela é caracterizada como uma dor ocasionada por lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (IASP, 2012). Sua prevalência na população mundial varia entre 7% e 10%, representando 20 a 25% dos indivíduos que sofrem de dor crônica (VAN HECKE et al., 2014; BOUHASSIRA, 2019). A dor neuropática afeta negativamente a qualidade de vida do paciente, além de impactar a realização de atividades comuns do dia a dia (DIBONAVENTURA et al., 2017). Não há um tratamento eficaz para esse tipo de dor crônica, visto que a maioria dos agentes farmacológicos utilizados para tratamento da dor, têm eficácia moderada na dor neuropática (KOCOT-KĘPSKA et al., 2021).

A dor neuropática pode decorrer de lesão direta do nervo periférico, lesão da medula espinhal ou lesão cerebral (derrame e trauma) (SVENSSON; ZATTONI; SERHAN, 2007; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; XU et al., 2013). Este tipo de dor é caracterizado pela presença de hiperalgesia (dor exagerada ocasionada por estímulos térmicos e mecânicos nocivos) e alodinia (dor evocada por estímulos normalmente inócuos, como o toque leve), além da presença de dor em queimação, parestesia (sensação de formigamento, coceira,

dormência, entre outras) e disestesia (enfraquecimento ou perda de algum dos sentidos, sobretudo do tato) (JI; XU; GAO, 2014). Apesar de décadas de investigação, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese da dor neuropática, não estão totalmente caracterizados.

Estudos de Gao e Ji (2010) (GAO; JI, 2010), e de Kawasaki e colaboradores (2008) (KAWASAKI et al., 2008) evidenciaram que a neuroinflamação medeia a manutenção e o desenvolvimento da sensibilização dos neurônios nociceptivos. Dados experimentais têm sugerido que a sinalização Wnt pode estar relacionada com o desenvolvimento e manutenção da neuroinflamação. Adicionalmente, estudos em roedores demonstraram que a sinalização Wnt tem papel crucial na patogenia da dor neuropática induzida por compressão crônica do nervo isquiático e da dor relacionada ao câncer (ZHANG et al., 2013; TANG, 2014).

A lesão do nervo periférico e o câncer ósseo acarretam maior expressão da proteína Wnt-3a em neurônios sensoriais e, também, em astrócitos espinhais. A proteína Wnt-3a se liga a seus receptores, ativando a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, evidenciada pelos níveis aumentados da  $\beta$ -catenina na sua forma ativa, na medula espinhal. A injeção intratecal de inibidores da via canônica em roedores, atenua o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática e do câncer, além de interferir com a ativação da subunidade NR2B do receptor glutamatérgico NMDA e com a ativação de sinalizações dependente de cálcio. Ainda, a ativação da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, através da translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo e sua posterior ligação ao fator de transcrição TCF, estimula a transcrição e síntese de citocinas pro-inflamatórias, como a IL-18 e o TNF $\alpha$ , as quais são essenciais para a gênese e manutenção da dor neuropática (ZHANG et al., 2013).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um mediador importante na gênese da dor neuropática. Dados da literatura indicam que a sinalização Wnt está relacionada à liberação do BDNF, já que a estimulação direta de células microgliais com a Wnt-3a, promove a secreção deste fator para o meio de cultivo celular. Essas evidências sugerem que o aumento da expressão da Wnt-3a no corno dorsal da medula espinhal, pode induzir a ativação de células microgliais, desencadeando a secreção do BDNF e, assim,

favorecendo a instalação e persistência da dor neuropática (ITOKAZU et al., 2014).

A família do fator de transcrição celular-T/fator intensificador linfoide (TCF/LEF), é um grupo de fatores de transcrição, que recruta a  $\beta$ -catenina nuclear para atuar em genes alvos. Foi demonstrado que a  $\beta$ -catenina estabilizada, atua como cofator de transcrição para os quatro tipos de genes TCF - TCF3, TCF4, TCF1 e LEF1-, juntamente com outras proteínas que se ligam ao DNA. Xu e colaboradores (2015) (XU et al., 2015) observaram, 7 dias após lesão crônica por constrição do nervo isquiático (CCI), aumento da expressão de TCF4 no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal. Os padrões de expressão da  $\beta$ -catenina e GSK-3 $\beta$  acompanharam a expressão aumentada de TCF4. A injeção intratecal do inibidor da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e do inibidor da expressão de TCF4 atenuou, significativamente, a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica nos animais com CCI. Estes resultados apontam para a importância do TCF4 e da  $\beta$ -catenina, no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal, para a manutenção da dor neuropática após CCI.

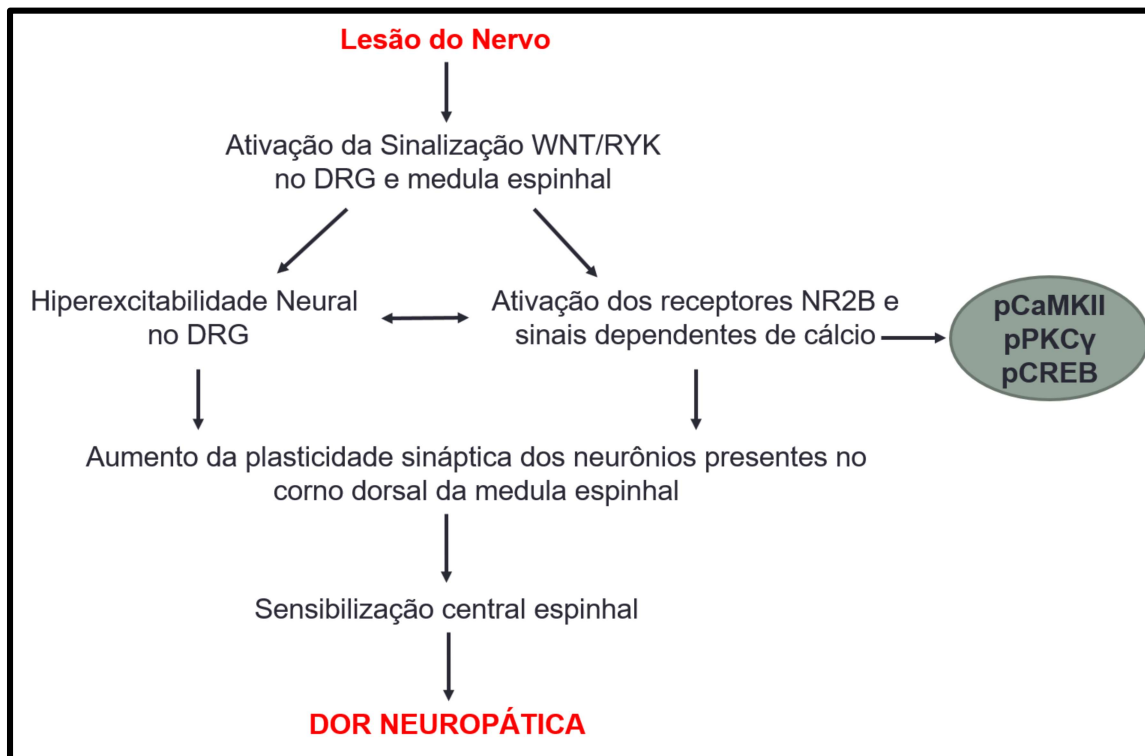
Evidências do envolvimento da sinalização Wnt na dor neuropática foram também apontadas por Yuan e colaboradores (2012) (YUAN; SHI; TANG, 2012). Estes autores observaram aumento na expressão das proteínas Wnt-3a e  $\beta$ -catenina no corno dorsal da medula espinhal de camundongos com encefalomielite autoimune experimental (EAE). Além disso, os níveis da proteína Wnt-5a, um ligante Wnt para a via não-canônica, e do seu receptor RoR2, estavam aumentados no corno dorsal espinhal destes animais. O antagonista para Wnt-5a e a indometacina acarretaram inibição da Wnt-5a e da  $\beta$ -catenina, respectivamente, atenuando a hipersensibilidade mecânica apresentada pelos animais com EAE.

A sinalização Wnt pode ainda contribuir para a dor neuropática, por meio da ativação da via de sinalização atípica Wnt/Ryk. Estudos têm evidenciado que a lesão do nervo isquiático em ratos causa expressão marcante e prolongada das proteínas Wnt-3a, da Wnt-5b e dos receptores Ryk em neurônios sensoriais primários e em neurônios e astrócitos presentes no corno dorsal da medula espinhal. O bloqueio espinhal da via de sinalização Wnt/Ryk, por meio da inibição do receptor Ryk, inibe a indução e a persistência da dor. Ainda, o bloqueio do receptor Ryk, tanto *in vivo* como *in vitro*, interfere com o aumento do cálcio



intracelular induzido pela lesão nervosa, além de diminuir a hiperexcitabilidade dos neurônios sensoriais e atenuar o aumento da plasticidade sináptica entre as fibras C e os neurônios do corno dorsal. Adicionalmente, foi detectada diminuição da ativação de receptores NR2B e dos sinais subsequentes dependentes de cálcio CaMKII, ERK, PKC $\gamma$ , CREB, nos neurônios sensoriais e na medula espinhal (LIU et al., 2015) (**FIGURA 6**).

**Figura 6** – Esquema representativo da ativação da sinalização Wnt/Ryk.



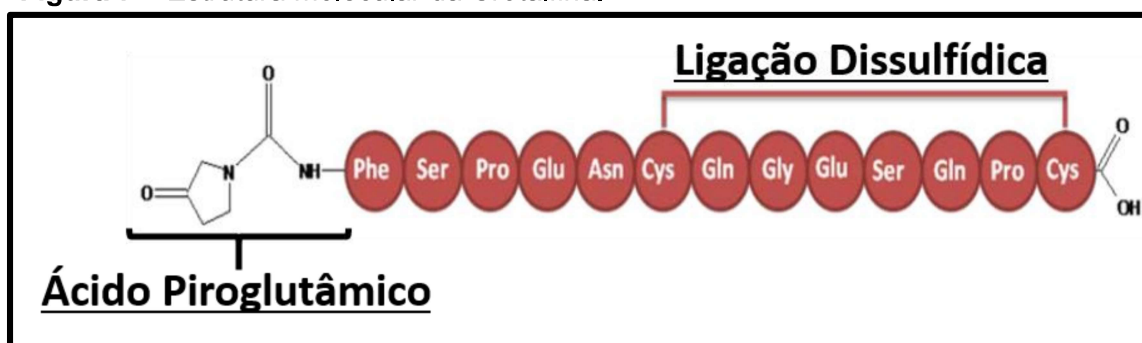
pCaMKII (Calmodulina quinase II fosforilada); pPKC $\gamma$  (Proteína quinase C do tipo gama fosforilada); pCREB (proteína ligadora do elemento responsivo ao Monofosfato Cíclico de Adenosina fosforilada). Fonte: Modificado de LIU et al., 2015.

As evidências relacionando a sinalização Wnt com a dor crônica, sugerem que substâncias que possam interagir com esta via de sinalização podem ter papel relevante para o tratamento deste tipo de dor.

## 1.5 CROTALFINA

A crotalfina é um peptídeo de 14 aminoácidos, isolado do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus* (KONNO et al., 2008), que induz potente efeito antinociceptivo (GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008). Em sua fórmula estrutural, apresenta um ácido piroglutâmico e dois resíduos de cisteína, os quais formam uma ligação dissulfídica (**FIGURA 7**).

**Figura 7** – Estrutura molecular da Crotalfina.



Fonte: Modificado de GUTIERREZ et al., 2008

Estudos utilizando o peptídeo sintético indicam que a crotalfina, administrada pela via oral, intravenosa ou intraplantar, induz efeito antinociceptivo, de longa duração (3 a 5 dias), em diferentes modelos de dor (KONNO et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012).

Estudos farmacológicos evidenciaram que esse efeito, em modelos de dor aguda, é mediado pela ativação indireta de receptores  $\kappa$ -opióides periféricos (KONNO et al., 2008).

Gutierrez e colaboradores (2008, 2012) (GUTIERREZ et al., 2008, 2012), usando modelo de dor neuropática acarretada pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos, apresentaram dados sugerindo que a crotalfina tem ação antinociceptiva na dor crônica. Após 14 dias da CCI, o tratamento com o peptídeo, administrado por via oral, acarretou inibição da hiperalgesia, alodinia e dor espontânea. Neste modelo, o efeito antinociceptivo é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo  $\kappa$  e, também, do tipo  $\delta$ .

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram ainda, que a eficácia da ação antinociceptiva da crotalfina está relacionada à sensibilização aguda prévia, decorrente de lesão tecidual ou inflamação. Esta sugestão está baseada

em dados de Zambelli e colaboradores (2014) (ZAMBELLI et al., 2014), evidenciando que a injeção intraplantar de baixas doses de crotalfina ou de agonistas seletivos de receptores opióides, não interfere com o limiar nociceptivo de animais naïve, quando comparado a animais que apresentam hiperalgesia induzida por prostaglandina E2 (PGE2). Neste estudo foi observado que a administração intraplantar de PGE2 aumenta, per se, a expressão periférica de RNAm para receptores opióides do tipo  $\mu$  e  $\kappa$  e, após 3 horas da injeção, a expressão protéica para os receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$ . Este eicosanóide também foi capaz de elevar a ativação dos receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$  pelos seus agonistas correspondentes e, também, pela crotalfina. Em contrapartida, o tratamento com a PGE2 diminui a expressão proteica e a ativação do receptor  $\delta$ -opióide pelo seu respectivo agonista. Já nas culturas de neurônios dos gânglios da raiz dorsal, a ativação de vias de sinalização específicas das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e proteína quinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) pela crotalfina, foi aumentada após sensibilização pela PEG2. Estes dados evidenciam que a lesão tecidual regula a expressão e a ativação de receptores opióides periféricos pela crotalfina ou por agonistas seletivos destes receptores e, também, a ativação de vias de sinalização específicas.

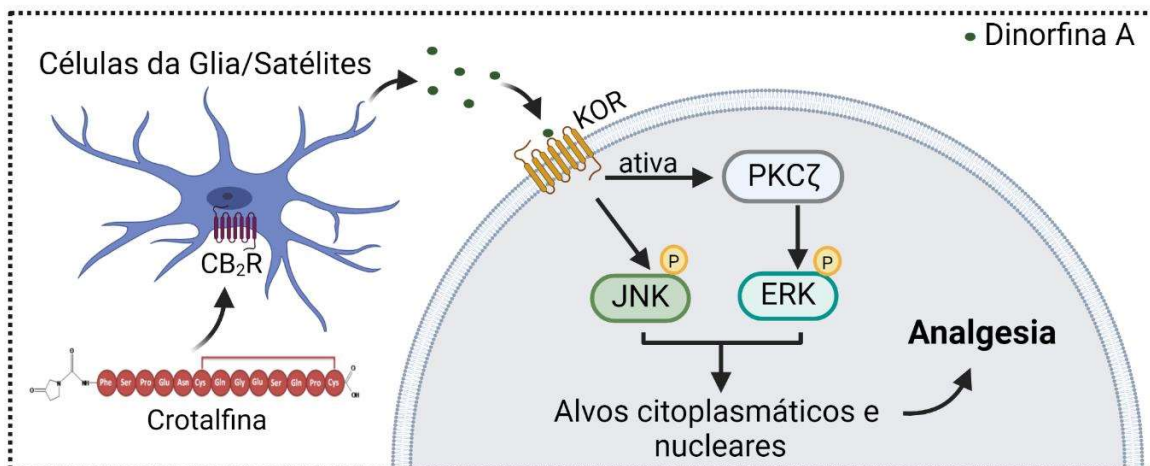
Recentemente, de Freitas e colaboradores (DE FREITAS et al., 2021) mostraram que o efeito antinociceptivo da crotalfina em ratos naïve, ou seja, sem sensibilização prévia, é mediado pela ativação das quinases ERK 1/2 e JNK e pela inativação da p38, na medula espinhal. Foi ainda observado que a ativação da ERK 1/2 é mediada pela ativação da PKC $\zeta$ . Esses dados indicam que o eixo PKC $\zeta$ -ERK é essencial para a antinocicepção proporcionada pela crotalfina.

Estudos posteriores mostraram que os canais TRPA1 estão também envolvidos no efeito antinociceptivo da crotalfina. Nestes estudos, foi evidenciado que o peptídeo ativa parcialmente e, em seguida, dessensibiliza os canais TRPA1. Esse mecanismo é essencial para a antinocicepção induzida pela crotalfina (BRESSAN et al., 2016).

Visando ampliar o entendimento da ação da crotalfina em receptores opióides, Machado e colaboradores (2014) (MACHADO et al., 2014) mostraram que a ação antinociceptiva do peptídeo é mediada pela ativação periférica dos receptores CB $_2$ , a qual estimula a liberação de dinorfina A dos tecidos periféricos.

A dinorfina A, por sua vez, induz antinocicepção por atuar nos receptores  $\kappa$ -opióide expressos em neurônios aferentes primários. (**FIGURA 8**).

**Figura 8** – Mecanismo de ação da crotalfina



A ativação periférica dos receptores canabinóides do tipo 2 pela crotalfina, com posterior liberação de Dinorfina A, a qual atua em receptores Kappa opióides. Os receptores canabinóides, especialmente o  $CB_2$ , são amplamente expressos na periferia e em células imunes residentes ou infiltradas na pele. Fonte: Modificado DE FREITAS et al., 2021.

Os dados obtidos por Machado e colaboradores (2013) (MACHADO et al., 2014), indicando interação entre o sistema canabinóide e opióide na ação da crotalfina, apoiam estudos de literatura evidenciando que estes sistemas, por meio da interação entre as vias de sinalização ativadas por eles, favorecem a modulação da dor (CICHEWICZ, 2004; WELCH, 2009; BUSHLIN; ROZENFELD; DEVI, 2010).

Baseado nos dados apresentados ao longo desta Introdução, mostrando:

- A participação da sinalização Wnt no desenvolvimento e manutenção da dor crônica e,
- Que frente a ativação de GPCRs, como os receptores opióides e canabinóides ocorre maior interação entre a proteína WIs e esses receptores, acarretando alteração da secreção das proteínas Wnt e da ativação das vias de sinalização Wnt, nossa hipótese é que, em modelo de dor neuropática, a crotalfina possa atuar nas vias de sinalização Wnt -  $\beta$ -catenina-dependente e - independente -, por meio da ativação dos sistemas canabinóide e opióide.

# **2 CONCLUSÃO**

Nossos dados demonstram que a lesão crônica do nervo isquiático de ratos acarreta hiperativação da via canônica Wnt/ $\beta$ -catenina e da via Wnt/Ryk. A crotalina é capaz de inibir essa ativação, o que pode contribuir para a ação antinociceptiva do peptídeo, neste modelo de dor crônica. Os receptores canabinóides do tipo CB<sub>2</sub> estão envolvidos, pelo menos em parte, com esse efeito.

Esse estudo amplia o conhecimento sobre o papel das proteínas da via de sinalização Wnt na dor crônica. Ainda, abre novas perspectivas para o uso de fármacos com atividade opióide/canabinoíde como ferramenta terapêutica, no manejo e controle da dor neuropática, tendo como alvo a sinalização Wnt.

# REFERÊNCIAS

AHMAD-ANNUAR, A. et al. Signaling across the synapse: A role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 1, p. 127–139, 2006.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. [s.l: s.n.]

ALREFAEI, A. F. Frizzled receptors (FZD) play multiple cellular roles in development, in diseases, and as potential therapeutic targets. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 8, p. 101613, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101613>>.

BÄNZIGER, C. et al. Wntless, a Conserved Membrane Protein Dedicated to the Secretion of Wnt Proteins from Signaling Cells. **Cell**, v. 125, n. 3, p. 509–522, 2006.

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

BHANOT, P. et al. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor identified . We show here that cultured Drosophila cells transfected with a novel member of the. **Nature**, v. 382, p. 225–230, 1996.

BOUHASSIRA, D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. **Revue Neurologique**, v. 175, n. 1–2, p. 16–25, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016>>.

BRESSAN, E. et al. Crotalpine desensitizes TRPA1 ion channels to alleviate inflammatory hyperalgesia. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2504–2516, 2016.

BUDNIK, V.; SALINAS, P. C. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 151–159, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.002>>.

BUSHLIN, I.; ROZENFELD, R.; DEVI, L. A. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 80–86, 2010.

CERPA, W. et al. Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5918–5927, 2008.

CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1063–1067, 2012.

CICHEWICZ, D. L. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. **Life Sciences**, v. 74, n. 11, p. 1317–1324, 2004.

CLEVERS, H.; BATLLE, E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 1, p. 2–5, 2006.



COOMBS, G. S. et al. WLS-dependent secretion of WNT3A requires Ser209 acylation and vacuolar acidification. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 19, p. 3357–3367, 2010.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 1–32, 2009.

DAS, S. et al. Wntless in Wnt secretion: Molecular, cellular and genetic aspects. **Frontiers in Biology**, v. 7, n. 6, p. 587–593, 2012.

DE FREITAS, B.G. et al. PKC $\zeta$ -Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Mediates Crotalpine-Induced Antinociception. **Toxins**, v. 13, n. 12, p. 912, 2021.

DIBONAVENTURA, M. D. et al. The prevalence of probable neuropathic pain in the US: results from a multimodal general-population health survey. **Journal of pain research**, v. 10, p. 2525–2538, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29138590/>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

ELLISON, D. L. Physiology of Pain. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 397–406, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.001>>.

FARÍAS, G. G. et al. Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15857–15866, 2009.

FENTON, B. W. F.; SHIH, E.; ZOLTON, J. The neurobiology of pain perception in normal and persistent pain Bradford W Fenton, Elim Shih and Jessica Zolton. **Pain Management**, v. 4, n. July 2015, p. 1–26, 2015.

FRANCH-MARRO, X. et al. Wingless secretion requires endosome-to-Golgi retrieval of Wntless/Evi/ Sprinter by the retromer complex. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 170–177, 2008.

GAO, Y. J.; JI, R. R. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 56–68, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.01.002>>.

GERROW, K. et al. A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. **Neuron**, v. 49, n. 4, p. 547–562, 2006.

GORDON, M. D.; NUSSE, R. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22429–22433, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R600015200>>.

GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalpine induces potent antinociception in

neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, n. 1–3, p. 84–92, 2008.

GUTIERREZ, V. P. et al. The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are involved in the antinociceptive effect of crotalpine on neuropathic pain in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 14–24, 2012.

HALL, A. C.; LUCAS, F. R.; SALINAS, P. C. Axonal Remodeling and Synaptic Differentiation in the Cerebellum Is Regulated by WNT-7a Signaling becomes multilobulated as it interdigitates with GC dendrites (Hamori and Somogyi, 1983). The increase in mossy fiber surface area permits the formation of. **Cell**, v. 100, p. 525–535, 2000. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0092867400806893/1-s2.0-S0092867400806893-main.pdf?\\_tid=4d2ea9fa-5092-11e7-814d-00000aab0f6b&acdnat=1497397675\\_39fe16129d5ff7a323afb29f8e695a0e](http://ac.els-cdn.com/S0092867400806893/1-s2.0-S0092867400806893-main.pdf?_tid=4d2ea9fa-5092-11e7-814d-00000aab0f6b&acdnat=1497397675_39fe16129d5ff7a323afb29f8e695a0e)>.

HERING, H.; SHENG, M. Dendritic spines: structure, function and regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. December, p. 880–888, 2001.

HILLIARD, M. A.; BARGMANN, C. I. Wnt signals and Frizzled activity orient anterior-posterior axon outgrowth in *C. elegans*. **Developmental Cell**, v. 10, n. 3, p. 379–390, 2006.

HU, Q. et al. Signalling through the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) interacts with canonical Wnt signalling to promote neural proliferation in developing brain. **ASN Neuro**, v. 4, n. 5, p. 253–265, 2012.

IASP. Neuropathic Pain. 2012. Disponível em: <<https://www.iasppain.org/resources/terminology/?ItemNumber=1698&navItemNumber=576%20-%20Neuropathicpain>>.

INESTROSA, N. C.; MONTECINOS-OLIVA, C.; FUENZALIDA, M. Wnt signaling: Role in Alzheimer disease and schizophrenia. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 788–807, 2012.

INOUE, G. et al. Exposure of the nucleus pulposus to the outside of the annulus fibrosus induces nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating the lumbar intervertebral discs in rats. **Spine**, v. 31, n. 13, p. 1433–1438, 2006.

ITOKAZU, T. et al. Involvement of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the development of neuropathic pain. **Neuroscience Research**, v. 79, n. 1, p. 34–40, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2013.12.002>>.

JANDA, C. Y. et al. Structural basis of Wnt recognition by frizzled. **Science**, v. 336, n. 6090, p. 59–64, 2012.

JANG, Y. et al. Nociceptive Roles of TRPM2 Ion Channel in Pathologic Pain. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6589–6600, 2018.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 533–548, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd4334>>.

JIN, J. et al. Interaction of the mu-opioid receptor with GPR177 (Wntless) inhibits Wnt secretion: Potential implications for opioid dependence. **BMC Neuroscience**, v. 11, 2010.

JULIUS, D. **TRP channels and pain**. [s.l: s.n.]v. 29

KAWASAKI, Y. et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: Distinct and overlapping role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 20, p. 5189–5194, 2008.

KOCOT-KĘPSKA, M. et al. Topical treatments and their molecular/cellular mechanisms in patients with peripheral neuropathic pain—narrative review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, 2021.

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

KRYLOVA, O. et al. WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. **Neuron**, v. 35, n. 6, p. 1043–1056, 2002.

KUSSEROW, A. et al. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. **Nature**, v. 433, n. 7022, p. 156–160, 2005.

LINLEY, J. E. et al. Understanding inflammatory pain: Ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 5, p. 657–669, 2010.

LIU, S. et al. Wnt/Ryk signaling contributes to neuropathic pain by regulating sensory neuron excitability and spinal synaptic plasticity in rats. **Pain**, v. 156, n. 12, p. 2572–2584, 2015.

LIU, Y. et al. Repulsive Wnt signaling inhibits axon regeneration after CNS injury. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8376–8382, 2008.

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

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 781–810, 2004.

LUCAS, F. R.; SALINAS, P. C. WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. **Developmental Biology**, v.

192, n. 1, p. 31–44, 1997.

LUO, J. et al. Wnt signaling and human diseases: What are the therapeutic implications? **Laboratory Investigation**, v. 87, n. 2, p. 97–103, 2007.

MACHADO, F. C. et al. Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 4, p. 961–972, 2014.

MARO, G. S.; KLASSEN, M. P.; SHEN, K. A  $\beta$ -catenin-dependent Wnt pathway mediates anteroposterior axon guidance in *C. elegans* motor neurons. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.

NG, L. F. et al. WNT Signaling in Disease. **Cells**, v. 8, n. 8, 2019.

NIEHRS, C. The complex world of WNT receptor signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 12, p. 767–779, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3470>>.

NUSSE, R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 28–32, 2005. Disponível em: <<http://www.cell-research.com>>. Acesso em: 24 abr. 2022.

ORFORD, K. et al. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of  $\beta$ -catenin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 40, p. 24735–24738, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.40.24735>>.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Review series Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.

PAN, C. L. et al. Multiple Wnts and Frizzled receptors regulate anteriorly directed cell and growth cone migrations in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Cell**, v. 10, n. 3, p. 367–377, 2006.

PAN, C. L. et al. *C. elegans* AP-2 and Retromer Control Wnt Signaling by Regulating MIG-14/Wntless. **Developmental Cell**, v. 14, n. 1, p. 132–139, 2008.

PETKO, J. et al. MOR Is Not Enough: Identification of Novel  $\mu$ -Opioid Receptor Interacting Proteins Using Traditional and Modified Membrane Yeast Two-Hybrid Screens. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

PETKO, J. et al. Identifying novel members of the Wntless interactome through genetic and candidate gene approaches. **Brain Research Bulletin**, v. 138, n. May, p. 96–105, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.004>>.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>>.

PORT, F.; BASLER, K. Wnt Trafficking: New Insights into Wnt Maturation, Secretion and Spreading. **Traffic**, v. 11, n. 10, p. 1265–1271, 2010.

PRASAD, B. C.; CLARK, S. G. Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*. **Development**, v. 133, n. 9, p. 1757–1766, 2006.

PURRO, S. A. et al. Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: A new role for adenomatous polyposis coli. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 34, p. 8644–8654, 2008.

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

ROSSO, S. B. et al. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 34–42, 2005.

ROSSO, S. B.; INESTROSA, N. C. WNT signalling in neuronal maturation and synaptogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. JUNE, p. 1–11, 2013.

SALIC, A. et al. Control of  $\beta$ -catenin stability: Reconstitution of the cytoplasmic steps of the Wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 523–532, 2000.

SALINAS, P. C.; ZOU, Y. Wnt signaling in neural circuit assembly. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, p. 339–358, 2008.

SHARMA, M. et al. Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. **Cellular Signalling**, v. 47, n. March, p. 52–64, 2018.

STAAL, F. J. T.; LUIS, T. C.; TIEMESSEN, M. M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 8, p. 581–593, 2008.

SVENSSON, C. I.; ZATTONI, M.; SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 245–252, 2007.

SWIEBODA, P. et al. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. **Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM**, v. 1, n. 1, p. 2–7, 2013.

TANAKA, K. et al. The evolutionarily conserved porcupine family is involved in the processing of the Wnt family. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n.

13, p. 4300–4311, 2000.

TANAKA, K.; KITAGAWA, Y.; KADOWAKI, T. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 12816–12823, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M200187200>>.

TANG, S.-J. Synaptic Activity-Regulated Wnt Signaling in Synaptic Plasticity, Glial Function and Chronic Pain. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 13, n. 5, p. 737–744, 2014.

TANG, Y. et al. Wnt Signaling Pathways: A Role in Pain Processing. **NeuroMolecular Medicine**, n. 0123456789, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12017-021-08700-z>>.

VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, n. 4, p. 654–662, 2014. Disponível em: <[https://journals.lww.com/pain/Fulltext/2014/04000/Neuropathic\\_pain\\_in\\_the\\_general\\_population\\_\\_A.4.aspx](https://journals.lww.com/pain/Fulltext/2014/04000/Neuropathic_pain_in_the_general_population__A.4.aspx)>. Acesso em: 19 abr. 2022.

VARELA-NALLAR, L. et al. Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 49, p. 21164–21169, 2010.

W N, D. D.; M D, D. D. The physiology of pain: an update and review of clinical relevance. **Journal of the Ceylon College of Physicians**, v. 46, n. 2, p. 19–23, 2015.

WAYMAN, G. A. et al. Activity-Dependent Dendritic Arborization Mediated by CaM-Kinase I Activation and Enhanced CREB-Dependent Transcription of Wnt-2. **Neuron**, v. 50, n. 6, p. 897–909, 2006.

WELCH, S. P. Interaction of the cannabinoid and opioid systems in the modulation of nociception. **International Review of Psychiatry**, v. 21, n. 2 SPEC. ISS., p. 143–151, 2009.

WILLERT, K. et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 448–452, 2003.

WILLIAMS, A. C. D. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2420–2423, 2016.

XU, Q. et al. Peripheral  $\text{tgf-}\beta\text{1}$  signaling is a critical event in bone cancer-induced hyperalgesia in rodents. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 49, p. 19099–19111, 2013.

XU, Z. et al. TCF4 Mediates the Maintenance of Neuropathic Pain Through

Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Following Peripheral Nerve Injury in Rats. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 56, n. 2, p. 397–408, 2015.

YANG, P. T. et al. Wnt Signaling Requires Retromer-Dependent Recycling of MIG-14/Wntless in Wnt-Producing Cells. **Developmental Cell**, v. 14, n. 1, p. 140–147, 2008.

YU, X.; MALENKA, R. C. B-Catenin Is Critical for Dendritic Morphogenesis. **Nature Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1169–1177, 2003.

YUAN, S.; SHI, Y.; TANG, S. J. Wnt signaling in the pathogenesis of multiple sclerosis-associated chronic pain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 904–913, 2012.

ZAMBELLI, V. O. et al. Peripheral sensitization increases opioid receptor expression and activation by crotalphine in rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M. Wnt signaling in cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 11, p. 1461–1473, 2017.

ZHANG, Y. K. et al. WNT signaling underlies the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 5, p. 2268–2286, 2013.

ZHANG, Z. J.; JIANG, B. C.; GAO, Y. J. Chemokines in neuron–glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 18, p. 3275–3291, 2017.