

Vanessa Pacciari Gutierrez

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

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury

Versão original

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

1.1 Crotalfina

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

Este peptídeo apresenta potente e duradoura atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor aguda e crônica (BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ, V. P. et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012). Na hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂) em ratos, a crotalfina acarreta efeito antinociceptivo, quando administrada em baixas doses (0,008 a 0,2 μ g /kg), pelas vias sistêmica (oral e intravenosa) e subcutânea (intraplantar)

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

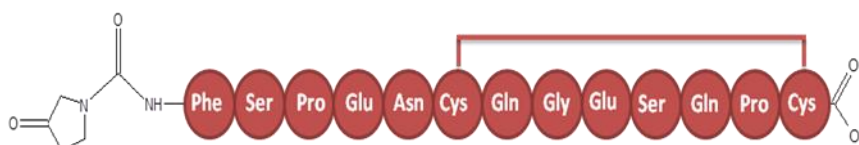
Embora a estrutura química não se assemelhe com nenhum peptídeo opióide conhecido, os estudos realizados pelo nosso grupo indicam que a crotalfina apresenta efeito antinociceptivo do tipo opióide. Esta sugestão está baseada nos resultados experimentais mostrando a reversão do efeito antinociceptivo da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

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

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

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

Figura 1 - Sequência de aminoácidos da Crotalfina



1.2 Neoplasia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Neoplasia Óssea

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Controle da dor neoplásica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Modelos experimentais para indução de neoplasia óssea

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

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

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

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

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

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

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

*

* *

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

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

2 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que:

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

REFERÊNCIAS

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

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- JONGKAMONWIWAT, N. et al. The presence of opioid receptors in rat inner ear. **Hear Res.**, v. 181, n. 1-2, p. 85-93, 2003.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 e.d. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2008.
- KING, T. et al. Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. **Pain**, v. 132, n. 1-2, p. 154-168, 2007.
- KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293-1304, 2008.
- LICATA, A. A. Bisphosphonate therapy. **Am. J. Med. Sci.**, v. 313, n. 1, p. 17-22, 1997.
- LIPTON, A. Biochemical bone markers in breast cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v. 32 Suppl 1, p. 20-22, 2006a.
- LIPTON, A. Future treatment of bone metastases. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 20 p. 6305s-6308s, 2006b.
- LIPTON, A. et al. Advances in treating metastatic bone cancer: summary statement for the First Cambridge Conference. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 20 Pt 2, p. 6209s-6212s, 2006.
- LIPTON, A. et al. Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. **Cancer**, v. 113, n. 1, p. 193-201, 2008.
- LOPEZ-OLIVO, M. A. et al. Bisphosphonates in the treatment of patients with lung cancer and metastatic bone disease: a systematic review and meta-analysis. **Support Care Cancer**, v. 20, n. 11, p. 2985-2998, 2012.
- LOZANO-ONDOUA, A. et al. Disease modification of breast cancer-induced bone remodeling by cannabinoid 2 receptor agonists. **J. Bone Miner Res.**, 2012.
- LUCKMAN, S. P. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. **J. Bone Miner Res.**, v. 13, n. 4, p. 581-589, 1998.
- LUCKMAN, S. P. et al. JBMR anniversary classic. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. Originally published in Volume 7, number 4, pp 581-9 (1998). **J. Bone Miner Res.**, v. 20, n. 7, p. 1265-1274, 2005.
- LUGER, N. M. et al. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 397-406, 2002.

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

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

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

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

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

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