



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA

Neuropharma  
lab 

Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da  
interação farmacológica com receptores opioides e canabinoides da  
protonectina - F

Orientanda: Priscilla Galante Ribeiro

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Renata Mortari

**Brasília - DF, março de 2019.**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**  
**LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA**



**Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da interação farmacológica com receptores opioides e canabinoides da protonectina - F**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

**Priscilla Galante Ribeiro**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Renata Mortari**

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, a minha mãe, aos pacientes que sofrem com dores e a todos os amantes da neurociência.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, meu fiel amigo. “Toda honra e toda glória sejam dadas a ti”
- A minha amada e linda mãe por todo seu suporte e amor. Que sorte eu ser sua filha!;
- A minha família todinha. Amo vocês!;
- A minha linda orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Renata Mortari, uma grandiosa pesquisadora. Agradeço seu suporte, cuidado e ensinamentos!;
- A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Ferroni, sua energia é incrível!;
- Aos meus verdadeiros amigos de fora do laboratório, em especial, Fernanda, Andréia e Júlio. Obrigada pelo apoio e torcida positiva;
- Ao meu incrível grupo de pesquisa do neuropharma lab, em especial Maria, Lilian, Vic, Luana, Kamila, Gabriel, Juju e Ísis. Fazer pesquisas com vocês é um privilégio!;
- Aos queridos técnicos e professores do Departamento de Ciências Fisiológicas- UnB;
- A todos os envolvidos na organização da Semana Nacional do Cérebro;
- Aos técnicos e médico veterinário do Biotério do Instituto de Ciências Biológica - UnB. Uma satisfação trabalhar tantos anos com vocês e os roedores;
- Ao Fundo de Apoio e Amparo à Pesquisa (FAP/DF);
- Aos animais experimentais. Tenho muito respeito por cada vida!;
- A minha banca de defesa que aceitou contribuir com esse trabalho;
- A todos aqueles que lutam pela educação e ciência no Brasil.

## ÍNDICE

Lista de figuras .....	i
Lista de abreviaturas .....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Dor e nocicepção .....	1
1.2 Opioides e antinocicepção .....	6
1.2.1 Receptores opioides .....	8
1.2.2 Opioides endógenos .....	10
1.3 Via canabinoide e antinocicepção.....	12
1.3.1 Receptores canabinoides .....	12
1.3.2 Endocannabinoides .....	14
1.4 Interação entre canabinoide e opioide .....	16
1.5 Desenvolvimento de fármacos de ação antinociceptiva.....	17
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Síntese do peptídeo .....	20
3.2 Bioensaios .....	21

3.2.1 Animais .....	21
3.2.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da protonectina-F por via i.c.v .....	22
3.2.2.1 Implantação da cânula guia no ventrículo lateral cerebral direito .....	22
3.2.3 Estudo do efeito da protonectina-F após a interação farmacológica com antagonistas opioides e canabinoides .....	24
3.2.4 Testes antinociceptivos.....	25
3.2.4.1 Teste da placa quente ( <i>Hot Plate</i> ) .....	25
3.2.4.2 Teste térmico de retirada de cauda ( <i>Tail Flick</i> ).....	26
3.2.4.3 Teste de indução de nocicepção por estímulo químico (formalina 2,5%) .....	28
3.3 Análises macroscópicas da posição da injeção i.c.v.....	29
3.4 Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Análise da pureza do composto .....	31
4.2 Efeito antinociceptivo no teste de nocicepção induzida por formalina .....	32
4.3 Efeito antinociceptivo da protonectina-F por diferentes vias de administração	36
4.3.1 Via de administração intraperitoneal (i.p).....	37
4.3.2 Via de administração subcutânea (s.c) .....	40
4.3.3 Via de administração intranasal (i.n).....	44
4.4 Avaliação do mecanismo de ação da protonectina-F por antagonismo farmacológico.....	45
4.4.1 Antagonismo farmacológico por opioides .....	45

4.4.2 Antagonista de receptor canabinoide CB1.....	48
4.5 Teste de tolerância da protonectina-F.....	51
5. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	

## Lista de figuras

**Figura 1:** Ponto de referência Bregma indicado pela seta vermelha.

**Figura 2:** Análise macroscópica para visualizar o local da injeção e a posição da cânula guia no ventrículo direito com ajuda do corante azul de metileno.

**Figura 3:** O espectro de massa obtido pelo equipamento MALDI/TOF revelou a presença do composto, contendo o íon  $(M+H^+) = 1277.806$  Da. Aquisição do espectro foi obtido no modo refletivo.

**Figura 4:** Sequência do peptídeo protonectina-F pelo método de fragmentação do tipo LIFT no MALDI-TOF/TOF.

**Figura 5:** Atividade antinociceptiva dos tratamentos na fase neurogênica.

**Figura 6:** Atividade antinociceptiva dos tratamentos na fase inflamatória.

**Figura 7:** Índice de antinocicepção (IA) das latências de escape da placa quente após injeção I.P da protonectina-F em camundongos *Swiss*.

**Figura 8:** Índice de antinocicepção (IA) das latências de retirada de cauda após injeção I.P da protonectina-F em camundongos *Swiss*.

**Figura 9:** Índice de antinocicepção (IA) das latências de escape da placa quente após injeção S.C da protonectina-F em camundongos *Swiss*.

**Figura 10:** Índice de antinocicepção (IA) das latências de retirada de cauda após injeção S.C da protonectina-F em camundongos *Swiss*.

**Figura 11:** Índice de antinocicepção (I.A) das latências de placa quente após injeção I.N da protonectina-F em camundongos *Swiss*.

**Figura 12:** Inibição do efeito antinociceptivo da protonectina-F pelo antagonismo farmacológico de receptores opioides pelo cloridrato de naloxona no teste de placa quente após injeção de horário por via i. p da naloxona e por via i.c.v. da protonectina-F em camundongos *Swiss*.

**Figura 13:** Inibição do efeito antinociceptivo da protonectina-F pelo antagonismo farmacológico de receptor canabinoide AM251 no teste de placa quente após infusão de ambos competidores pela via i.c.v em camundongos *Swiss*.



**Figura 14:** Teste de tolerância da protonectina-F (azul) comparado com veículo (preto) e sulfato de morfina (vermelho) durante cinco dias por via de administração i.c.v.

## Lista de abreviaturas

µg: Micrograma

µL: Microlitros

µmol: Micromoles

Δ<sup>9</sup>-THC: delta-9-tetrahydrocannabinol

Δ<sup>9</sup>-THC-*like*: Agonista de delta-9-tetrahydrocannabinol

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

AEA: Anandamida

AINES: Antiinflamatórios não-esteroidais

AMPc: adenosina-monofosfato cíclico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA: *Analysis of Variance* – Análise da Variância

AP: Anteroposterior

APS: *American Physiological Society* - Sociedade de Fisiologia American

A.U.C: *Area Under Curve* – Área sob a curva

Ca<sup>2+</sup>: Íon Cálcio

cAMP: Monofosfato de adenosina cíclico

CB: Canabinoide

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementar

CEUA/IB: Comissão de Ética em Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas

cm: Centímetros

CO<sub>2</sub>: Gás Carbônico

CONCEA: Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal

CPM: Contagens por Minuto

CRE: *cAMP responsive elemento* – Elemento de resposta ao AMPc

DE50: Dose efetiva 50

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucleico

DT50: Dose tóxica média

DV: Dorsoventral

EMA: European Medicines Agency

E.P.M: Erro Padrão da Média

FAAH: Amida hidrolase de ácidos graxos

F.D.A: Food and Drug Administration

FMI: Fundo monetário internacional  
G: Gauge  
GABA: Ácido gama-aminobutírico  
GESEF: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia  
h: hora  
HEK (Células): *Human Embryonic Kidney* – Células humanas embrionárias de rim  
Hot Plate (Teste): Teste da placa quente  
I.A: Índice de antinocicepção  
IASP: *International Association for the Study of Pain* - Associação Internacional para o Estudo da Dor  
ICH: International Conference for Harmonization  
i.c.v: Intracerebroventricular  
i.n: intranasal  
iNOS: Óxido nítrico sintase indutível  
IP<sub>3</sub>: trifosfato inositol  
i.p: intraperitoneal  
i.pl: Intraplantar  
I.T: Índice terapêutico  
JCAHO: *Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organization* - Comissão Conjunta de Acreditação da Organização de Saúde  
K<sup>+</sup>: Potássio  
Kg: Quilograma  
L.A: Latências de antinocicepção  
MALDI TOF-TOF: *Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of flight* –  
E.P.M.: Erro Padrão da Média  
Espectrometria de massa  
MAG lipase: Monoacilglicerol lipase  
MANOVA: *Multivariate Analysis of Variance* – Análise Multivariada da Variância  
MAP: *Mitogen Activated Protein* – Proteína ativada por mitógeno  
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases* – Proteína cinase ativada por mitógeno  
mg: Miligrama  
Milli-Q: Água ultrapura filtrada em sistema Milli-Q  
min: minutos

ML: Meso-lateral  
mL: Mililitro  
mM: Milimolar  
mm: Milímetros  
MS: *mass spectrometry* – Espectrometria de massa  
mV: Milivolts  
n: número de animais por grupo  
NAv: Canais para sódio voltagem-dependentes  
NCI: National Cancer Institute  
NF-κB: Fator de ativação nuclear kappa B  
nM: Nanomolar  
nmoL: Nanomol  
°C: Graus celsius  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
OECD: Organization for Economic Co-operation and Development  
ORL-1: Opioid Receptor-like protein  
PIB: Produto Interno Bruto  
PKA: Proteína quinase A  
PTX: Pertussis Toxina  
rpm: Rotações por minuto  
s.c: subcutânea  
s: segundos  
SBED: Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor  
SCP: Substância cinzenta periaquedutal  
SEIC: Sociedade Espanhola de Investigação sobre Canabinoides  
Tail Flick: Teste de retirada de cauda  
UnB: Universidade de Brasília  
VLD: Ventrículo lateral cerebral direito  
VTA: *Ventral Tegmental area* – Área Tegmental Ventral  
WHO: World Health Organization

## RESUMO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma sensação ou experiência emocional desagradável associada a um dano tissular real ou potencial, ou descritas nos termos deste”. Trata-se de um problema de saúde pública que atinge 60 milhões de brasileiros, segundo dados da Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED) e um terço da população mundial. Esses dados revelaram a necessidade em desenvolver fármacos eficazes e com reduzidos efeitos adversos para o manejo adequado de pacientes com dor. Com isso, visando o desenho de um novo composto neuroativo, um peptídeo denominado protonectina-F foi bioinspirado a partir de um outro peptídeo isolado da vespa *Parachartergus fraternus*. No ensaio *in vivo* de placa quente quando administrado por via i.c.v, a protonectina-F mostrou uma atividade antinociceptiva comparável ao sulfato de morfina, além de apresentar menor déficit motor no teste de ataxia (modelo *rotarod*). Contudo, para testar a ação do protonectina-F em nocicepção de natureza contínua, foi utilizado o teste bifásico de estímulo químico, por apresentar características mais próximas às dores crônicas. Neste ensaio de antinocicepção induzido por formalina (i.pl), a protonectina-F 20µg/animal (i.c.v) mostrou uma atividade semelhante ao sulfato de morfina na fase neurogênica (i.c.v) (10 min iniciais), mas não na segunda fase do teste. Neste trabalho a protonectina-F também foi avaliada em diferentes vias de administração (i.n, s.c e i.p). Até agora foi observado que a protonectina-F 20 mg/Kg em administração i.p apresentou atividade antinociceptiva aos 60min de teste, porém não comparável ao sulfato de morfina 20 mg/Kg. Além disso, foram realizados dois ensaios para avaliar o mecanismo de ação por antagonismo farmacológico *in vivo*. O primeiro teste foi realizado com o antagonista opioide não-seletivo, cloridrato de naloxona (4mg/Kg) administrado por via i.p enquanto protonectina-F e morfina foram infundidas por via i.c.v (ambas a 20µg/animal). Nesse ensaio protonectina-F apresentou um efeito inibitório da atividade antinociceptiva no teste de placa quente durante os 240min, assim como o sulfato de morfina. No teste realizado com o antagonista de receptor canabinoide CB1, AM251, foi observada uma ação inibitória do índice antinociceptivo no teste de placa quente a partir de 120 min pós-infusão. Para avaliar o efeito antinociceptivo da protonectina-F após múltiplas administrações, foi realizado um teste de tolerância aguda. Camundongos *swiss* foram submetidos ao teste de placa quente nos tempos

de 30,60,90 e 120 min durante 05 dias, contudo foi escolhido o tempo de 120min por ser o tempo de efeito antinociceptivo máximo apresentado pelo peptídeo. O resultado entre sulfato de morfina e protonectina-F divergiu a partir do terceiro dia de teste, já que a protonectina- F preservou sua atividade antinociceptiva, apresentando diferença significativa em relação ao veículo. Os resultados gerados nesse trabalho mostram que a protonectina-F tem o potencial de contribuir no desenvolvimento de fármacos mais adequados e eficazes no manejo da dor.

Palavras-chaves: Antinocicepção, dor, receptor canabinoide, receptor opioide, teste agudo de tolerância, peptídeo de vespa, protonectina-F

## ABSTRACT

According to the the International Association for the Study of Pain (IASP), pain can be defined as a “unpleasant sensation of emotional experience associated with real or potential tissue damage”. It is public health issue that affects 60 million brazilians, according data from the Brazilian Society for the Study of Pain and one third of the world population. These data revealed the need to develop new drugs with and without adverse effects for the proper management of patients. Thus, in order to design a new neuroactive compound, a peptide called protonectin-F was bioinspired for another peptide of the *Parachartergus fraternus* wasp. In the in vivo hot plate assay when administered via icv, protonectin-F showed antinociceptive activity comparable to morphine sulfate, in addition to having a lower motor deficit in the ataxia test (*rotarod* model). However, to test the action of protonectin-F on nociception of a continuous nature, the biphasic chemical stimulus test was used, because it presented features closer to chronic pain. In the formalin-induced antinociception assay (i.pl), protonectin-F 20µg / animal (icv) showed similar morphine sulfate activity in the neurogenic phase (icv) (initial 10 min), but not in the second phase of the test. In this work, protonectin-F was also evaluated in different administration routes (i.n, s.c and i.p). Up to now it has been observed that protonectin-F 20 mg / kg in i.p. administration had antinociceptive activity at 60 min of test, but not comparable to 20 mg / kg of morphine sulfate. In addition, two trials were conducted to evaluate the mechanism of action by pharmacological antagonism in vivo. The first test was performed with the non-selective opioid antagonist, naloxone hydrochloride (4mg / kg) administered i.p. whereas protonectin-F and morphine were infused via i.c.v (both at 20µg / animal). In this test, F-protonectin exhibited an inhibitory effect of antinociceptive activity on the hot plate test during 240min, as well as morphine sulfate. In the test performed with

the cannabinoid receptor antagonist CB1, AM251, an inhibitory action of the antinociceptive index was observed in the hot plate test after 120 min after infusion. To evaluate the antinociceptive effect of protonectin-F after multiple administrations, an acute tolerance test was performed. Swiss mice were submitted to the hot plate test at 30, 60, 90 and 120 min for 5 days, however the time of 120 min was chosen because it is the time of maximum antinociceptive effect presented by the peptide. The result between morphine sulfate and protonectin-F diverged from the third day of the test, since protonectin-F preserved its antinociceptive activity, presenting a significant difference in relation to the vehicle. The results generated in this work show that protonectin-F has the potential to contribute to the development of drugs that are more adequate and effective in the management of pain.

Key-words: Antinociception, pain, cannabinoid receptor, opioid receptor, acute tolerance test, wasp peptide, protonectin-F



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dor e nocicepção

A dor é um complexo evento multidimensional associado a uma resposta de proteção do organismo na presença de estímulos lesivos advindos do meio externo ou do próprio organismo, podendo estar diretamente ou indiretamente associada a uma desordem neurológica (Azevedo, 2003). Devido à subjetividade ao relatar a dor, por estar relacionada a componentes afetivos, experiências vivenciadas individualmente (componente comportamental), além do componente cognitivo ligado a crenças, culturas e espiritualidades (OMS, 2012), há a preocupação em avaliar a intensidade da dor descrita por cada paciente de forma individualizada e criteriosa, particularmente naqueles incapazes de relatar suas experiências dolorosas vivenciadas, tendo como exemplos neonatos e crianças. Assim sendo, a dificuldade apresentada por alguns indivíduos em expressar sua experiência dolorosa não pode ser um fator limitante para que estes recebam tratamento de alívio adequado (Aydede, 2017).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma sensação ou experiência emocional desagradável associada a um dano tissular real ou potencial, ou descritas nos termos deste”. Essa definição permite associar a dor a uma valência hedônica no aspecto afetivo-emocional, indo além da dimensão sensorial-discriminativa seus episódios álgicos (Aydede, 2017). Atualmente há grupos de estudos que se esforçam em aprimorar essa última definição de dor devido à complexidade de eventos envolvidos e a necessidade de cientistas e clínicos conduzirem apropriadamente suas condutas e estudos da área.

Além disso, a Sociedade Americana de Anestesiologia ampliou esta definição abrangendo a dor peri-operatória como “dor que está presente no paciente cirúrgico devido à doença pré-existente ao procedimento cirúrgico ou à combinação de ambos”. Em janeiro de 2002, a JCAHO (*Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organization*) estabeleceu o conceito de avaliação regular da dor como sendo o quinto sinal vital, devendo inclusive ser avaliado pós-nascimento. Esta publicação gerou um grande impacto já que a JCAHO é aprovada por 80% dos hospitais americanos, os quais respondem por 96% das internações naquele país. Desde então, a maioria dos países utiliza a dor como quinto sinal vital (Sousa, 2002).

No estudo com animais, por não ser possível a verbalização, a dor é definida como: “uma experiência sensorial aversiva causada por uma injúria potencial ou real que provoca reações vegetativas e motoras protetoras. Resulta em aversão aprendida e pode modificar comportamentos específicos da espécie, incluindo comportamento social” (Kavaliers, 1988a). Sendo assim, termos como dor e analgesia são adotados para humanos e os termos nocicepção e antinocicepção, para modelos animais (Jones, 1992).

Em uma visão abrangente e em condições de normalidade, a nocicepção relaciona-se à ação de fibras nervosas aferentes primárias de menores diâmetros dos nervos periféricos (Raja *et al.*, 1999), que possuem terminações sensitivas nos tecidos periféricos e que são acionados por estímulos químicos, mecânicos e térmicos (Julius & McCleskey, 2006; Julius & Basbaum, 2001). Nociceptores são terminações nervosas não encapsuladas (livres) de alto limiar de excitabilidade, ativados por estímulos de grandeza nociceptiva, ou, quando previamente sensibilizados são ativados por estímulos regulares.

Ainda não há um consenso internacional nos sistemas de classificação da dor. Este cuidado especial se dá ao fato de que a categorização determina a conduta clínica ao paciente. Há quatro sistemas mais utilizados os quais são alicerçados nos mecanismos patofisiológicos (dor nociceptiva e neuropática), na etiologia (maligna e não-maligna), na localização anatômica da dor, bem como em sua duração (aguda e crônica) (OMS, 2012; Monge-Fuentes, 2018), os quais serão detalhados a seguir:

As dores agudas e crônicas envolvem diferentes mecanismos celulares, receptores e vias ascendentes. A dor aguda ou rápida possui um propósito definido que é servir de alerta à ocorrência de lesões de origem inflamatória ou traumática. Geralmente é oriunda da ativação da nociceptores ou ainda devido à hipoativação do mecanismo de supressão da dor, sendo que ambos podem estar vinculados. Essa rápida resposta se dá ao fato desses estímulos se propagarem por finas fibras mielinizadas do tipo A delta. Neste caso, o tratamento deve ser diretamente vinculado ao fator causal, e sua resolução geralmente finaliza o quadro doloroso queixado pelo paciente. O quadro de dor aguda também pode originar-se de um quadro de dor crônica em fase de exacerbação.

Por sua vez, quando estados de hiperexcitabilidades persistentes e repetidos levam a uma plasticidade neuronal em que mesmo na ausência do estímulo lesivo há a presença desse quadro algico, trata-se da doença dor crônica. A dor crônica ou lenta não apresenta uma relação causa-efeito específica. Trata-se de um quadro complexo e contínuo, gradativamente incapacitante mesmo na ausência de uma lesão real que a justifique. Esses repetitivos sinais dolorosos levam a alterações eletroquímicas nos circuitos neurológicos, tornando-os hipersensíveis aos estímulos e menos reativos aos mecanismos inibitórios da algesia. Apesar da convenção temporal de três meses, o

que de fato distingue a dor crônica da dor aguda é a incapacitação do Sistema Nervoso em restabelecer os níveis de homeostase adequados (Loeser e Mezack, 1999).

A dor crônica representa por si só uma doença, com etiologia, mecanismos, sintomatologia, condutas diagnósticas e terapêuticas diferentes da dor aguda (Turk & Okifugi, 2002). Portanto, esta refere-se a um problema de saúde pública que atinge 60 milhões de brasileiros, segundo dados da Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED) e um terço da população mundial. Segundo Gaskin & Richard (2012) o impacto desta patologia na economia norte americana, incluindo custos para o sistema de saúde e absenteísmo de pacientes e acompanhantes, atingem a ordem de US\$ 630 bilhões/ano. Este valor supera a somatória dos Produtos Internos Brutos (PIB) dos países membros plenos do Mercosul (Argentina, Uruguai e Paraguai), os quais atingem a importância US\$ 431 bilhões (dados de 2010 – FMI). Além disso, o gasto com o manejo e tratamento da dor na economia norte americana mostrou-se maior do que os gastos associados ao câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (Henschke *et al*, 2015; Gaskin & Richard, 2012). A grandeza destes números reforça a necessidade de investimento em pesquisa e treinamento dos profissionais de saúde visando a prevenção e tratamento adequados da dor (Gaskin & Richard, 2012). O tratamento da dor crônica é um direito humano fundamental. A declaração de Montreal, baseada nos princípios da Organização Mundial da Saúde (OMS), afirma que todos aqueles que padecem de dor tem garantido seu direito ao acesso ao tratamento da dor. Pacientes com essa doença apresentam um comprometimento biopsicossocial.

O manejo da dor continua sendo um desafio em clínicas médicas e hospitais. Em 1986, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou uma conduta para o manejo terapêutico de dor em pacientes com câncer na forma de uma escala de analgesia, denominada "Pain Ladder". Essa escada da dor foi revisada em 1997 e posteriormente adaptada para o manejo de dor aguda e crônica (Vargas-Schaffer, 2010). A escada leva em conta cinco princípios: priorizar a forma de administração oral; a administração deve ocorrer em intervalos regulares e não por demanda; o tratamento deve levar em conta a percepção de dor do paciente; a dosagem deve ser adaptada individualmente e, finalmente, uma programação diária detalhada do tratamento deve ser seguida. Os tratamentos se diferenciam conforme a intensidade do quadro algico apresentado pelo paciente (Wiermann *et al.*, 2014). Além disso, o mecanismo fisiopatológico da dor (nociceptiva ou neuropática) é levado em consideração para definir a conduta terapêutica. Dores não severas são tratadas com medicamentos não-opioides, como inibidores de cicloxigenase-2, antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) e esteroidais (corticoides), associados ou não ao uso de adjuvantes (antidepressivos e anticonvulsivantes). Na persistência ou aumento da intensidade da dor, utiliza-se opioides fracos, como por exemplo tramadol e codeína, também associados ou não a adjuvantes e não-opioides. Em casos de dor crônica, como portadores de dor neuropática, os quais 30% a 50% não apresentam uma melhora clínica significativa (Ruviaro & Filippin, 2012; Sindrup & Jensen, 1999) os opioides leves podem ser substituídos por opioides fortes (por exemplos: oxicodona e morfina).

Nesse procedimento de manejo da dor, percebe-se um papel proeminente de opioides e seus derivados. Opioides tem como característica seu alto poder analgésico, podendo durar de 4 à 6h, além do seu baixo custo. No caso de dor

crônica, não há uma dose ótima ou limite definida. A necessidade de doses crescentes para a manutenção do efeito analgésico ou a diminuição do efeito das doses mantidas constantes pode levar a um quadro clínico de tolerância. Ainda não há certeza de porque o organismo tolerante apresente uma resposta medicamentosa reduzida, mas acredita-se que a constante oferta de agonistas opioides ao receptor desencadeie algumas alterações adaptativas, como a dessensibilização dos receptores acoplados à proteína-G, fosforilação dos receptores metabotrópicos e subsequente ligação das proteínas reguladoras  $\beta$ -arrestina (Bohn, 2000). Alguns efeitos periféricos adversos regularmente relatados com o uso de opioides são constipação intestinal, retenção urinária e prurido. Já os efeitos relacionados ao Sistema Nervoso Central são sedação, depressão respiratória, arritmia cardíaca, hipotensão, miose e dependência, dentre outros (Al-Hasani, 2011).

## 1.2 Opioides e antinocicepção

Opioide é um termo que se refere tanto a compostos derivados do ópio, substância extraída da planta *Papaver somniferum* (conhecidos como opiáceos) quanto a substâncias que interagem no receptor opioide. Estes opioides podem ser divididos quanto à sua origem: endógenos (produzidos pelo próprio corpo), naturais (encontrados na natureza, por exemplo em plantas, como a papoula) e sintéticos/semissintéticos (Pathan & Williams, 2012). Os fármacos sintéticos ou naturais derivados do ópio, têm sido amplamente utilizados nos tratamentos contra a dor.

Há séculos que o homem descobriu as propriedades de alívio da dor provocada pelo ópio, o extrato produzido a partir da seiva da flor da papoula. No entanto, somente

no século 19, as substâncias desse extrato foram identificadas, sendo as principais a morfina e a codeína, o que intensificou o seu uso médico. Na década de 70, descobriu-se que o organismo tem um sistema opioide endógeno. Este sistema possui neuropeptídeos (endorfinas) que ativam receptores opioides produzindo um potente efeito analgésico endógeno (Snyder & Pasternak, 2003). Evolutivamente, esse sistema tem a função de modular a resposta à dor, permitindo que o organismo funcione adequadamente em momentos de estresse (Pasternak & Pan, 2013).

Além de analgesia, os opioides provocam uma sensação de euforia, relaxamento, estados hipnóticos, o que frequentemente tem levado ao uso recreativo, como exemplos o uso da heroína e morfina. O bem-estar é provocado pela ativação do sistema de recompensa no cérebro, o sistema límbico e o córtex frontal, através da ativação de neurônios dopaminérgicos (Pasternak & Pan, 2013). Essa atividade os torna propensos a adicção, um dos principais efeitos adversos dos opioides, e tem estimulado a pesquisa em busca de novas alternativas sintéticas e semissintéticas sem este efeito indesejado (Ballantyne & Sullivan, 2017). No entanto, todos os produtos clínicos já testados produziram efeitos de dependência similares. Apesar disso, o incentivo à pesquisa nessa área levou à descoberta de vários antagonistas seletivos de receptores opioides (redução dos efeitos adversos pelo aumento de seletividade) para uso em conjunto com os opioides, o que tem ampliado as alternativas para o manejo da dor (Snyder & Pasternak, 2003).

Contudo, de acordo com a Comissão Internacional de Controle de Narcóticos há aproximadamente 5,5 bilhões de pessoas com acesso restrito ou sem acesso a medicamentos analgésicos, como a morfina ou codeína (Bourzac *et al.*, 2017), expondo uma necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais acessíveis.

Por outro lado, os Estados Unidos da América (E.U.A), uma grande potência econômica mundial em que a população tem acesso aos fármacos de última geração, investem milhões de dólares em pesquisa na busca por medicamentos potentes como os opioides, porém que apresentem reduzidos efeitos como tolerância e dependência. Os E.U.A continuam com uma epidemia por opioides, o que levou o seu governo a declarar este problema nacional como emergência na saúde pública. Estima-se que no durante o ano de 2017, mais americanos tenham morrido por overdose de opioides do que em toda a guerra do Vietnã (Rasmussen *et al.*, 2019). Outro dado alarmante é que segundo o Instituto Nacional sobre Abuso de Drogas (da sigla em inglês NIDA) aproximadamente 80% dos casos que fizeram uso de heroína, inicialmente utilizaram opioides com prescrição médica. Com isso, há um esforço especializado na tentativa de desenvolver uma farmacoterapia segura e eficaz. Foram submetidos como prioridade ao FDA, que corresponde a ANVISA no Brasil, novos medicamentos tendo como alvos farmacológicos o tratamento da overdose, visando aprimorar as limitações encontradas com uso contínuo de alguns antagonistas como cloridrato de naloxona, por exemplo (Rasmussen *et al.*, 2019). Outra frente de pesquisa em que está sendo investido milhões de dólares é no desenvolvimento de terapias com fármacos opioides de menores riscos à saúde, além dos econômicos e sociais.

### 1.2.1 Receptores opioides

O mecanismo de ação de opioides ocorre através da interação de agonistas ou antagonistas de natureza sintética, endógena ou natural, que se ligam aos receptores opioides, classificados em  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$  e ORL-1 (Martins *et al.*, 2012; Waldhoer *et al.*, 2004; Dhawan *et al.*, 1996). Os receptores opioides envolvidos com a



antinocicepção estão acoplados a proteína Gi e apresentam em sua estrutura sete domínios transmembrânicos, sendo que a região C-terminal está localizada na região intracelular e a região N-terminal localizada na parte externa da célula, apresentando diversos pontos de glicosilação (Law *et al.*, 2000). Os receptores são bastante conservados em sua estrutura primária, entre eles,  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  apresentam 60% de similaridade, sendo o domínio transmembrânico e alças celulares os que apresentam maior homologia entre eles (73-76% e 86-100%, respectivamente) (Chen *et al.*, 1993). Contudo, nem todos os receptores opioides descobertos estão relacionados à analgesia, como por exemplo o  $\zeta$ , envolvido em controle de síntese de DNA no tecido epitelial (Zagon *et al.*, 1996).

Em relação à transdução de sinais, os receptores opioides ativados reduzem os níveis de 3'5' adenosina-monofosfato cíclico (AMPc), através da inibição da enzima adenilato ciclase (Sharma *et al.*, 1977), resultando na inibição das correntes dos canais para cálcio voltagem dependentes dos tipos P/Q e N (Rhim & Miller, 1994; Hescheler *et al.*, 1987), levando a inativação do influxo de cálcio extracelular. Além disso, este evento estimula a ativação dos canais para potássio, hiperpolarizando o neurônio pós-sináptico (North *et al.*, 1987). Em 1996, Li & Chang demonstraram que esses receptores também regulam a cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK). Estes mecanismos descritos levam à redução da excitabilidade celular, reduzindo a liberação de neurotransmissores inibitórios GABA, o que eleva a concentração de dopamina, associado a um quadro de analgesia.

### 1.2.2 Opioides endógenos

As vias opioides endógenas têm o objetivo de modular a dor em condições de estresse, particularmente quando há uma situação de risco à sobrevivência. Vias endógenas são compostas por neuropeptídeos opioides e seus respectivos receptores. Neuropeptídeos opioides são coletivamente conhecidos por endorfinas, uma contração das palavras morfina endógena. São três classes de endorfinas: encefalinas, dinorfinas e  $\beta$ -endorfinas (Pasternak & Pan, 2013). Estruturalmente os neuropeptídeos opioides possuem a sequência N-terminal: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (YGGFL) ou Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (YGGFM) e são derivados de propeptídeos que são processados para gerar sua forma madura (Hook *et al.*, 2008). Seu mecanismo de ação depende da interação com receptores opioides. As três classes de endorfinas interagem com diferentes classes de receptores. Em termos gerais, as encefalinas interagem com receptores  $\delta$ , dinorfinas com  $\kappa$  e  $\beta$ -endorfinas com receptores  $\mu$ , embora há exceções descritas, como a ligação de dinorfinas a receptores  $\kappa$  e  $\beta$  - endorfinas a receptores  $\delta$  (Pasternak & Pan, 2013).

A ativação dessa via analgésica endógena ocorre no córtex e hipotálamo, que se comunicam com o tronco encefálico, particularmente, com o mesencéfalo, onde há a presença de substância cinzenta periaquedutal (SCP). Essa região é essencial para a modulação da nocicepção no organismo. Em ratos, o estímulo elétrico da SCP causa a insensibilidade a nocicepção nos animais demonstrando a importância dessa região na modulação nociceptiva (Snyder & Pasternak, 2003). Neurônios da SCP levam os estímulos aos núcleos da rafe que, posteriormente, são conduzidos pela via antinociceptiva descendente através do trato dorsolateral. A partir do trato dorsolateral, projeções de neurônios da via descendente interagem com a sinapse

entre as fibras C, A $\delta$  e o neurônio de 2ª ordem da via ascendente no corno posterior da medula. As projeções neuroniais da via descendente contêm neuropeptídeos opioides endógenos (endorfinas e encefalinas) que se ligam a receptores opioides presentes nas terminações pré e pós-sinápticas dos neurônios da via ascendente de condução do estímulo da nocicepção (Ballantyne & Sullivan, 2017). A interação entre neuropeptídeos endógenos e receptores opioides inibem a liberação de substância P e glutamato, que são os neurotransmissores responsáveis pela condução do estímulo nociceptivo. Portanto, o estímulo endógeno de modulação nociceptiva se origina no sistema nervoso central para atenuar a percepção de nocicepção.

A serotonina e a noradrenalina desempenham um papel importante no estímulo da via endógena de antinocicepção. A SCP possui neurônios encefalinérgicos que estimulam neurônios serotoninérgicos presentes nos núcleos da rafe. A liberação de serotonina ativa neurônios da via descendente a liberarem encefalinas na região da sinapse na medula, inibindo a condução do estímulo nociceptivo pela via ascendente (Ballantyne & Sullivan, 2017). De maneira indireta, o sistema opioide endógeno suprime a inibição de dopamina por GABA na área tegmental ventral (VTA, da sigla em inglês), aumentando os níveis de dopamina no complexo amigdalóide e no núcleo accumbens que compõem o sistema de recompensa mesolímbico, integrando os sinais nociceptivos como também o de recompensa (Ballantyne & Sullivan, 2017). Dessa maneira, o organismo leva em consideração as informações integradas que modulam os comportamentos relativos ao limite do limiar de dor aceitável para se obter recompensa (Ballantyne & Sullivan, 2017).

### 1.3 Via canabinoide e antinocicepção

Em 1964, Gaoni e Mechoulam iniciaram os estudos farmacológicos dos canabinoides ao descobrirem e isolarem o fitocanabinoide delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), o principal composto químico derivado da planta *Cannabis sativa*, que apresentou propriedades psicoativas aptas a atuarem em receptores canabinoides. Contudo, à época, ainda não era esclarecido o mecanismo de ação envolvido. Inicialmente, acreditava-se que suas atividades ocorriam devido a interações e modificações com as membranas lipídicas (Gill, 1976). A partir dessa molécula, compostos análogos clássicos (dibenzopirenos tricíclicos, exemplo: agonista  $\Delta^9$ -THC, não clássicos (análogos bicíclicos e tricíclicos do  $\Delta^9$ -THC, exemplo: CP55,940) e aminoalquilindóis (Exemplo: WIN 55212,2, derivado da pravadolina, um inibidor da cicloxigenase) foram sintetizados e avaliados em diferentes modelos animais comportamentais, que incluíram testes de antinocicepção, de resposta inflamatória e de déficits de memória e aprendizagem (Pacher *et al.*, 2006, Howlett *et al.*, 2004, Howlett *et al.*, 2002).

#### 1.3.1 Receptores canabinoides

Estudos utilizando a técnica de ligação competitiva com receptores (*Binding*) revelaram a existência de receptores canabinoides pelo uso do análogo sintético radiomarcado [ $^3$ H]CP-55,940, que demonstrou alta afinidade, saturação e a estereoespecificidade de sítios de ligação em membranas plasmáticas de cérebros de ratos (Devane *et al.*, 1988). Este fato corroborou com os resultados encontrados da inibição da adenilato ciclase nos testes *in vitro*, bem como com sua atividade analgésica observada nos ensaios *in vivo* (Devane *et al.*, 1988). Com o progressivo interesse pelo

assunto, deu-se continuidade nos estudos, o qual um deles sugeriu uma atividade dos canabinoides nas áreas ligadas à cognição e ao movimento pela descoberta de que os sítios com alta afinidade para [<sup>3</sup>H]CP-55,940 eram mais recorrentes no cerebelo, formação hipocampal e núcleos da base (Herkenham *et al.*, 1990).

Ainda na década de 1990, Matsuda e colaboradores realizaram a descoberta do primeiro receptor canabinoide, denominado CB<sub>1</sub>, o qual foi clonado a partir de uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) de tronco encefálico humano. Posteriormente, foi identificado o receptor CB<sub>2</sub> por homologia de sequências (Munro *et al.*, 1993). Esses resultados foram de grande relevância por esclarecerem o alvo do Δ<sup>9</sup>-THC (um agonista parcial de CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>), bem como despertaram o interesse no desenvolvimento de agonistas e antagonistas canabinoides seletivos que são foco para a terapêutica de diversas doenças (Baker, *et al.*, 2003).

A constante investigação farmacológica resulta de um interesse em se encontrar novas famílias de analgésicos que causem nenhum ou mínimos efeitos indesejáveis e apresente potência relevante (SEIC, 2013). Desta forma, os canabinoides apresentaram-se como um novo sistema de neuromodulação central e periférico, devido a seus receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, além de seus análogos serem comparados a ação analgésica dos opiáceos. A atividade antinociceptiva dos canabinoides está associada a receptores do tipo canabinoide ou do tipo não canabinoide (vaniloide) (Pertwee, 2001).

Os receptores CB<sub>1</sub> são os principais sítios de ação para o controle da nocicepção com o uso de endocanabinoides ou canabinoides exógenos *in vivo* (Agarwal *et al.*, 2007). Estes são amplamente expressos no Sistema Nervoso Central

(Herkenham, *et al.*, 1990; Hohmann, *et al.*, 1999), bem como Sistema Nervoso Periférico (Fox *et al.*, 2001). No entanto, duas variantes já foram encontradas com modificações na porção N-terminal de suas cadeias polipeptídicas; o CB<sub>1A</sub> em 1995 por Shire e colaboradores e o CB<sub>1B</sub> em 2005 por Ryberg e colaboradores. Já os receptores do tipo CB<sub>2</sub> são encontrados nas células do sistema imune e em tecidos linfoides. Estes atuam mediando processos inflamatórios e na modulação antinociceptiva (Mackie, 2006). Tanto os receptores dos tipos CB<sub>1</sub> como os do tipo CB<sub>2</sub> são acoplados a proteína G $\alpha$ , ou seja, são receptores metabotrópicos, mas apresentam baixo grau de homologia entre suas sequências (Starowicz *et al.*, 2013; Lutz, 2002). Apesar de já ter sido relatado que a ativação dos receptores canabinoides estimulem as isoformas 2, 4 e 7 da adenilato ciclase, de maneira geral, ocorre uma resposta antagônica à ativação desta relatada (Rhee *et al.*, 1998). Geralmente, a ativação dos receptores canabinoides geram uma resposta de inativação da atividade enzimática da adenilato ciclase.

### 1.3.2 Endocanabinoides

A descoberta de receptores canabinoides incentivaram a busca por ligantes endógenos. Os endocanabinoides, como foram denominados, são moléculas lipídicas derivadas do ácido araquidônico e que se ligam a receptores canabinoides localizados no Sistema Nervoso Central e Periférico, capazes de modularem funções fisiológicas e comportamentais por ativarem algumas vias de sinalizações intracelulares (Felder *et al.*, 2006), além de serem secretados por diversos outros tipos celulares (Petrocellis *et al.*, 2004). Estes não são armazenados em vesículas nas células e sim sintetizados sob demanda em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos, ativando os receptores CB ao serem liberados pelos neurônios pós-sinápticos e que inibem a

liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos (Saito *et al.*, 2010). O estímulo fisiológico acima citado ocorre pela despolarização induzida pelo aumento da concentração de cálcio intracelular ou ativando receptores ligados a proteína G (metabotrópicos) (Di *et al.*, 2005; Witting *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002; Varma *et al.*, 2001).

O primeiro agonista de receptores CB identificado foi o endocanabinoide N-araquidonoil etanolamina denominada de anandamida (AEA), palavra que deriva do sânscrito *ananda* que significa “bem-aventurança” (Devane *et al.*, 1992). Di Marzo e colaboradores (1994) conseguiram elucidar uma única via metabólica para este composto e também demonstraram a sua liberação *in vivo* no cérebro. Em relação à atividade de comunicação neuronal, a anandamida apresenta afinidades com os eicosanoides, moléculas com 20 carbonos derivadas dos ácidos araquidônico e graxo, que estão envolvidas nos processos imunológicos, inflamatórios e, em especial, na dor (Di Marzo *et al.*, 1994). O segundo endocanabinoides identificado foi o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995), um éster de ácido graxo gerado a partir da remoção do inositol devido a ação da Fosfolipase C (Piomelli, 2003). Seu mecanismo de ação intracelular quando mediado por receptores canabinoides se baseia a partir da interação com o trifosfato inositol (IP<sub>3</sub>) e com o AMP cíclico (cAMP). Este, mediado principalmente pelo receptor CB<sub>1</sub>, ativa a liberação intracelular do íon cálcio (Ca<sup>2+</sup>) do Retículo Endoplasmático. Já a ativação de receptores CB<sub>2</sub> podem causar uma inibição do cAMP, fazendo com o que o 2-AG iniba ativação de MAPK (proteína quinase) ativada por mitógeno, inibindo ativação de fatores relacionados à proliferação celular. Além disso, a inibição do cAMP também leva a inibição da ativação de PKA (proteína quinase A) e consequentemente ativação

de CRE (elemento de ligação responsivo ao cAMP), NF- $\kappa$ B (fator de ativação nuclear  $\kappa$ B) e iNOS (óxido nítrico sintase indutível) (Di Marzo *et al.*, 1998). Embora ainda se desconheça a relevância fisiológica, os 2-AG encontram-se em maiores concentrações no cérebro. Com isso, ampliou-se o interesse e o estudo por novos compostos bioativos extraídos de tecidos animais, como a N-araquidonoildopamina, o éter de noladina, a virodamina (Huang *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2002; Hanuš *et al.*, 2001; Mechoulam *et al.*, 1995), bem como por composto quimicamente sintetizadas. Ambos são inativados pelo processo de recaptação pelos neurônios, metabolizados e hidrolizados pela FAAH (amida hidrolase de ácidos graxos) e pelo MAG lipase (monoacilglicerol lipase), respectivamente.

#### 1.4 Interação entre canabinoide e opioide

Entre as drogas de abuso mais consumidas encontram-se os opioides e os canabinoides. Ambas compartilham alguns efeitos, como hipotensão, hipotermia, sedação, inibição da motilidade intestinal e motora. Além disso, já foram relatadas as existências de tolerância cruzada e potenciação mútua (Manzanares *et al.*, 1999). Sendo assim, a interação mais importante descoberta até hoje foi na antinocicepção. Vários estudos sugeriram a existência de mecanismos opioides e canabinoides independentes, porém correlacionados ao gerar uma resposta antinociceptiva. Esta hipótese é alicerçada na informação de que antagonistas de receptores opioides poderiam bloquear a ação antinociceptiva induzida por canabinoides (Manzanares *et al.*, 1999). Outro fator relevante, é em relação a via de administração em que os fármacos serão ofertados ao paciente. Já é sabido que ocorre uma potenciação quando há a administração por vias i.c.v e intradural, por exemplo (Pertwee, 2001).



### 1.5 Desenvolvimento de fármacos de ação antinociceptiva

Diante do exposto, há uma crescente necessidade de novos fármacos com alta eficácia e reduzidos efeitos adversos para o tratamento da dor crônica. Neste contexto, a peçonha de artrópodes tem se apresentado como uma plataforma rica e eficaz para o desenho de novos compostos neuroativos (Mortari & Cunha, 2013, Silva *et al.*, 2015), uma vez que cada peçonha contém entre 100 e 150 compostos bioativos. Seguindo essa premissa, Galante (2014) identificou um peptídeo bastante promissor, isolado da vespa *Parachartergus fraternus*, o qual foi utilizado como modelo para o desenho de um novo composto antinociceptivo, denominado protonectina-F. Este novo peptídeo bioinspirado foi foco de uma tecnologia inovadora que foi patenteada pela UnB e está sendo licenciado para uma empresa de biotecnologia (Biointech®). Nos testes comparativos com o sulfato de morfina, a protonectina-F, quando injetado por via intracerebroventricular (i.c.v), mostrou-se equivalente ao sulfato de morfina na atividade antinociceptiva, apresentando menor déficit motor (teste de ataxia). Os testes para a avaliação do efeito antinociceptivo foram realizados com estímulos térmicos, ou seja, de natureza transiente. No entanto, para testar a ação do protonectina-F em nocicepção de natureza contínua, foi utilizado um modelo diversificado, o teste bifásico de estímulo químico, que sabidamente apresenta características mais próximas às dores crônicas (Alreja *et al.*, 1984; Abbott *et al.*, 1982; Dubuisson e Dennis, 1977).

Assim sendo, as etapas de desenvolvimento de novos fármacos analgésicos ou para o estudo da antinocicepção pretendidas neste estudo requereram a avaliação de diferentes vias de administração, bem como a identificação do mecanismo de ação

*in vivo*. Ambas informações são relevantes na determinação da viabilidade comercial de potenciais produtos em desenvolvimento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O enfoque deste projeto foi avaliar o mecanismo de ação da protonectina-F, assim como estudar o efeito antinociceptivo por diferentes vias de administração.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia antinociceptiva do peptídeo sintético administrado por via intranasal (i.n), intraperitoneal (i.p) e subcutânea (s.c), utilizando modelos animais (camundongos *Swiss*) de indução de dor aguda por estimulação térmica (*hot plate e tail flick*);
- Avaliar o mecanismo de ação da protonectina-F em testes de interação farmacológica *in vivo*, utilizando antagonistas de receptores opioides (cloridrato de naloxona);
- Avaliar o mecanismo de ação da protonectina-F em testes de interação farmacológica *in vivo*, utilizando antagonista de receptor seletivo canabinoide CB1 (AM251);
- Avaliar a ação da protonectina-F nas fases neurogênica e inflamatória no teste de indução de nocicepção por estímulo químico (formalina 2,5%);
- Avaliar a tolerância gerada pela protonectina-F em relação a morfina, ambos administrados por via intracerebroventricular (i.c.v), utilizando modelos animais (camundongos *Swiss*) de indução de dor aguda por estimulação térmica (*hot plate*).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Síntese do peptídeo

Após o contrato de sigilo, o peptídeo foi sintetizado pela empresa FastBio® Desenvolvimento e Tecnologia, utilizando síntese por fase sólida – FMOC. Após o recebimento do material, que conta com um relatório de qualidade, foram realizadas análises para inspeção da massa monoisotópica e o grau de pureza do peptídeo por Espectrometria de Massas, assim como, sua sequência de aminoácidos foi confirmada por sequenciamento *De Novo*. Para essas devidas identificações, foi utilizado o método MALDI-TOF/TOF no espectro de massas *Autoflex speed (Bruker Daltonics, Alemanha)* no modo positivo  $[M+H]^+$ . Uma alíquota do peptídeo foi ressuspendida em água deionizada e misturada a uma matriz pronta de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila/água deionizada/3% de ácido trifluoracético, 5/4/1, v/v/v e, posteriormente, essa mistura foi aplicada em triplicata em uma placa *Bruker MTP Massive 384*. As aplicações secaram em temperatura ambiente e então foram analisadas.

O espectro de massas estava equipado com laser *SmartBeam* e foram utilizados em dois modos de operação, o refletido positivo, para a obtenção de espectros de MS, e o LIFT, para a obtenção de espectros de MS/MS. A faixa de detecção da razão massa/carga ( $m/z$ ) foi de 600 a 3000. A calibração foi realizada com a mistura *Peptide Calibration Standard I (Bruker Daltonics, Alemanha)*. O software utilizado nessas análises foi o *FlexControl 3.0*. Alíquotas do peptídeo foram

submetidas às análises citadas a cada seis meses a fim de monitorar e garantir a estabilidade do composto em estudo.

## 3.2 Bioensaios

### 3.2.1 Animais

A manipulação dos animais experimentais ocorreu de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal - CONCEA, 2008), a Lei Arouca (Lei 11.794/2008) e com o Guiding Principles for Research Involving Animal and Human Beings - Sociedade de Fisiologia Americana (APS, 2000). Previamente esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/IB) da Universidade de Brasília, apresentando o número de protocolo UnB Doc nº 63878/2011, cujo certificado encontra-se anexado ao final. Além disso, foi obtida a Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético (Processo nº 010476/2013-0) com a finalidade de pesquisa científica.

Camundongos *Swiss* fêmeas (25 a 35g) foram adquiridos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sendo assim respeitado o número máximo de seis animais por gaiola. Todos foram acondicionados neste biotério e submetidos ao ciclo claro/escuro 12/12 horas, temperatura (25°C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período experimental, foram ofertadas água e alimentação *ad libitum*.

3.2.2. Avaliação do efeito antinociceptivo do protonectina-F por diferentes vias de administração

Para a avaliação do efeito do peptídeo por diferentes vias de administração, o peptídeo foi administrado por via intranasal (i.n), subcutânea (s.c), intraperitoneal (i.p) e intracerebroventricular (i.c.v). Para a administração por via i.n foi utilizada uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, UK) associada a um fio de polietileno para que a administração fluísse de forma contínua e padronizada. Os volumes escolhidos variaram entre 10 e 20  $\mu$ L/narina para que a solubilização do peptídeo acontecesse. Para a administração por via s.c foi escolhida a região interescapular e os volumes variaram entre 200  $\mu$ L e 1 mL . O protocolo da via i.c.v está descrito em detalhes no próximo item.

Os animais foram avaliados no teste da placa quente (*Hot plate*) e na retirada de cauda (*Tail-flick*) e no teste de indução química de nocicepção por Formalina. O peptídeo foi solubilizado em salina (0,9%) imediatamente antes da administração.

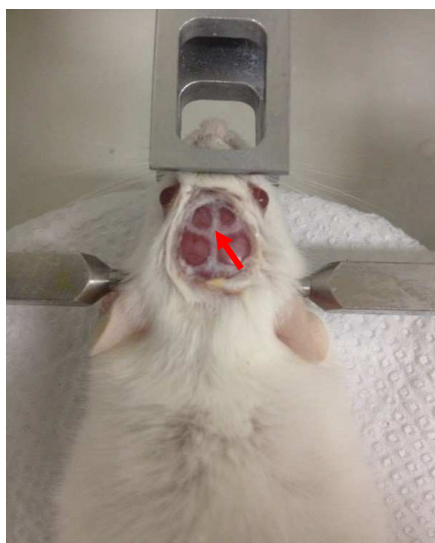
### 3.2.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da protonectina-F por via i.c.v

Para a administração i.c.v, foi realizada uma neurocirurgia com implantação de uma cânula guia no ventrículo cerebral direito para a administração. Essa via foi utilizada para a avaliação do efeito antinociceptivo no modelo de indução assim como dos antagonismos farmacológicos *in vivo* (mecanismo de ação).

#### 3.2.2.1 Implantação da cânula guia no ventrículo lateral cerebral direito

Para a avaliação do efeito antinociceptivo e dos mecanismos de ação da protonectina-F, foram realizadas injeções por via i.c.v, conforme detalhado a seguir. Os animais experimentais foram anestesiados via i.p com a solução de cloridrato de ketamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/Kg) diluídos em salina (0,9%). Sob o efeito da anestesia, os animais foram fixados em um estereotáxico (Insight®). Nos

cuidados pré-cirúrgicos, foram realizadas a higienização e a desinfecção do sítio cirúrgico com Iodo Povidine® seguida pela tricotomia da cabeça do animal. O anestésico local escolhido foi o cloridrato de lidocaína (2%) associado ao vasoconstritor periférico norepinefrina (0,01%), com a finalidade de reduzir o sangramento na região da incisão. Em seguida, com o objetivo de realizar injeções intracerebrais, o crânio foi exposto para a implantação da cânula guia no ventrículo lateral cerebral direito (VLD): AP - 0,2mm, ML - 1,0mm, DV - 2,3mm, tendo como base o ponto do bregma, de acordo com o Atlas de Franklin & Paxinos (1997), como ilustrado na Figura 1.



**Figura 1:** Ponto de referência Bregma indicado pela seta vermelha.

A cânula implantada no VLD constitui-se de um segmento de agulha hipodérmica BD-25X7 (22 G) com 10,2mm de comprimento e 0,7mm de diâmetro externo, e fixada com acrilato dental. Após a polimerização, as cânulas foram seladas com fio de aço inoxidável evitando a obstrução das mesmas. Após o procedimento foi

administrada uma pomada tópica (Sulfato de Neomicina e Bacitracina - Nebacetin<sup>®</sup>), que auxilia a cicatrização e impede infecções no local.

Após 4-6 dias de recuperação, os animais foram submetidos aos bioensaios comportamentais. A administração da protonectina-F foi realizada através do acoplamento de uma agulha de 10,1 mm de comprimento associada a um filamento de polietileno (PE10, WPI) a cânula guia. Com o auxílio de uma bomba de infusão (AVS Projetos<sup>®</sup>) acoplada a uma seringa de precisão (Hamilton<sup>®</sup>) foi possível injetar o volume final de 2 µL/animal, na velocidade 1,60 µL/min.

Para a avaliação de efeito antinociceptivo foi utilizado o teste térmico da placa quente (*Hot plate*) e retirada de cauda (*Tail-flick*).

### 3.2.3 Estudo do efeito da protonectina-F após a interação farmacológica com antagonistas opioides e canabinoides

Para a avaliação da interação farmacológica do peptídeo foram utilizados os antagonistas: cloridrato de naloxona (4 mg/Kg) para ensaio com receptores opioide e o AM251 (7,5 µg/animal) como antagonista de receptores, para ensaio com canabinoide. As administrações dos antagonistas foram realizadas anteriormente a administração de protonectina-F. No ensaio de antagonismo canabinoide a única via de administração utilizada para realizar todo o ensaio foi a i.c.v. Contudo, para o ensaio de antagonismo opioide, as administrações de naloxona ocorreram por via i.p a cada hora de ensaio, durante 4 horas, e o peptídeo infundiu-se uma vez por via i.c.v na dose de 20 µg/animal.



### 3.2.4 Testes antinociceptivos

#### 3.2.4.1 Teste da placa quente (*Hot Plate*)

Para o teste da placa quente (AVS projetos<sup>®</sup>), os animais foram colocados em um cubo de acrílico sobre uma placa quente de alumínio com temperatura de  $55 \pm 0,5$  °C. Os parâmetros de observação foram: lambidas em uma das patas traseiras, latência de fuga do aparelho (pulo) e balançar rigoroso da pata traseira. A latência de permanência máxima permitida foi de 30 s, para evitar lesão tecidual do animal.

Antes de cada neurocirurgia, os animais eram selecionados quanto à resposta ao estímulo térmico induzido pela placa quente. Caso a resposta basal fosse acima de 15 s ou abaixo de 3s, o animal era eliminado do teste.

No dia teste, os animais foram pré-avaliados e novamente, apenas os animais com latência de escape inferior a 15s e superior a 3s eram mantidos no experimento. Antes da administração dos compostos, cada animal foi testado por 3 vezes com o objetivo de determinar uma linha de resposta basal, que era constituída da média de três latências de escape com intervalos de 5 min.

As injeções por via i.c.v foram realizadas por meio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus Compact Infusion Pump<sup>®</sup>), que mantinha um fluxo constante de 1,60 µl/min. Após a injeção, os animais eram testados nos seguintes intervalos de tempo: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min. Grupos independentes de animais (n=8-10, por grupo) foram tratados com veículo, sulfato de morfina e o peptídeo, todos injetados por via i.c.v.

Todas as latências de respostas motoras (LA-latências de antinocicepção) foram normalizadas pelo índice de antinocicepção (I.A) utilizando a fórmula:

$$I.A = (LA \text{ do teste} - LA \text{ média basal}) / (LA \text{ máxima} - LA \text{ média basal})$$

Em que:

- Latência do teste, representa o tempo em segundos que o animal levou para apresentar um comportamento de escape após a administração do composto.
- Latência média basal, representa a média de três tempos de escape antes da administração da droga.
- Valor 30, representa o tempo máximo em segundos que o animal pode permanecer na placa quente sem apresentar lesão tecidual.
- Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  E.P.M. dos valores de I.A.

Grupos independentes de animais (n=8-12, por grupo) foram tratados com os veículos (água ultrapura filtrada em sistema Milli-Q nas injeções i.c.v ou solução salina 0,9% nas demais vias de administração), sulfato de morfina (20 mg/Kg), protonectina-F (5, 10, 20 e 40 mg/Kg). As doses utilizadas no ensaio de interação farmacológica com antagonista opioide foram: veículo (salina 0,9% (i.p) e água milli-Q para a injeção i.c.v), cloridrato de naloxona (4 mg/Kg), sulfato de morfina (20  $\mu$ g/animal) e peptídeo sintético (20  $\mu$ g/animal). No caso do ensaio de interação farmacológica com antagonista canabinoide as concentrações utilizadas foram: protonectina-F (20  $\mu$ g/animal) e AM251 (7,5 $\mu$ g/animal).

#### 3.2.4.2 Teste térmico de retirada de cauda (*Tail Flick*)

Operado em um equipamento denominado Analgesímetro (Insight<sup>®</sup>), calibrado para atingir uma temperatura máxima de 75 °C, o teste de retirada de cauda (*tail-flick*) baseia-se na mensuração da nocicepção aguda utilizando o calor irradiado por meio de um filamento metálico diretamente na cauda do animal. Após seu acionamento a

temperatura é elevada em velocidade constante de 8 °C/s, sendo desativada quando detecta-se a retirada de cauda pela tecnologia de presença por infravermelho. (Bannon e Malmberg, 2007; Le Bars *et al.* 2001).

Previamente ao tratamento, foram realizadas três medidas de base, em intervalos mínimos de cinco minutos sendo que os animais que não apresentaram latência de escape de até 2,0 segundos durante essa fase foram automaticamente desconsiderados do teste. As latências de escape foram registradas após os tratamentos nos seguintes intervalos de tempo: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min. Grupos independentes de animais (n=8-12, por grupo) foram tratados com os veículos (água ultrapura filtrada em sistema Milli-Q nas injeções i.c.v ou solução salina 0,9% nas demais vias de administração), sulfato de morfina (20 µg/animal), protonectina-F (5,10, 20 e 40 µg/animal ), intraperitoneal e subcutânea.

Assim como no teste da placa quente, o I.A foi avaliado de acordo com o tempo de permanência no equipamento durante o estímulo térmico.

$$I.A = \frac{(\text{Latência do teste}) - (\text{Latência média basal})}{6 - (\text{Latência média basal})}$$

Em que:

- Latência do teste, representa o tempo em segundos que o animal levou para apresentar um comportamento de escape após a administração do composto.
- Latência média basal, representa a média de três tempos de escape antes da administração do composto.
- Valor 6, representa o tempo máximo em segundos que o animal permanece

com a cauda no filamento aquecido.

- Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  E.P.M. dos valores de I.A.

#### 3.2.4.3 Teste de indução de nocicepção por estímulo químico (formalina 2,5%)

O teste da formalina é um teste bifásico de estimulação dolorosa não transiente, no qual é possível avaliar o comportamento do animal em resposta a uma lesão tecidual contínua. Devido a esta característica, acredita-se que este seja o modelo mais fiel de estudo das dores clínicas se comparado aos testes de estímulos térmicos por exemplo (Alreja *et al.*, 1984; Abbott *et al.*, 1982; Dubuisson e Dennis, 1977).

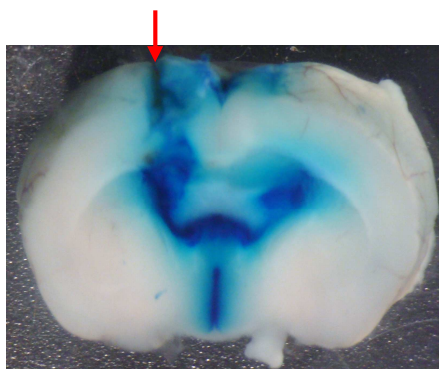
Este teste foi utilizado para avaliar a ação antinociceptiva da protonectina-F, por meio das análises comportamentais nos animais de experimentação (Randolph, 1997; Hunskaar & Hole, 1987). Inicialmente foi administrada por via intraplantar na pata direita traseira o volume de 50  $\mu$ L da solução de formalina 2,5%. Após a administração da solução, os camundongos foram colocados em um recipiente de acrílico quadrado com espelho posicionado em apenas um lado, que facilitou a visualização do animal e a contagem cronometrada do tempo em que o animal realizava os seguintes comportamentos: lambida, elevação e vigoroso balançar da pata traseira, correspondente ao sítio de injeção da formalina. (Martins *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 1989; Dubuisson & Dennis, 1977). Por ser um modelo bifásico é possível analisar diferentes tipos de analgésicos com diversificados mecanismos de ação a depender da fase álgica avaliada (Randolph, 1997). A primeira fase (dor neurogênica ou aguda) iniciou-se imediatamente após a injeção de formalina e se estendeu pelos primeiros 10 minutos. A segunda fase, conhecida como dor

inflamatória, é a que mais se assemelha à dor crônica, e iniciou-se no 10º minuto até o 30º minuto após a injeção de formalina.

Foram feitos 4 tratamentos: 1) sem qualquer tipo de estímulo, que mede variações comportamentais não relacionadas à injeção de formalina; 2) injeção de formalina intraplantar associado à infusão de veículo por via i.c.v (controle negativo); 3) injeção de formalina intraplantar associado à infusão de sulfato de morfina 20 µg/animal (controle positivo); 4) injeção de formalina intraplantar associado à infusão de protonectina- F 20 µg/animal. Os procedimentos necessários para utilizar a via i.c.v. foram os mesmos descritos no item 3.2.2.

### 3.3 Análises macroscópicas da posição da injeção i.c.v

Para avaliar se as cânulas foram corretamente posicionadas foi necessária uma análise macroscópica. Para isso, ao final de cada bioensaio, os animais foram levados até ao biotério para serem eutanasiados por overdose de Tiopental (120 mg/Kg). Em seguida, foi feita uma injeção de azul de metileno (Arachemia®) pela cânula guia já inserida no cérebro do animal e por fim, os cérebros foram retirados, colocados em formol 4% e mantidos a 4°C durante 24h. Posteriormente, por meio de cortes manuais utilizando como referência uma matriz cerebral de acrílico (Insight®) foi verificado o posicionamento correto da cânula guia e o local da injeção (Ventrículo corado de azul conforme ilustrado na figura 2). Foram desconsiderados os resultados dos bioensaios de todos os animais que apresentaram sua cânula posicionada incorretamente.



**Figura 2:** Análise macroscópica para visualizar o local da injeção e a posição da cânula guia no ventrículo direito com ajuda do corante azul de metileno (Galante, 2014).

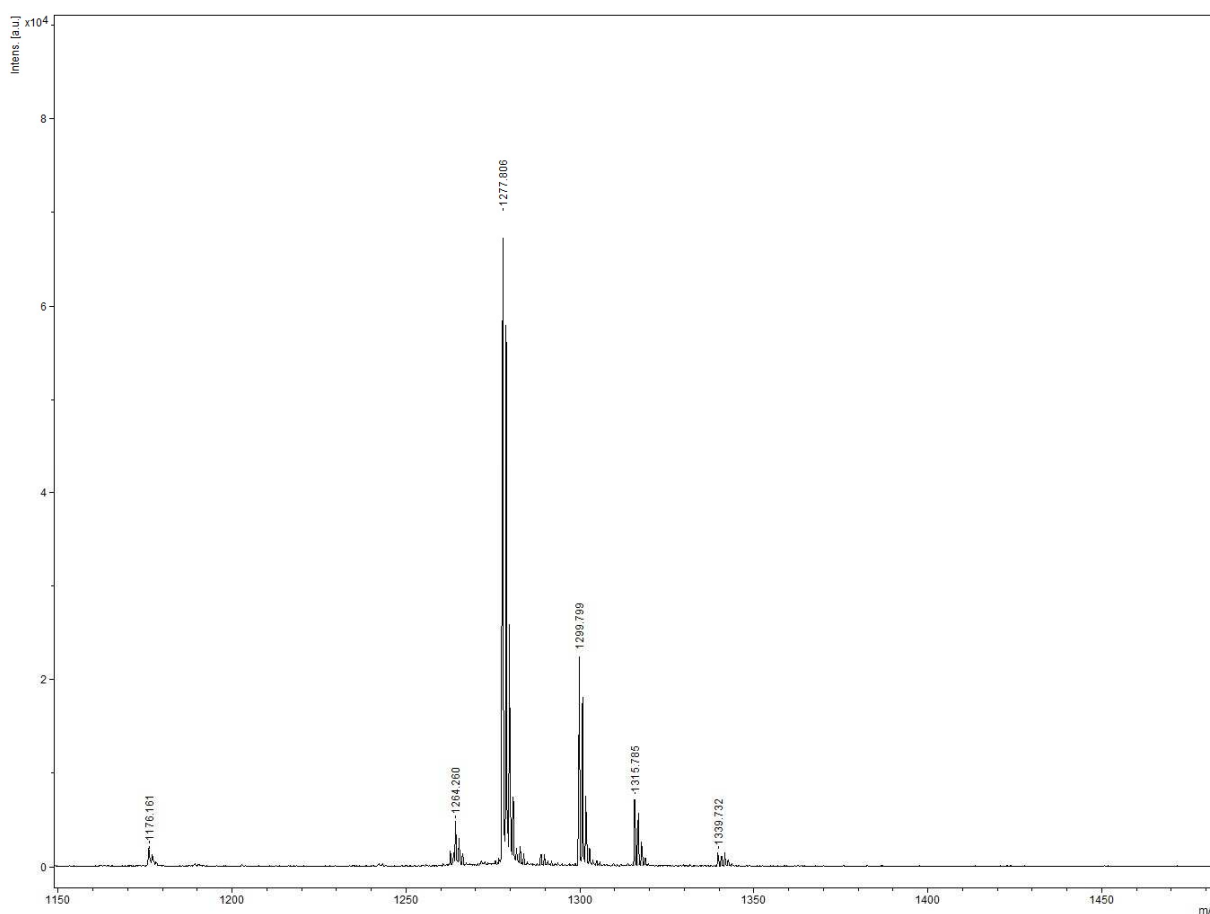
### 3.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi feita utilizando-se o software GraphPad Prism® 8.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram submetidos à análise de distribuição normal (Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson). Dados do teste de indução de nocicepção por indução química foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey para distribuições normais de variâncias semelhantes, considerando-se  $p < 0,05$ . Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni, para análise da significância dos tempos totais gastos pelos animais nos bioensaios de antinocicepção.

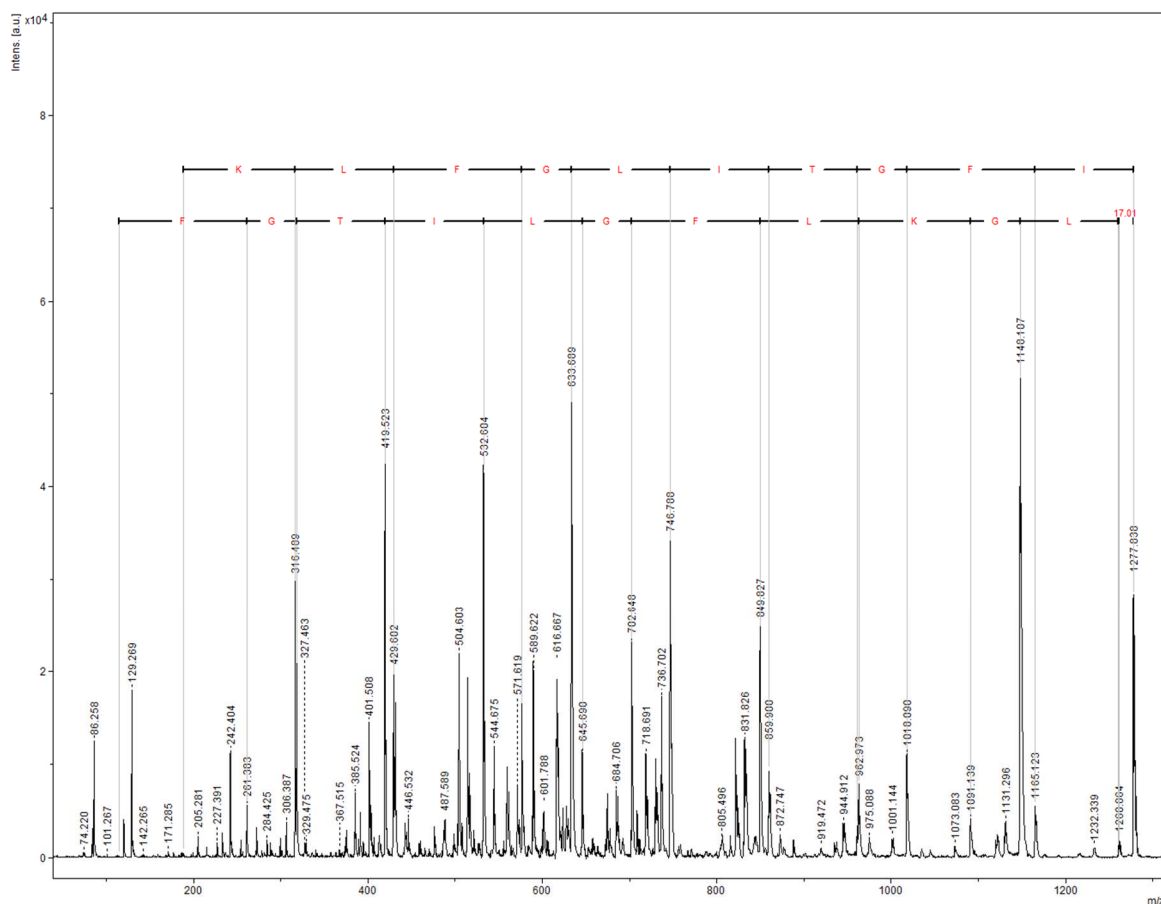
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da pureza do composto

Após a avaliação dos espectros de massas obtidos (Figura 3 e 4), pôde-se verificar a correta sequência de aminoácidos do peptídeo e o grau de pureza. Sendo assim, o peptídeo foi aprovado para uso devido ao seu alcance de pureza ser superior a 95%.



**Figura 3:** O espectro de massa obtido pelo equipamento MALDI/TOF revelou a presença do composto, contendo o íon  $(M+H^+) = 1277.806$  Da. A aquisição do espectro foi obtida no modo refletivo.



**Figura 4:** Sequência do peptídeo proteonectina-F pelo método de fragmentação do tipo LIFT no MALDI-TOF/TOF.

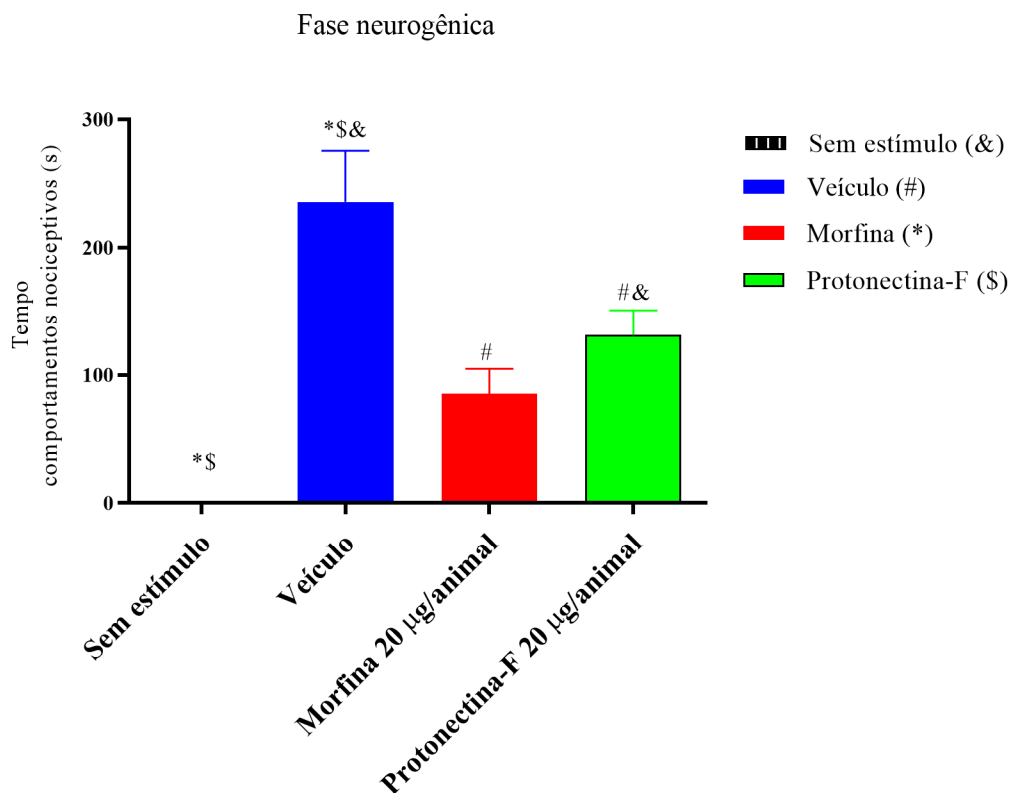
#### 4.2 Efeito antinociceptivo no teste de nocicepção induzida por formalina

O teste de formalina tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva de diversas substâncias. O teste tem a vantagem de produzir uma nocicepção mais contínua, assemelhando-se mais com casos clínicos, ao contrário do observado nos ensaios de placa quente e retirada da cauda. A injeção de formalina produz uma nocicepção tipicamente em duas fases: nos primeiros minutos (até 10 min) observa-se comportamentos associados à fase neurogênica (ou aguda),

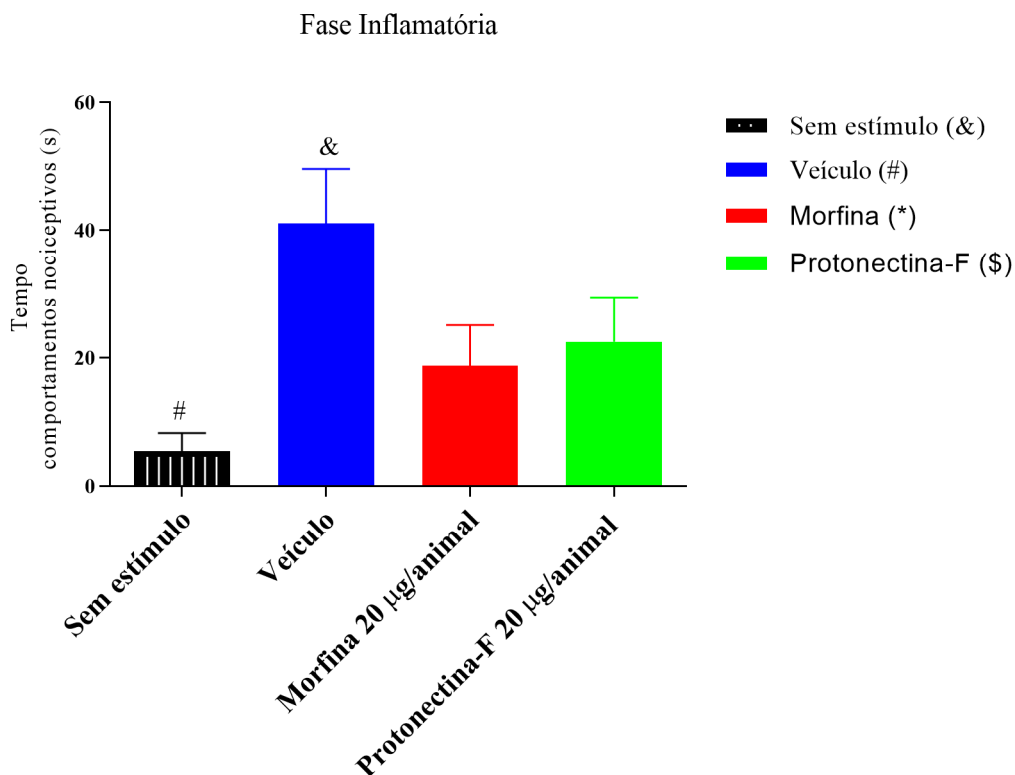


relacionada à ativação de nociceptores. Após um período de latência, observa-se um novo período de nocicepção, relacionado à liberação de agentes inflamatórios, como prostaglandinas e bradicinina (fase inflamatória). O período avaliado foi até 30º minuto após a injeção de formalina.

Os resultados da protonectina-F nesse ensaio estão mostrados nas figuras 5 e 6, comparados com controle negativo (veículo, salina 0,9%) e controle positivo (sulfato de morfina). Nos dois testes, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o controle sem estímulo (Naive) e o controle negativo (veículo), indicando que os animais responderam ao estímulo químico apropriadamente. Na fase neurogênica, medida até 10 minutos após a injeção de 2,5% formalina, observou-se uma diminuição de comportamentos relacionados à nocicepção tanto para animais tratados com sulfato de morfina como para protonectina-F (Figura 5). Essa diminuição foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao veículo e na ausência de estímulo. Não houve diferença significativa entre sulfato de morfina e protonectina-F. Já para a fase inflamatória, também se observou uma diminuição nos comportamentos em animais tratados com morfina e protonectina-F (Figura 6), no entanto, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas em relação ao veículo. Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a protonectina-F teve um comportamento semelhante ao sulfato de morfina nas duas fases do teste; ou seja, atuam na fase neurogênica, diminuindo o número de comportamentos relacionados à nocicepção.



**Figura 5:** Atividade antinociceptiva dos tratamentos na fase neurogênica. Foram avaliados por via i.c.v: Morfina 20 µg/animal (\*), protonectina-F 20 µg/animal (+), veículo (#) e sem estímulo (&) em camundongos Swiss (n=9-10) pelo teste de formalina por via i.pl. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA duas vias seguido do pós-teste Bonferroni.



**Figura 6:** Atividade antinociceptiva dos tratamentos na fase inflamatória. Foram avaliados por via i.c.v: Morfina 20 µg/animal (\*), protonectina-F 20 µg/animal (+), veículo (#) e sem estímulo (&) em camundongos Swiss (n=9-10) pelo teste de formalina por via i.pl. Dados submetidos ao teste estatístico ANOVA duas vias seguido do pós-teste Bonferroni.

Na fase neurogênica, os nociceptores presentes nas fibras do tipo C e A $\delta$  são acionados, transmitindo o sinal álgico pela via ascendente. A morfina age através dos receptores opioides inibindo a transmissão desse sinal. É possível que a protonectina-F apresente mecanismo de ação antinociceptivo similar ao do sulfato de morfina, ligando-se a receptores do tipo opioides. Alternativamente, é possível que a protonectina-F atue de maneira a estimular a via descendente opioide, resultando em analgesia mediada opioides endógenos. Em ambos os mecanismos o antagonista

cloridrato de naloxona teria um efeito inibitório sobre a atividade antinociceptiva da protonectina-F.

Já na fase inflamatória, mediadores inflamatórios como a prostaglandina e a bradicinina atuam na ativação dos nociceptores, estimulando a via ascendente. Resultados anteriores relatados com sulfato de morfina mostraram que sua eficácia nesta fase é dose-dependente (Dubuisson & Dennis, 1977). Em doses menores (2mg/Kg), a morfina mostrou-se eficiente na fase neurogênica, mas não na fase inflamatória, enquanto que em doses maiores (6 mg/Kg), a morfina foi capaz de diminuir o comportamento típico em ambas as fases (Dubuisson & Dennis, 1977). É possível que a dose utilizada nesse teste não tenha sido suficiente para observar o efeito analgésico da morfina na fase inflamatória. Da mesma forma, é possível que a concentração de protonectina-F utilizada também não tenha sido suficientemente alta para detectar esse efeito.

#### 4.3 Efeito antinociceptivo da protonectina-F por diferentes vias de administração

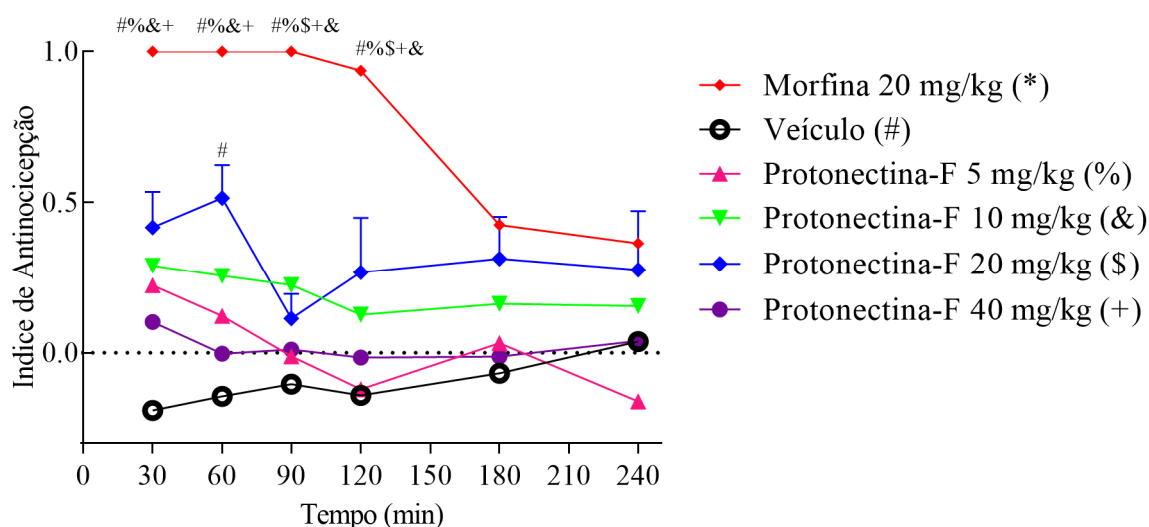
A escolha da via de administração de um fármaco se baseia na sua capacidade de atingir os tecidos alvos, que é influenciado pelo tamanho molecular ou pelo fluxo de massa, que ocorre através do sistema cardiovascular. Em estudos iniciais, a via de administração de protonectina-F, por injeção i.c.v, mostrou um potente efeito antinociceptivo (Galante, 2014). Objetivando ampliar este estudo, outras vias de administração foram testadas: intraperitoneal (i.p), subcutânea (s.c) e intranasal (i.n). A via subcutânea é a segunda via mais utilizada em cuidados paliativos na clínica, por

ser de fácil manejo e por ser mais segura quando comparada à via de administração intravenosa. Ademais, dois modelos de indução térmica foram utilizados: os modelos de avaliação antinociceptiva de retirada de cauda e o de placa quente. O modelo de retirada de cauda visa testar uma possível ação do peptídeo na resposta reflexo medular, enquanto o modelo de placa quente visa testar a atividade supramedular do peptídeo.

#### 4.3.1 Via de administração intraperitoneal (i.p)

O tratamento com a protonectina-F mostrou um efeito antinociceptivo no teste de placa quente aos 60 min após a administração por via i.p. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. No teste da placa quente por via i.p detectou-se diferença significativa nos resultados do efeito do tratamento [ $F(4,42) = 10.34$ ;  $p < 0,0001$ ], do tempo [ $F(5,210) = 3.856$ ;  $p = 0,0023$ ] e na interação do tratamento-versus-tempo [ $F(20,210) = 2.323$ ;  $p = 0,0016$ ]. A protonectina-F mostrou efeito antinociceptivo especificamente aos 60 minutos da administração do peptídeo (Figura 7). O índice de antinocicepção (I.A) observado para este ponto foi próximo a 0,5. Essa diferença significativa foi observada na concentração de 20 mg/Kg, não sendo observada com as concentrações 5, 10 e 40 mg/Kg. Não houve diferenças significativas em relação ao veículo para as concentrações testadas nos demais tempos do teste (30, 90, 120, 180 e 240 min). Diferenças significativas também foram observadas para morfina em relação a todas as concentrações de protonectina-F testadas e em relação ao veículo nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, exceto para a concentração de 20mg/Kg nos tempos de 30 e 60 minutos, onde a diferença não foi significativa. Nos demais pontos (180 e 240 min), não houve diferenças significativas entre morfina, protonectina-F (5, 10, 20 e 40 mg/Kg) e veículo. Esse

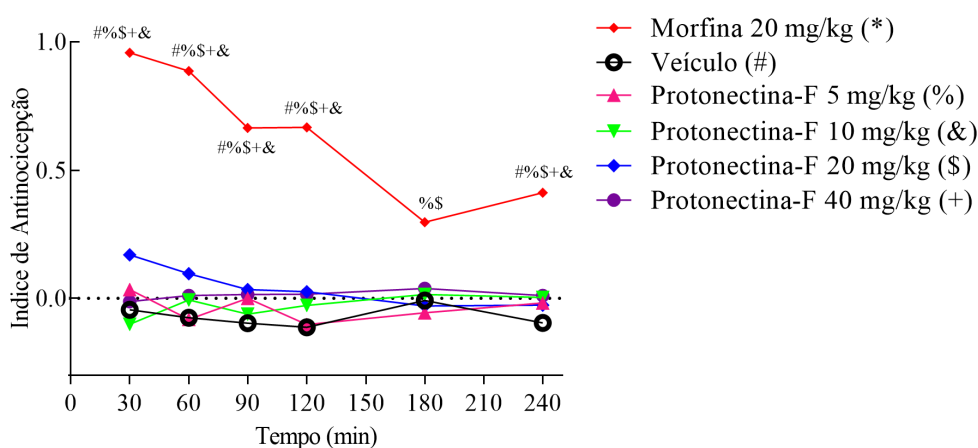
resultado sugere que a protonectina-F à 20 mg/Kg tem efeito antinociceptivo em 60 minutos após a administração por via i.p, no entanto, esse efeito foi menor em relação à morfina.



**Figura 7:** Índice de antinociceção (I.A) das latências de escape da placa quente após injeção I.P da protonectina-F em camundongos Swiss. Os dados foram submetidos ao teste estatístico. ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Bonferroni. (#) Diferenças significativas em relação ao veículo.  $p < 0,005$ . (%) Diferenças significativas em relação a 5 mg/Kg. (&) Diferenças significativas em relação a 10 mg/Kg. (\$) Diferenças significativas em relação a 20 mg/Kg. (+) Diferenças significativas em relação a 40 mg/Kg. (\*) Diferenças significativas em relação ao sulfato de morfina 20 mg/Kg.

Em relação às latências de retirada de cauda, a protonectina-F não mostrou um efeito antinociceptivo quando administrada por via i.p. Sendo assim, no segundo teste quando administrada por via i.p, a protonectina-F não mostrou diferença significativa quando comparada ao controle negativo (veículo) nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 mg/Kg avaliadas nos tempos 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min (Figura 8). A análise mostrou resultados significativos do efeito do tratamento [ $F(4,40) = 31.53$ ;  $p < 0,0001$ ],

do tempo [ $F(5,200) = 7.511$ ;  $p < 0,0001$ ] e na interação do tratamento-versus-tempo [ $F(20,200) = 5.693$ ;  $p < 0,0001$ ]. Já o efeito antinociceptivo do sulfato de morfina 20 mg/Kg mostrou-se significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) da protonectina-F nos tempos 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min nas concentrações de 5 e 10 mg/Kg. O sulfato de morfina 20 mg/Kg mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à protonectina-F nas concentrações de 20 mg/Kg nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 240 min; no entanto não houve diferença significativa a 180 min após a administração. A ausência de efeito antinociceptivo da protonectina-F no teste de latência de retirada de cauda, quando comparado ao efeito antinociceptivo observado no teste de placa quente, sugere que efeito da protonectina-F pode estar relacionado a uma ação supramedular, e que provavelmente o peptídeo teve uma baixa disponibilidade no tecido cerebral.

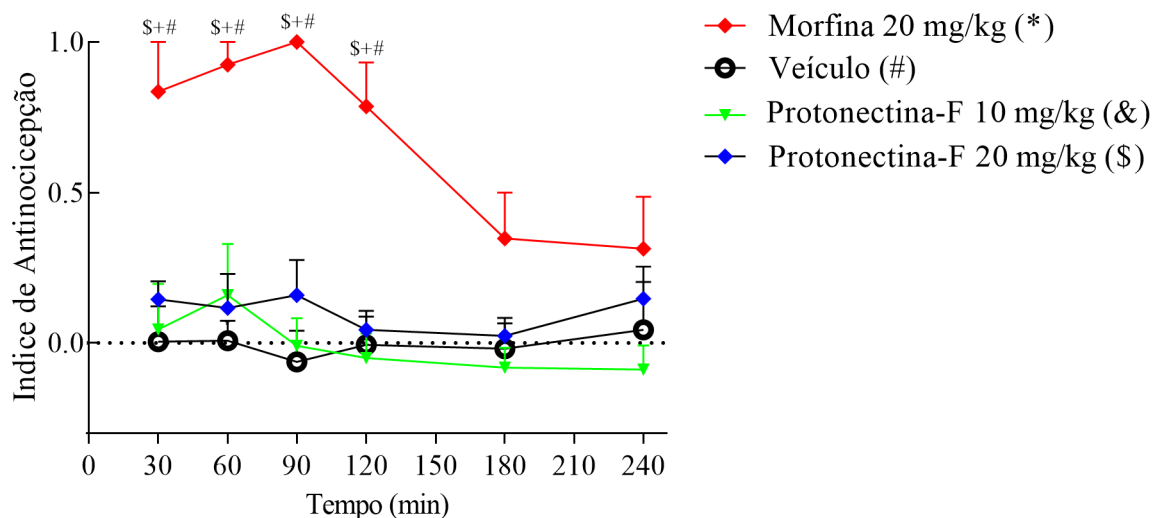


**Figura 8:** Índice de antinociceção (I.A.) das latências de retirada de cauda após injeção I.P da protonectina-F em camundongos *Swiss*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Bonferroni. (#) Diferenças significativas em relação ao veículo.  $p < 0.05$ . (%) Diferenças significativas em relação a 5 mg/Kg. (&) Diferenças significativas em relação a 10 mg/Kg. (\$) Diferenças significativas em relação a 20 mg/Kg. (+) Diferenças significativas em relação a 40 mg/Kg. (\*) Diferenças significativas em relação a morfina 20 mg/Kg.

#### 4.3.2 Via de administração subcutânea (s.c)

O tratamento com a protonectina-F não mostrou um efeito antinociceptivo no teste de placa quente após a administração por via s.c. No teste de placa quente pela via s.c, a análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. Os resultados mostram diferenças significativas em relação ao efeito do tratamento [ $F(3,27) = 15.55$ ;  $p < 0,0001$ ], do tempo [ $F(5,135) = 5.054$ ;  $p < 0,0003$ ] e na interação do tratamento-versus-tempo [ $F(15,135) = 2.637$ ;  $p < 0,0016$ ] (Figura 9). Em relação ao sulfato de morfina 20 mg/Kg, diferenças significativas foram observadas quando comparado a todas as concentrações de protonectina-F (10 e 20 mg/Kg) testadas e em relação ao veículo nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, exceto nos tempos de 180 e 240 min onde a diferença não se apresentou significativa ( $p < 0,05$ ). O efeito antinociceptivo observado no teste de placa quente por via s.c foi similar ao observado no mesmo teste por via i.p. Em ambos, houve diferença significativa nos tempos 30, 60, 90 e 120 min quando comparados ao veículo (Figuras 7 e 9).

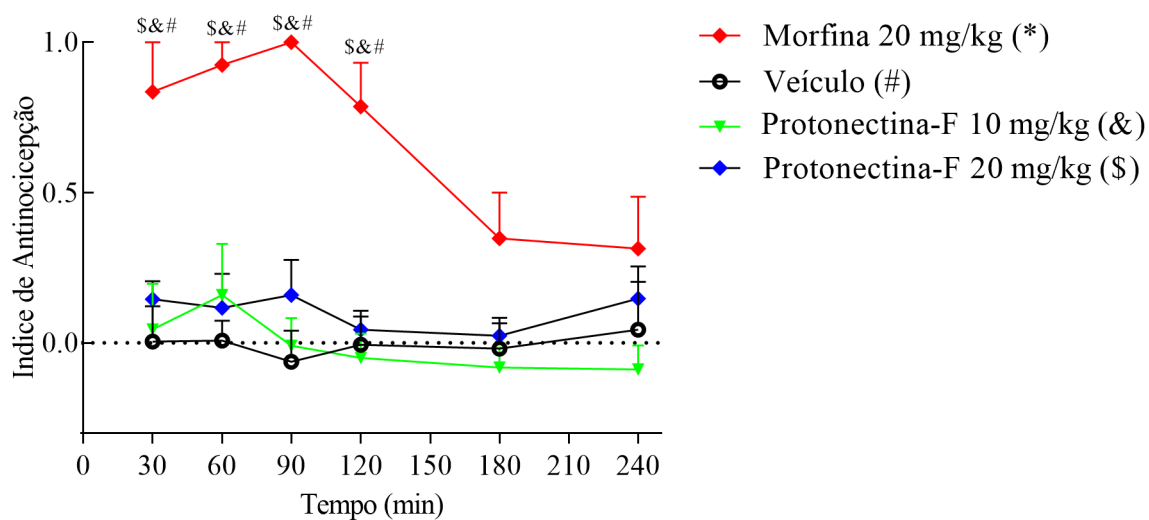




**Figura 9:** Índice de antinociceção (I.A.) das latências de escape da placa quente após injeção S.C da protonectina-F em camundongos *Swiss*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Bonferroni. (#) Diferenças significativas em relação ao veículo.  $p < 0.05$ . (&) Diferenças significativas em relação a protonectina-F 10 mg/Kg. (\$) Diferenças significativas em relação a protonectina-F 20 mg/Kg. (\*) Diferenças significativas em relação ao sulfato de morfina 20 mg/Kg.

Em relação às latências de retirada de cauda, a protonectina-F não mostrou um efeito antinociceptivo quando administrada por via s.c. Sendo assim, em relação às latências de retirada de cauda pela via de administração s.c, a protonectina-F não mostrou diferença significativa quando comparadas ao controle negativo (veículo) nas concentrações de 10 e 20 mg/Kg em todos os tempos avaliados (30, 60, 90, 120, 180 e 240min); (Figura 10). Já o efeito antinociceptivo do sulfato de morfina 20 mg/Kg mostrou-se significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) da protonectina-F no tempo de 30, 60 e 90 min na concentração de 20 mg/Kg e nos tempos de 30 e 90 min na concentração de 10 mg/Kg de protonectina-F bem como em relação ao veículo. Os resultados da ANOVA de duas vias mostraram o efeito do tratamento [ $F(3,27) = 14.24$ ;

$p < 0,0001$ ], do tempo [ $F(5,135) = 6.025$ ;  $p < 0,0001$ ] e na interação do tratamento-versus-tempo [ $F(15,135) = 2.344$ ;  $p < 0,0051$ ].



**Figura 10:** Índice de antinociceção (I.A) das latências de retirada de cauda após injeção S.C da protonectina-F em camundongos *Swiss*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Bonferroni. (#) Diferenças significativas em relação ao veículo.  $p < 0,05$ . (&) Diferenças significativas em relação a 10 mg/Kg. (\$) Diferenças significativas em relação a 20 mg/Kg. (\*) Diferenças significativas em relação a morfina 20 mg/Kg.

Comparando-se os testes de latência de cauda via i.p e s.c, percebe-se que na via i.p, o efeito antinociceptivo do sulfato de morfina 20 mg/Kg se estende até 120 min, deixando de mostrar diferença significativa nos tempos posteriores de 180 e 240 min. Já no teste s.c, o efeito antinociceptivo do sulfato de morfina 20 mg/Kg foi até 120 min, não sendo significativamente diferente do veículo nos tempos de 180 e 240 min.

A via subcutânea é reconhecidamente eficaz e eficiente para o manejo de cuidados paliativos contra dor. A facilidade de administração e a diminuição de efeitos adversos estão entre as principais vantagens (Pontalti *et al.*, 2012). No entanto, apesar dessas vantagens conhecidas, seu uso ainda é incipiente na clínica. Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que há limitações em sua utilização.

Uma limitação encontrada na via s.c foi que ao administrar a protonectina-F diluída ao veículo, a solução retornou pelo local da perfuração da injeção. Este extravasamento foi observado com variados volumes (de 200 $\mu$ L a 1mL) testados. Na clínica, este fato ocorre na administração de medicamentos em meio oleoso, como por exemplo na injeção de hormônios. No entanto, este não foi o caso da protonectina-F por esta ter sido diluída em salina 0,9%. Este extravasamento não foi observado na administração de sulfato de morfina 20 mg/Kg e também com o veículo apesar da padronização no procedimento de injeção (mesma medida da agulha e ângulo de incisão). Portanto, esta limitação pode explicar a ausência de efeito antinociceptivo da protonectina-F observada pela via de administração s.c para este teste.

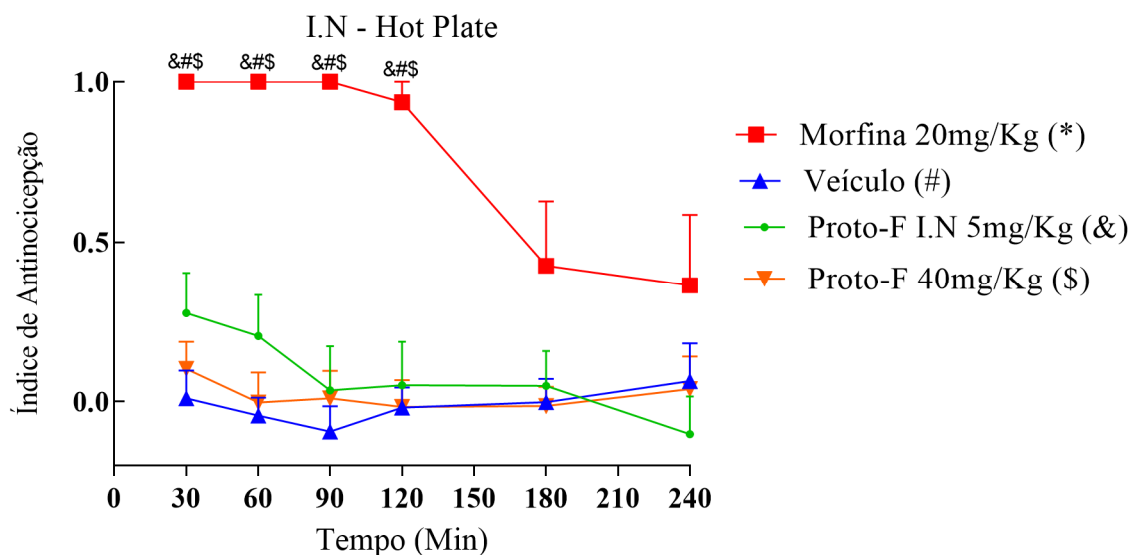
Apesar das limitações encontradas neste trabalho, a taxa de absorção pela via subcutânea pode ser variada pela metodologia de aplicação utilizada. Neste trabalho, foi utilizada a infusão em bolus. Outros métodos, como administração contínua por bomba de infusão ou diferentes aspectos na formulação do meio podem ser avaliados

para aumentar a difusão do peptídeo e sua eficácia por essa via de administração (Pontalti *et al.*, 2012).

#### 4.3.3 Via de administração intranasal (i.n)

O interesse pela via intranasal de administração de fármacos tem aumentado devido às suas vantagens. É uma via não invasiva, de fácil absorção devido a sua ampla vascularização e evita tanto o processo de degradação pelo metabolismo de primeira passagem como a barreira hematoencefálica para atingir o sistema nervoso. Para testar a eficácia dessa via de administração no efeito antinociceptivo da protonectina-F, uma solução aquosa com diferentes concentrações do peptídeo foi administrada por bomba de infusão na cavidade nasal de camundongos *Swiss* e o comportamento nociceptivo foi medido no teste “hot plate” nos tempos de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após infundido, com volumes variando entre 10 e 20  $\mu\text{L}$ /narina. Como esperado, sulfato de morfina mostrou alta eficácia antinociceptiva após 30, 60, 90 e 120 minutos de teste, decaindo aos 180 minutos de teste. Já os resultados com protonectina-F mostraram que para as concentrações de 5 mg/Kg e 40 mg/Kg não houve efeito antinociceptivo significativamente diferente do veículo por toda duração do teste. Os resultados indicam que a via de administração intranasal não foi eficaz para induzir o efeito antinociceptivo de protonectina- F. No entanto, o método de administração utilizado neste ensaio pode ter influenciado o resultado, uma vez que a solução comumente extravasou, portanto, não sendo inteiramente inalada pelos camundongos. Esta limitação na infusão não ocorreu com sulfato de morfina, uma vez que o volume necessário para infundir essa dose foi menor. É necessário otimizar o método de administração e a forma de apresentação do oferecimento do peptídeo

visando aprimorar seu efeito antinociceptivo.



**Figura 11:** Índice de antinocicepção (I.A) das latências de placa quente após injeção I.N da protonectina-F em camundongos *Swiss*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Tukey. (#) Diferenças significativas em relação ao veículo.  $p < 0,05$ . (&). Diferenças significativas em relação a 5 mg/Kg. (\$) Diferenças significativas em relação a 40 mg/Kg (\*) Diferenças significativas em relação a morfina 20 mg/Kg.

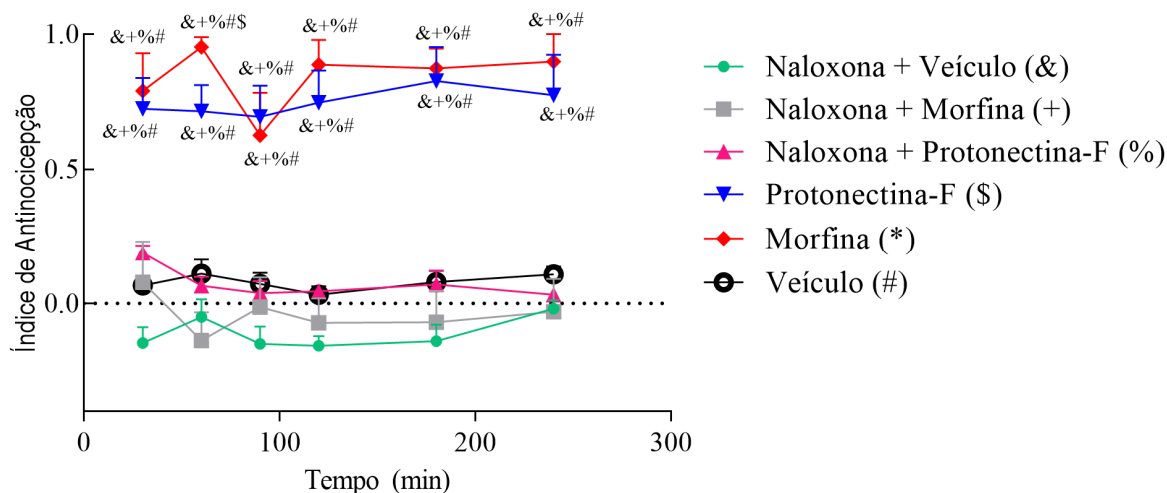
#### 4.4 Avaliação do mecanismo de ação da protonectina-F por antagonismo farmacológico

##### 4.4.1 Antagonismo farmacológico por opioides

Os testes iniciais para verificar o efeito da antinociceptivo da protonectina-F mostraram uma eficácia comparável ao do sulfato de morfina quando administrado por via i.c.v (Galante, 2014). Visando avaliar a interação deste peptídeo à receptores

opioides, foi utilizado o cloridrato de naloxona (4mg/Kg), um antagonista opioide não seletivo amplamente utilizado com essa finalidade. O teste visa mensurar a latência do efeito antinociceptivo da protonectina-F aplicada por via i.c.v na presença de cloridrato de naloxona (4 mg/Kg) ofertado por via i.p a cada hora durante 4h de experimento (Figura 12).

A Figura 12 mostra os resultados do teste de competição com o antagonista farmacológico de receptores opioides, cloridrato de naloxona (4mg/Kg, via i.p). Como esperado, o sulfato de morfina 20 µg/animal (via i.c.v) mostrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao veículo ao longo de todo o teste. Os resultados da MANOVA mostraram efeitos significativos para o tratamento [ $F(5,48) = 29.36$ ;  $p < 0,0001$ ] e para a interação do tratamento-versus-tempo [ $F(25,240) = 2.562$ ;  $p = 0,0001$ ], sem diferenças significativas para o tempo [ $F(5,240) = 0.2995$ ;  $p = 0,9128$ ]. Na presença de cloridrato de naloxona (4mg/Kg), o sulfato de morfina 20 µg/animal não apresentou diferença significativa em relação ao mesmo veículo, mostrando que o efeito antinociceptivo do sulfato de morfina foi significativamente inibido na presença do antagonista durante todo o período do teste. Um efeito similar ao do sulfato de morfina 20 µg/animal (via i.c.v) foi verificado para a protonectina-F 20 µg/animal (via i.c.v), onde na presença de cloridrato de naloxona, observou-se o mesmo efeito inibitório para a atividade antinociceptiva durante os 240min do teste. O resultado do ensaio demonstra que o cloridrato de naloxona inibe o efeito da protonectina-F.



**Figura 12:** Inibição do efeito antinociceptivo da protonectina-F pelo antagonismo farmacológico de receptores opioides pelo cloridrato de naloxona no teste de placa quente após injeção de horário por via i.p da naloxona (durante 4h) e por via i.c.v da protonectina-F e sulfato de morfina em camundongos Swiss. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. (#) Diferença estatística em relação ao veículo  $p < 0,05$ . (%) Diferença significativa em relação a naloxona 4 mg/Kg + protonectina-F 20  $\mu$ g/animal. (&) Diferença significativa em relação a naloxona 4 mg/Kg + veículo. (\$) Diferença significativa em relação a protonectina-F 20  $\mu$ g/animal. (+) Diferença significativa em relação a naloxona 4 mg/Kg + morfina 20  $\mu$ g/animal. (\*) Diferença significativa em relação ao sulfato de morfina 20  $\mu$ g/animal.

Os resultados com antagonista opioide mostraram uma inibição do efeito antinociceptivo tanto para morfina como para protonectina-F. A ação farmacodinâmica do sulfato de morfina deriva da sua interação com receptores opioides. Estes são acoplados à proteína Gi/0 (receptores metabotrópicos). A interação agonista/receptor em fibras neuronais pré-sinápticas ativa a proteína Gi/0, que por sua vez pode atuar de duas maneiras: inibindo a produção de cAMP e os canais para cálcio voltagem-dependentes, ou ativando canais para potássio. Esses dois eventos levam à hiperpolarização da membrana pré-sináptica, inibindo a liberação de neurotransmissores associados à transmissão do impulso nociceptivo, como o

glutamato e a substância P. O antagonista naloxona compete pelo mesmo receptor opioide, reduzindo a ativação da proteína Gi/0, o que explica seu efeito de redução de antinocicepção. A observação que o cloridrato de naloxona inibiu o efeito antinociceptivo da protonectina-F de modo similar à morfina sugere que esse efeito é modulado por receptores opioides. No entanto, não permite concluir em qual etapa sua ação ocorre, ou seja, se sua ação está relacionada à competição pela interação direta ao receptor no ambiente extracelular ou indiretamente através de um possível efeito na proteína Gi/0 e as cascatas de transdução de sinal ativadas por ela.

A naloxona age competindo com a morfina pelos receptores  $\mu$ , inibindo seu efeito, ou seja, é um antagonista, no entanto, a naloxona também é capaz de reconhecer e se ligar, embora com afinidade menor, a receptores opioides do tipo  $\delta$  e  $\kappa$  (Trescot *et al.*, 2008). Há uma co-localização anatômica desses receptores, principalmente entre os receptores  $\mu$  e  $\kappa$ , no tálamo, tronco cerebral (na substância cinzenta periaquedutal) e na medula (Koneru *et al.*, 2009). Sendo assim, ainda não é possível afirmar em qual receptor ou região a protonectina-F atue. Portanto, os resultados observados neste trabalho mostram que o cloridrato de naloxona inibe o efeito antinociceptivo da protonectina-F, sugerindo uma possível interação desse peptídeo com receptores opioides.

#### 4.4.2 Antagonista de receptor canabinoide CB1

O efeito da modulação da dor pelo sistema opioide e seus agonistas já é bem caracterizado. Além disso, o sistema canabinoide também tem se mostrado envolvido em vias nociceptivas. O sistema canabinoide, assim como o sistema opioide, age

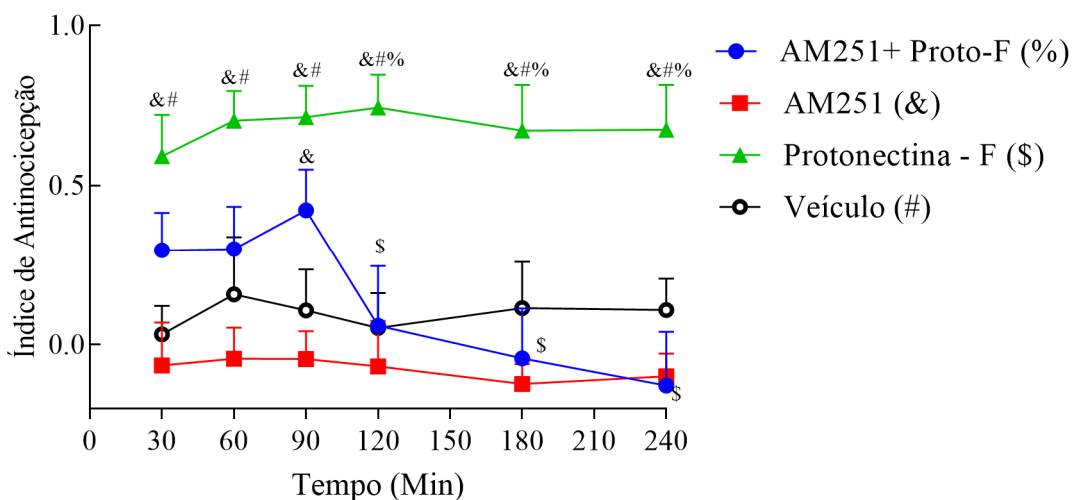


através de receptores acoplados à proteína G, denominados CB1 e CB2. A distribuição do receptor CB1 no Sistema Nervoso Central e a atividade no controle da liberação de neurotransmissores associados à nocicepção demonstra o papel central desse receptor no controle analgésico. Buscando avaliar o envolvimento do sistema canabinoide no efeito antinociceptivo da protonectina-F utilizou-se o antagonista seletivo de receptor CB1, AM 251, para verificar a possível ação inibitória do índice antinociceptivo no teste de placa quente, assim como foi observado com o antagonista não-seletivo do receptor opioide, cloridrato de naloxona. O resultado mostrou que na ausência de AM 251, o efeito antinociceptivo de protonectina-F foi observado ao longo de todo o experimento, como mostrado anteriormente. Na presença do antagonista AM 251 observou-se uma inibição estatisticamente significativa do efeito antinociceptivo da protonectina-F nos tempos 120, 180 e 240 min. Diferentemente à inibição observada com cloridrato de naloxona, houve uma variação temporal na inibição com AM 251. Apesar dos índices de antinocicepção serem menores nos tempos 30, 60 e 90 min, estes não apresentam diferença estatística significativa em relação à protonectina-F. Já nos tempos de 120, 180 e 240 min foi possível observar essa diminuição do efeito antinociceptivo em relação à protonectina-F.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o efeito antinociceptivo da protonectina-F é inibido na presença dos antagonistas do receptor opioide (cloridrato de naloxona) bem como do receptor canabinoide CB1 (AM 251), sugerindo que ambos os sistemas podem responder à presença do peptídeo. Vários relatos na literatura têm demonstrado uma interação entre os sistemas opioide e canabinoide. Os dois sistemas estão envolvidos na modulação da dor e sensações de prazer. Tanto o sistema opioide como canabinoide agem através de receptores

acoplados à proteína Gi, onde a interação ligante-receptor leva à inibição da síntese de cAMP, inibição de canais para cálcio voltagem-dependentes e à ativação de canais para potássio. Os receptores  $\mu$  e CB1, do sistema opioide e canabinoide respectivamente, co-localizam-se em diversas regiões do cérebro ligadas à modulação de dor e prazer (Área Tegmental Ventral e Núcleo Accumbens) e a atividade de ambos leva à antagonização dos efeitos inibitórios de neurônios GABAérgicos modulatórios de neurônios dopaminérgicos, o que resulta na elevação dos níveis de dopamina nestas regiões (Wenzel & Cheer 2018). A administração de agonistas canabinoides leva ao aumento da produção de opioides endógenos e vice-versa. Consistente com isso, receptores  $\mu$  e CB1 interagem fisicamente, formando heterodímeros (Wenzel & Cheer, 2018; Christie, 2006; Rios, 2006). Portanto, os sistemas opioide e canabinoide atuam sinergicamente na modulação de prazer e analgesia (Wenzel & Cheer, 2018).

O atraso no início do efeito inibitório de AM 251 sobre a protonectina-F, distinto do efeito do cloridrato de naloxona que inibiu a protonectina-F desde o primeiro tempo testado (30 min), sugere a possibilidade de uma maior afinidade da protonectina-F pelo receptor em relação ao AM251, ou uma possível degradação da protonectina-F. Além disso, a importância da participação dos receptores opioides ou de suas vias no efeito antinociceptivo da protonectina-F pode ser mais evidente quando comparado ao sistema canabinoide. Eventualmente, o bloqueio do sistema canabinoide promovido pela presença de AM 251 pode atenuar o efeito sinérgico com o sistema opioide, resultando num aumento do efeito inibitório observado aos 120 min.



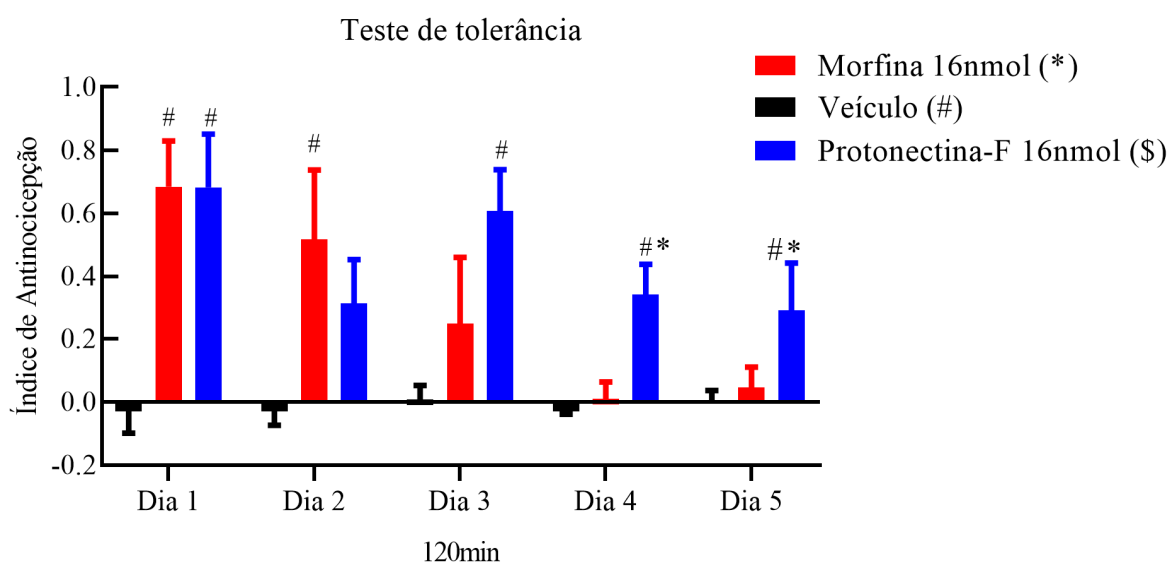
**Figura 13:** Inibição do efeito antinociceptivo da protonectina-F pelo antagonismo farmacológico de receptor canabinoide AM251 no teste de placa quente após infusão de ambos competidores pela via i.c.v em camundongos *Swiss*. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. (#) Diferença estatística em relação ao veículo  $p < 0,05$ . (%) Diferença significativa em relação a AM251 + protonectina-F 20  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . (&) Diferença significativa em relação a AM251 (7,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ). (\$) Diferença significativa em relação a protonectina-F 20  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . (#) Diferença significativa em relação ao veículo.

#### 4.5 Teste de tolerância da protonectina-F

Uma característica importante do uso prolongado de opioides é que seu potente efeito antinociceptivo é atenuado. Essa idiosincrasia limitante faz com que para se obter o mesmo potencial terapêutico sejam necessárias doses crescentes, elevando os riscos de causar efeitos adversos. Com o objetivo de avaliar se o efeito antinociceptivo da protonectina-F decaía com seu uso contínuo, foi feita uma avaliação comportamental após múltiplas administrações, denominado neste trabalho de teste de tolerância. Para isso, foi ofertado protonectina-F durante cinco dias consecutivos uma vez ao dia, por via i.c.v. Os camundongos *Swiss* foram submetidos ao teste térmico de placa quente durante os cinco dias de ensaio, avaliando o índice

de antinociceção após 30, 60, 90 e 120 minutos pós-administração. Os resultados foram comparados com veículo e sulfato de morfina, cujo efeito de tolerância já está bem caracterizado.

Optou-se por avaliar os dados referentes a 120 minutos pós-administração durante os cinco dias de teste por ser o tempo de efeito antinociceptivo máximo da protonectina-F (Figura 14). RM-ANOVA mostrou diferenças significativas entre os tratamentos [ $F(2,804, 39,25) = 5,320$ ;  $p=0,0042$ ], no tempo [ $F(2, 16) = 11,57$ ;  $p=0,0008$ ] e na interação tempo versus tratamento [ $F(8, 56) = 2,609$ ;  $p=0,0168$ ].



**Figura 14:** Índice de antinociceção no tempo de 120 minutos das latências de placa quente após infusão diária única por via i.c.v durante 05 dias em camundongos *Swiss*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) com o veículo (#), sulfato de morfina (\*) e protonectina-F (\$) estão indicadas acima.

Como anteriormente descrito, o efeito antinociceptivo de sulfato de morfina decaiu progressivamente ao longo dos cinco dias de tratamento. Após o primeiro e o segundo dia de administração, não houve uma redução significativa do efeito antinociceptivo do sulfato de morfina (Figura 14). A partir do terceiro dia pós-administração pode-se observar uma redução do I.A não havendo diferença significativa em relação ao veículo. Essa redução foi acentuada após o quarto e quinto dia de teste, similares aos efeitos observados com o veículo.

Os resultados do teste de tolerância realizado com a protonectina-F foram distintos em relação ao sulfato de morfina a partir do terceiro dia de teste (Figura 14). No primeiro dia, protonectina-F e sulfato de morfina apresentaram alto poder analgésico sendo estatisticamente diferentes em relação ao veículo. No segundo dia de teste, esta diferença estatística foi apenas observada com sulfato de morfina, mantendo o efeito antinociceptivo. Como já demonstrado em outros estudos, o uso contínuo de sulfato de morfina causa um decréscimo da resposta antinociceptiva. Neste estudo foi possível observar essa redução a partir do terceiro dia de teste. Contrariamente ao sulfato de morfina, a protonectina-F manteve sua ação antinociceptiva no terceiro dia de teste, mostrando uma diferença significativa em relação ao veículo. Nestes mesmos dias, apesar da redução do I.A. apresentada pela protonectina-F, a diferença manteve-se significativa não apenas em relação ao veículo, mas também em relação ao sulfato de morfina.

Os resultados mostraram que o efeito antinociceptivo da protonectina-F é menos susceptível a mecanismos de tolerância com o uso contínuo quando comparado ao sulfato de morfina. O mecanismo de tolerância induzido por sulfato de morfina possivelmente inclui dessensibilização dos receptores opioides na presença

contínua de agonistas. A ativação contínua pode levar à diminuição das respostas intracelulares em canais iônicos e vias de transdução de sinal. O efeito de tolerância causado pelo uso contínuo de sulfato de morfina, por exemplo, está relacionado à redução da ativação de canais para  $K^+$ , diminuição do efeito inibitório em canais para  $Ca^{2+}$ , diminuição do efeito inibitório da adenil ciclase e, portanto, aumento da concentração intracelular de cAMP e da atenuação na ativação da cascata regulatória de fosforilação por MAPK.

Muito dos efeitos bioquímicos de tolerância depende da natureza química do agonista e como este interage com o receptor opioide. Ou seja, diferentes agonistas interagem de formas diferentes com os receptores que por sua vez podem ter uma preferência por determinadas vias de respostas intracelulares. Os resultados distintos ao teste de tolerância entre sulfato de morfina e protonectina-F descritos neste trabalho sugerem que as interações entre estes dois agonistas são distintas.

A tolerância ao efeito antinociceptivo de opioides é um dos aspectos adversos no seu uso terapêutico, exigindo doses maiores para atingir o mesmo efeito analgésico. A utilização de doses crescentes e contínuas implica uma maior ativação de regiões cerebrais envolvidas com recompensa, gerando um mecanismo de reforço que acaba levando à adicção. A busca por alternativas que atenuem os efeitos adversos característicos de agonistas opioides teria um grande impacto em práticas de manejo de dor. Neste contexto, os resultados gerados neste trabalho mostram que a protonectina-F tem o potencial de contribuir no desenvolvimento de fármacos mais adequados e eficazes no manejo da dor.



## 5. CONCLUSÃO

Opioides e canabinoides são as substâncias mais antigas utilizadas pelo homem na redução dos efeitos algícos. O uso dessas substâncias e seus derivados tem sido eficaz no tratamento e em planos de manejo de dor, principalmente em casos de dores crônicas persistentes e de origem neuropática. Apesar da eficiência de opioides e canabinoides, o uso prolongado pode causar efeitos adversos que complicam e limitam o tratamento. A compreensão dos mecanismos farmacológicos que mitigam os efeitos da dor permite desenhar estratégias de ativação de vias antinociceptivas, minimizando a ativação de vias que geram efeitos adversos. Neste trabalho, protonectina-F, um peptídeo desenhado a partir do peptídeo protonectina da vespa *Parachartergus fraternus*, mostrou-se uma alternativa promissora. Quando administrado diretamente no Sistema Nervoso Central (via i.c.v) sua atividade antinociceptiva foi comparável ao de sulfato de morfina. No teste de competição realizado com um antagonista não-seletivo de receptor opioide, cloridrato de naloxona, a protonectina-F também apresentou uma inibição da resposta antinociceptiva, sugerindo que o mecanismo de ação do peptídeo está relacionado a via opioide, ou decorrente da ativação destes receptores ou relacionado a atividade de opioides endógenos. No entanto, o reduzido efeito apresentado por protonectina-F no teste de déficit motor (modelo *rotarod*) e a branda resposta no teste de tolerância sugerem que a protonectina-F pode atuar de modo diferente ao sulfato de morfina. Essa possibilidade é reforçada pela resposta ao antagonista seletivo de receptor canabinoide CB1, AM251. Na presença deste antagonista AM 251, o efeito antinociceptivo da protonectina-F é inibido aos 120 minutos do ensaio, bem posteriormente a atividade de inibição apresentada pelo mesmo teste realizado com



cloridrato de naloxona, que apresentou redução do I.A aos 30 minutos após infusão. Portanto, embora os efeitos antinociceptivos de sulfato de morfina e protonectina-F não apresentem diferenças estatísticas, ou seja, são similares quando administradas por via i.c.v, a protonectina-F apresenta uma grande vantagem por apresentar reduzidos efeitos adversos motores e de tolerância. Essa diferença entre a ação da protonectina-F e do sulfato de morfina pode ser explicada pela diferença entre as estruturas de ambas, afetando a interação com o receptor opioide, que por sua vez, afeta as vias intracelulares de ativação.

A tecnologia pode ser uma aliada na produção de fármacos eficazes no manejo da dor, com reduzidos efeitos adversos e baixo custo, na tentativa de garantir o acesso a todos aqueles que necessitam de tratamento especializado. Vale lembrar que aproximadamente 5,5 bilhões de pessoas não têm acesso a medicamentos analgésicos como morfina e codeína, segundo o Conselho Internacional de Controle de Narcóticos (2014).

Nesse contexto, a protonectina-F mostra-se como uma alternativa adequada e promissora diante desse cenário atual. É um peptídeo de 12 resíduos de aminoácidos, com eficácia analgésica no Sistema Nervoso Central comparável ao sulfato de morfina. Como anteriormente avaliado, na avaliação de descoordenação motora (*rotarod*) não apresentou déficit motor, bem como nos testes *in vitro* não apresentou hemólise mesmo nas doses mais altas submetida. Nos testes de tolerância aguda, a ação antinociceptiva permaneceu preservada quando comparada ao opioide juntamente testado. Assim sendo, a continuação das etapas de análises relacionada ao desenvolvimento de um novo fármaco, como segurança farmacológica da protonectina-F, bem como uma apresentação farmacológica adequada devem ser

testadas e aprimoradas. Outra forma relevante que a protonectina-F pode contribuir para o desenvolvimento da neurociência é no desenho de novos fármacos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, Frances V.; MELZACK, Ronald; SAMUEL, Charles. Morphine analgesia in the tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Experimental neurology*, v. 75, n. 3, p. 644-651, 1982.

AGARWAL, Nitin *et al.* Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature neuroscience*, v. 10, n. 7, p. 870, 2007.

AL-HASANI, Ream; BRUCHAS, Michael R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, v. 115, n. 6, p. 1363-1381, 2011.

ALREJA, M. MUTALIK, P., NAYAR, U., & MANCHANDA, S. K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. *Pain*, v. 20, n. 1, p. 97-105, 1984.

ALVES, Audrei de Oliveira; SPANIOL, Bárbara; LINDEN, Rafael. Canabinoides sintéticos: drogas de abuso emergentes. *Rev. Psiquiatr. Clín*, v. 39, n. 4, p. 142-148, 2012.

AYDEDE, Murat. Defending the IASP definition of pain. *The Monist*, v. 100, n. 4, p. 439-464, 2017.

AZEVEDO, Maristella de Oliveira; FELIPE, Maria Sueli Soares; BRÍGIDO, Marcelo de Macedo. *Técnicas básicas em biologia molecular*. 2003.

BAKER, David *et al.* The therapeutic potential of cannabis. *The Lancet Neurology*, v. 2, n. 5, p. 291-298, 2003.

BALLANTYNE, Jane C.; SULLIVAN, Mark D. The discovery of endogenous opioid systems: what it has meant for the clinician's understanding of pain and its treatment. *Pain*, 2017.

BANNON, Anthony W.; MALMBERG, Annika B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current protocols in neuroscience*, p. 8.9. 1-8.9. 16, 2007.

- BELEBONI, Renê Oliveira *et al.* Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from *Parawixia bistrata* spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine. *Molecular pharmacology*, v. 69, n. 6, p. 1998-2006, 2006.
- BOHN, Laura M. *et al.*  $\mu$ -Opioid receptor desensitization by  $\beta$ -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, v. 408, n. 6813, p. 720, 2000.
- BOURZAC, Katherine *et al.* Therapeutic developments: Masters of medicine. *Nature*, v. 545, n. 7654, p. S4-S9, 2017.
- BRUEL, Brian M.; BURTON, Allen W. Intrathecal therapy for cancer-related pain. *Pain Medicine*, v. 17, n. 12, p. 2404-2421, 2016.
- CHEN, Yan *et al.* Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Molecular Pharmacology*, v. 44, n. 1, p. 8-12, 1993.
- CHRISTIE, MacDonald J. Opioid and cannabinoid receptors: friends with benefits or just close friends?. *British journal of pharmacology*, v. 148, n. 4, p. 385-386, 2006.
- COUTINHO-NETTO, J. *et al.* The effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex in vivo and in vitro. *Journal of neurochemistry*, v. 35, n. 3, p. 558-565, 1980.
- DEVANE, William A. *et al.* A novel probe for the cannabinoid receptor. *Journal of medicinal chemistry*, v. 35, n. 11, p. 2065-2069, 1992.
- DEVANE, William A. *et al.* Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, v. 34, n. 5, p. 605-613, 1988.
- DHAWAN, B. N. *et al.* International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacological reviews*, v. 48, n. 4, p. 567-592, 1996.
- DI MARZO, Vincenzo *et al.* The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochemical Journal*, v. 331, n. 1, p. 15-19, 1998.
- DI MARZO, Vincenzo *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, v. 372, n. 6507, p. 686, 1994.

DI, S. *et al.* Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *J Physiol, London*, v. 569, n. 569, p. 751–760, Dec. 2005

DUBUISSON, David; DENNIS, Stephen G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, v. 4, p. 161-174, 1977.

FELDER, Christian C.; DICKASON-CHESTERFIELD, Amy K.; MOORE, Steven A. Cannabinoids biology: the search for new therapeutic targets. *Molecular Interventions*, v. 6, n. 3, p. 149, 2006.

FMI 2010 (Fundo monetário internacional).  
<http://www.imf.org/external/pubs/ft/weo/2010/02/weodata/index.aspx>. Acessado em 01/08/2017

FONTANA, Andréia Cristina Karklin *et al.* Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *British journal of pharmacology*, v. 139, n. 7, p. 1297-1309, 2003.

FOX, Alyson *et al.* The role of central and peripheral cannabinoid 1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*, v. 92, n. 1, p. 91-100, 2001.

GALANTE, P. Identificação e avaliação do efeito antinociceptivo da protonectina natural e modificada da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. vii, 81 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) —Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

GAONI, Yechiel; MECHOULAM, Raphael. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GASKIN, Darrell J.; RICHARD, Patrick. The economic costs of pain in the United States. *The Journal of Pain*, v. 13, n. 8, p. 715-724, 2012.

GILL, E. W. The effects of cannabinoids and other CNS depressants on cell membrane models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 281, n. 1, p. 151-161, 1976.

GRAY, EsG; WHITTAKER, V. P. The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *Journal of anatomy*, v. 96, n. Pt 1, p. 79, 1962.

HANUŠ, Lumír *et al.* 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 7, p. 3662-3665, 2001.

HARTREE, E. Fo. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry*, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HENSCHKE, Nicholas; KAMPER, Steven J.; MAHER, Chris G. The epidemiology and economic consequences of pain. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 2015. p. 139-147.

HERKENHAM M, MACKIE K, MARTIN BR, *et al.* (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161– 202

HERKENHAM, M. *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington (DC), v. 87, p. 1932–1936, 1990

HESCHELER, J. *et al.* The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature*, London, v. 325, n. 6103, p. 445–447, Feb. 1987.

HOHMANN, A. G. *et al.* Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res*, Amsterdam, v. 822, n. 1-2, p. 17–25, Mar, 1999.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS Journal*, 8: E693–E708, 2006.

HOOK, Vivian *et al.* Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 48, p. 393-423, 2008.

- HOWLETT, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.
- HOWLETT, Allyn C. *et al.* Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, v. 47, p. 345-358, 2004.
- HUANG, S. M. *et al.* An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA, Washington (DC)*, v. 99, n. 12, p. 8400–8405, Jun. 2002
- HUNSKAAR, S; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.
- JONES, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra R. S, Hord, A. H, Ginsberg B, Preble L. *Acute Pain: Mechanisms & Management*. St. Louis: Mosby–Year Book, 1992.
- JULIUS, D. & BASBAUM, A. I. Molecular mechanism of nociception. *Nature*, 413(September), 203-210. 2001.
- JULIUS, D. & McCLESKEY, E. W. Cellular and molecular properties of primary afferent neurons. *Wall & Melzack`s textbook of pain*. Elsevier 5<sup>a</sup> ed. 2006.
- KAVALIERS M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res Bull* 21:923–931. 1988
- KIM, Jimok *et al.* Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 23, p. 10182-10191, 2002.
- KONERU, Anupana; SATYANARAYANA, Sreemantula; RIZWAN, Shaik. Endogenous opioids: their physiological role and receptors. *Global J Pharmacol*, v. 3, n. 3, p. 149-153, 2009.
- LAW, Ping-Yee; WONG, Yung H.; LOH, Horace H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 40, n. 1, p. 389-430, 2000.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.

- LI, Ling-Yuan; CHANG, Kwen-Jen. The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Molecular pharmacology*, v. 50, n. 3, p. 599-602, 1996.
- LOESER, John D.; MELZACK, Ronald. Pain: an overview. *The lancet*, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.
- LOWRY, Oliver H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LUTZ, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, v. 66, n. 2-3, p. 123-142, 2002.
- MACKIE, Ken; STELLA, Nephi. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *The AAPS journal*, v. 8, n. 2, p. E298-E306, 2006.
- MANZANARES, Jorge *et al.* Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 20, n. 7, p. 287-294, 1999.
- MARTINS, M. A.; DE CASTRO BASTOS, L. & TONUSSI, C. R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *The journal of pain*, v. 7, n. 2, p. 100-107, 2006.
- MARTINS, Rodrigo Tomazini *et al.* Receptores opioides até o contexto atual. *Revista Dor*, v. 13, n. 1, p. 75-79, 2012.
- MATSUDA, Lisa A. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, n. 6284, p. 561, 1990.
- MECHOULAM, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol, Oxford*, v. 50, n. 1, p. 83–90. Jun. 1995.
- MELVIN, Lawrence S.; JOHNSON, M. Ross. Structure-activity relationships of tricyclic and nonclassical bicyclic cannabinoids. *NIDA Res Monogr*, v. 79, p. 31-47, 1987.
- MONGE-FUENTES, Victoria *et al.* Arthropod toxins and their antinociceptive properties: From venoms to painkillers. *Pharmacology & therapeutics*, 2018.



MORTARI, M. R & CUNHA, A. O. S. New perspectives in drug Discovery using neuroactive molecules from the venom of arthropods. An integrative view of molecular recognition and toxinology- From analytical procedures to biomedical application. 91-117. 2013.

MUNRO, Sean; THOMAS, Kerrie L.; ABU-SHAAR, Muna. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NORTH, R. A. *et al.* Mu and delta receptors belong to a family of receptors that couple to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington (DC)*, v. 84, n. 15, p. 5487–5491, Aug.1987.

OK, Hwoe Gyeong *et al.* Can oliceridine (TRV130), an ideal novel  $\mu$  receptor G protein pathway selective ( $\mu$ -GPS) modulator, provide analgesia without opioid-related adverse reactions? *The Korean journal of pain*, v. 31, n. 2, p. 73, 2018.

OMS (WHO) guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. World Health Organization (2012).

PACHER, P. *et al.* The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev, Bethesda (MD)*, v. 58, n.3, p. 389-462, Sep. 2006.

PASTERNAK, Gavril W.; PAN, Ying-Xian. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological reviews*, v. 65, n. 4, p. 1257-1317, 2013.

PATHAN, Hasan; WILLIAMS, John. Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain*, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2012.

PERTWEE, Roger G. Cannabinoid receptors and pain. *Progress in neurobiology*, v. 63, n. 5, p. 569-611, 2001.

PETROCELLIS, Luciano De; CASCIO, Maria Grazia; MARZO, Vincenzo Di. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British journal of pharmacology*, v. 141, n. 5, p. 765-774, 2004.

PIERONI, João Paulo *et al.* Terceirização da P&D de Medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil. *BNDES Setorial, Rio de Janeiro*, n. 29, p. 131-158, 2009.

- PIOMELLI, Daniele. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 4, n. 11, p. 873, 2003.
- PONTALTI, Gislene *et al.* Via subcutânea: segunda opção em cuidados paliativos. *Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 32, n. 2 (2012), p. 199-207, 2012.*
- PORTER, Amy C. *et al.* Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 301, n. 3, p. 1020-1024, 2002.
- RAJA, S. N., MEYER, R. A., RINGKAMP, M. & CAMPBELL, J. N. Peripheral neural mechanism of nociception. *Textbook of Pain*, 11-58. 1999
- RANDOLPH, B. C.; PETERS, M. A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesthesia progress*, v. 44, n. 1, p. 11, 1997.
- RASMUSSEN, Kurt; WHITE, David A.; ACRI, Jane B. NIDA's medication development priorities in response to the Opioid Crisis: ten most wanted. *Neuropsychopharmacology*, v. 44, n. 4, p. 657, 2019.
- REARDON, Sara. How digital drug users could help to halt the US opioid epidemic. *Nature*, v. 560, p. 295-297, 2018.
- RHEE, Man-Hee *et al.* Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *Journal of neurochemistry*, v. 71, n. 4, p. 1525-1534, 1998.
- RHIM, H.; MILLER, R. J. Opioid receptors modulate diverse types of calcium channels in the nucleus tractus solitaries of the rat. *J. Neurosci, Washington (DC)*, v. 14, n. 12, p. 7608– 7615, Dec.1994.
- RIOS, Carl; GOMES, Ivone; DEVI, Lakshmi A.  $\mu$  opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *British journal of pharmacology*, v. 148, n. 4, p. 387-395, 2006.
- RUVIARO, L. F. & FILLIPIN, L. I. Prevalência de dor crônica em uma Unidade Básica de Saúde de cidade de médio porte. *Rev. dor*, 13(2), 128-131. 2012.

RYBERG, Erik *et al.* Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS letters*, v. 579, n. 1, p. 259-264, 2005.

SAITO, Viviane M.; WOTJAK, Carsten T.; MOREIRA, Fabrício A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 32, n. suppl 1, p. 57-514, 2010.

SEIC – Sociedade espanhola de investigação sobre canabinoides – 2013.<http://www.seic.es/wp-content/uploads/2013/10/guiab%C3%A1sicacannab.pdf> (Acessado em 01/08/2017).

SHARMA, S. K. *et al.* Opiate dependent modulation of adenylate cyclase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington (DC), v. 74, n. 8, p. 3365–3369, Aug.1977.

SHIBATA, M., TAKAHASHI, H., & INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *pain*, v. 38, n. 3, p. 347-352, 1989.

SHIRE, David *et al.* An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 8, p. 3726-3731, 1995.

SILVA, J. C., LIMA-SARAIVA, S. R. G., OLIVEIRA-JUNIOR, R. G., & ALMEIDA, J. R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmacy*, 94, 18-23. 2013.

SILVA, Juliana *et al.* Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins*, v. 7, n. 8, p. 3179-3209, 2015.

SINDRUP, S. H. & JENSEN, T. S. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain*, 389-400. 1999.

SNYDER, Solomon H.; PASTERNAK, Gavril W. Historical review: opioid receptors. *Trends in pharmacological sciences*, v. 24, n. 4, p. 198-205, 2003.

- SOUSA, F. A. E. F. Dor: O quinto sinal vital. *Rev. Latino-Americana de Enfermagem*, 10(3), 446-7. 2002.
- SPELLER, Julie M.; WESTBY, GW Max. Bicuculline-induced circling from the rat superior colliculus is blocked by GABA microinjection into the deep cerebellar nuclei. *Experimental brain research*, v. 110, n. 3, p. 425-434, 1996.
- STAROWICZ, Katarzyna; MALEK, Natalia; PRZEWLOCKA, Barbara. Cannabinoid receptors and pain. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, v. 2, n. 3, p. 121-132, 2013.
- SUGIURA, T. *et al.* 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 215, n. 1, p. 89-97, Oct. 1995.
- TRESCOT, Andrea M. *et al.* Opioid pharmacology. *Pain physician*, v. 11, n. 2 Suppl, p. S133-53, 2008.
- TURK, D. C. & OKIFUGI, A. J. *Consult Clin Psych* 70(3): 678-690. 2002
- VARGAS-SCHAFFER, Grisell. Is the WHO analgesic ladder still valid?: Twenty-four years of experience. *Canadian Family Physician*, v. 56, n. 6, p. 514-517, 2010..
- VARMA, N. *et al.* Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in the hippocampus. *J Neurosci*, Washington (DC), v. 21, n. 24, p. 1-5, Dec. 2001.
- WALDHOER, Maria; BARTLETT, Selena E.; WHISTLER, Jennifer L. Opioid receptors. *Annual review of biochemistry*, v. 73, n. 1, p. 953-990, 2004.
- WENZEL, J. M.; CHEER, J. F. Endocannabinoid regulation of reward and reinforcement through interaction with dopamine and endogenous opioid signaling. *Neuropsychopharmacology*, v. 43, n. 1, p. 103, 2018.
- WIERMANN, Evanius Garcia *et al.* Consenso Brasileiro sobre manejo da dor relacionada ao câncer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica* □ Vol, v. 10, n. 38, 2014.

WITTING, A. *et al.* P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington (DC), v. 101, n. 9, p. 3214–3219, Mar. 2004.

ZAGON, Ian S.; WU, Yan; MCLAUGHLIN, Patricia J. The opioid growth factor, [Met5]-enkephalin, and the  $\zeta$  (zeta) opioid receptor are present in human and mouse skin and tonically act to inhibit DNA synthesis in the epidermis. *Journal of investigative dermatology*, v. 106, n. 3, p. 490-497, 1996.

ZUKIN S. R., YOUNG A. B. &SNYDER S. H. (1974)  $\gamma$ -Aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. *Proc. natn. Acad. Sci.. U.S.A.* 71. 4802-4807.