

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**Indiara Brusco**

**POTENCIALIZAÇÃO DA SÍNDROME DOLOROSA INDUZIDA  
POR PACLITAXEL PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA  
DE ANGIOTENSINA E O ENVOLVIMENTO DAS CININAS**

**Santa Maria, RS**

**2016**

**Indiara Brusco**

**POTENCIALIZAÇÃO DA SÍNDROME DOLOROSA INDUZIDA POR  
PACLITAXEL PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA E O ENVOLVIMENTO DAS CININAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Sara Marchesan de Oliveira

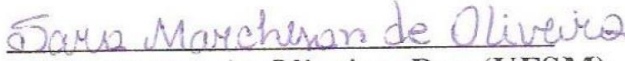
Santa Maria, RS  
2016

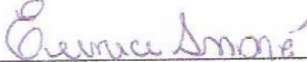
**Indiara Brusco**


**POTENCIALIZAÇÃO DA SÍNDROME DOLOROSA INDUZIDA POR  
PACLITAXEL PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA E O ENVOLVIMENTO DAS CININAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

**Aprovado em 23 de fevereiro de 2016:**

  
Sara Marchesan de Oliveira, Dra (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

  
Eunice André, Dra (UFPR)

  
Jonatas Zeni Klafke, Dr. (UNICRUZ)

**Santa Maria, RS**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, minha fonte de segurança, que sempre iluminou e guiou meus caminhos para que o melhor acontecesse.

À minha orientadora Sara Marchesan de Oliveira primeiramente pela oportunidade e por ter acreditado em mim. Por se mostrar sempre disponível em ajudar, pela compreensão e paciência em esclarecer as dúvidas, por todos os ensinamentos e pela excelente orientação e exemplo, além da amizade.

À minha família, que sempre me incentivou a seguir meus passos com honestidade, dignidade e amor. Ao meu pai Romualdo que da sua forma, demonstrou orgulho pelas minhas conquistas e torceu pela minha felicidade. À minha mãe Inês por me ouvir, por torcer e rezar por mim, pela paciência e conforto nos momentos difíceis e por vibrar de alegria comigo quando coisas boas aconteciam. À minha irmã Raquel pelo exemplo e carinho em todos os momentos. Mãe, pai e mana, a vocês meu amor e gratidão.

A todos meus colegas e amigos do Lab Neuro com os quais dividi bons momentos. Ao nosso grupo de pesquisa que é muito unido e divertido, obrigado pela ótima convivência diária.

À minha amiga e companheira de apartamento Juliana, que embarcou comigo nesse sonho desde o princípio, obrigada pela parceria.

Agradeço ainda à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade.

Enfim, a todos que de alguma forma ou de outra contribuíram para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal. Muito Obrigada!!

## RESUMO

### POTENCIALIZAÇÃO DA SÍNDROME DOLOROSA INDUZIDA POR PACLITAXEL PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E O ENVOLVIMENTO DAS CININAS

AUTORA: Indiara Brusco

ORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

O paclitaxel é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos. No entanto ele causa efeitos adversos que limitam a sua utilização, como a síndrome de dor aguda e a neuropatia sensorial periférica. Essas alterações sensoriais levam à redução da dose ou a interrupção da quimioterapia comprometendo a qualidade de vida dos pacientes. Entre os mecanismos envolvidos na dor neuropática está a ativação dos receptores de cininas. A ativação desses receptores desencadeia nocicepção e resposta inflamatória. Além disso, a sinalização desses receptores pode ser potencializada por inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), os quais inibem a degradação das cininas. Embora estudos demonstrem o envolvimento das cininas na neuropatia induzida por paclitaxel, não há estudos sobre seu papel no estado doloroso agudo induzido por esse quimioterápico. Além disso, não se conhece a relação entre os receptores de cininas e a hipersensibilidade dolorosa aguda e crônica causada por paclitaxel durante a inibição da ECA. Desta forma, avaliou-se o papel dos receptores de cininas e o efeito da inibição da ECA na síndrome dolorosa aguda e neuropática associada ao paclitaxel. Para indução do estado doloroso agudo e crônico os camundongos receberam administrações únicas ou repetidas de paclitaxel, respectivamente. O papel dos receptores de cininas foi investigado com o uso de antagonistas desses receptores. Para investigar o efeito da inibição da ECA na síndrome dolorosa induzida por paclitaxel os animais receberam uma baixa dose de paclitaxel plus Enalapril (inibidor da ECA). A hiperalgesia mecânica foi avaliada por meio dos filamentos de von Frey e a nocicepção espontânea pelo tempo de lambida de pata induzida por agonistas dos receptores B<sub>1</sub> (bradicinina) e B<sub>2</sub> (des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina). Foi avaliada ainda a expressão do receptor B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> no nervo ciático, assim como, os níveis de peptídeos relacionados à bradicinina e a atividade da ECA no tecido plantar, soro e nervo ciático dos animais. Observamos que a administração aguda e crônica de paclitaxel causou hiperalgesia mecânica e comportamento nociceptivo espontâneo que foi reduzido pelos antagonistas do receptor B<sub>1</sub> (DALBk e SSR240612) e do receptor B<sub>2</sub> (Hoe140 e FR173657). Além disso, o inibidor da ECA potencializou a hiperalgesia mecânica induzida por uma baixa dose de paclitaxel. Do mesmo modo a injeção de paclitaxel inibiu a atividade da ECA no nervo ciático e no tecido plantar, aumentou a expressão do receptor B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> no nervo ciático, bem como, aumentou os níveis de peptídeos relacionados à bradicinina no tecido plantar. Em conjunto, nossos resultados suportam o envolvimento dos receptores de cininas na hipersensibilidade dolorosa aguda e neuropática induzida por paclitaxel e sugerem o potencial terapêutico dos antagonistas dos receptores de cininas para o tratamento desta síndrome. Uma vez que, a hipertensão é co-morbidade mais comum que afeta pacientes com câncer, o seu tratamento com inibidores da ECA em pacientes submetidos ao quimioterápico paclitaxel deve ser revisto, já que poderia potencializar a síndrome dolorosa induzida por ele.

**Palavras-chave:** Quimioterapia. Bradicininina. Neuropatia. Hiperalgesia Mecânica. Nocicepção Espontânea.

## ABSTRAT

### POTENTIATION OF PACLITAXEL-INDUCED PAIN SYNDROME BY ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME INHIBITION AND INVOLVEMENT OF KININS

AUTHORA: INDIARA BRUSCO

ADVISORA: SARA MARCHESAN DE OLIVEIRA

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of solid tumors. However, it causes adverse effects that limit their use, such as acute pain syndrome and peripheral sensory neuropathy. These sensory changes lead to dose reduction or discontinuation of therapy compromising the quality of life of patients. Among the mechanisms involved in neuropathic pain is activation of kinin receptors. The activation these receptors trigger nociceptive and inflammatory responses. Moreover, the signaling these receptors can be enhanced by angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors which inhibit the degradation of kinins. Although studies have shown the involvement of kinins on paclitaxel-induced neuropathy, there are no studies on its role in acute painful syndrome caused by this chemotherapy. Furthermore, it is not known the relationship between the kinin receptors and the acute or chronic hypersensitivity caused by paclitaxel during ACE inhibition. Thus, we evaluated the role of kinin receptors and the effect of the ACE inhibition on acute and neuropathic pain syndrome associated with paclitaxel. For induction of acute and chronic painful syndrome mice received single or repeated administration of paclitaxel, respectively. The role of kinin receptors was investigated using antagonists of these receptors. In order to investigate the effect of the ACE inhibition on paclitaxel-induced painful syndrome the animals received a low dose of paclitaxel plus enalapril (ACE inhibitor). Mechanical hyperalgesia was assessed using the von Frey filaments and the spontaneous nociception by time of paw licking induced by B<sub>1</sub> (Bradykinin) and B<sub>2</sub> (des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin) receptors agonists. It was also evaluated the expression of the B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the sciatic nerve, the bradykinin-related peptides levels and ACE activity in plant tissue, serum and sciatic nerves of animals. We observed that paclitaxel caused mechanical hyperalgesia and spontaneous nociceptive behaviour that was reduced by antagonists of kinin receptors B<sub>1</sub> (DALBk and SSR240612) and B<sub>2</sub> (Hoe140 and FR173657). Moreover, the ACE inhibitor enhanced the mechanical hyperalgesia induced by a low dose of paclitaxel. Likewise, paclitaxel injection inhibited ACE activity in the sciatic nerve and in the plantar tissue, increased expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the sciatic nerve and increased bradykinin-related peptides levels in the plantar tissue. Together, our data support the involvement of kinin receptors in the acute or chronic pain hypersensitivity paclitaxel-induced and suggest kinin receptor antagonists to treat this painful syndrome. Because hypertension is the most frequent co-morbidity affecting cancer patients, treatment of hypertension with ACE inhibitors in patients undergoing paclitaxel chemotherapy should be reviewed, since ACE inhibitors could enhance the paclitaxel-induced pain syndrome.

**Key words:** Chemotherapy. Bradykinin. Neuropathy. Mechanical Hyperalgesia. Spontaneous Nociception.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bk	Bradicinina
Ca <sup>2</sup>	Cálcio
CIPN	Síndrome de Dor Neuropática Crônica Associada ao Paclitaxel
CX3CL1	Quimiocina- Fractalkine
DABk	Des-Arg <sup>9</sup> -bradicinina
DALBk	Des-Arg <sup>9</sup> [Leu <sup>8</sup> ]-bradicinina
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FAPGG	(N- [3- (2-furyh) -acriloil] -L-phenylalanylglycylglycine)
g	Gramas
h	Horas
HSP 90	Proteína de Choque Térmico 90
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
KDa	Kilodalton
MAP –quinase	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mg/mL	Miligrama/mililitro
mg/kg	Miligrama/kilograma
min	Minutos
µL	Micro litro
NFκB	Fator Nuclear kappa B
nmol/kg	Nano mol/kg
P-APS	Síndrome de Dor Aguda Associada ao Paclitaxel
PBS	Salina Tamponada Fostatada
TLR 4	Receptor do Tipo Toll 4
TPA 1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
TRV4	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 4
v.o.	Via Oral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	8
<b>2 OBJETIVOS</b>	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	11
3.1 DOR E NOCICEPÇÃO	11
3.2 DOR ASSOCIADA AO PACLITAXEL	15
3.3 SISTEMA CALICREÍNA-CININAS	19
<b>4 MANUSCRITO CIENTÍFICO</b>	26
Abstrat	28
Introduction	29
Results	30
Discussion	32
Methods	36
References	40
<b>5 CONCLUSÃO</b>	53
<b>6 PERSPECTIVAS</b>	55
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	56
<b>8 ANEXO A</b>	65



## 1 INTRODUÇÃO

O paclitaxel (Taxol®) é um agente quimioterápico amplamente utilizado para tratar a proliferação de células cancerosas de vários tipos de tumores sólidos (GUASTALLA; DIÉRAS, 2003; GORNSTEIN; SCHWARZ, 2014). No entanto, o seu uso está associado a uma síndrome de dor aguda, que se desenvolve nos primeiros dias de tratamento, e afeta grande proporção de pacientes, causando morbidade (LOPRINZI et al., 2007; REEVES et al., 2012; RIGO et al., 2013; ROWINSKY et al., 1993). Além disso, o paclitaxel provoca neuropatia sensorial periférica, caracterizada por dor espontânea, hiperalgesia mecânica, dormência e formigamento das extremidades distais, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes (FOROSYTH et al., 1997; OCHIISHI et al., 2014; RIGO et al., 2013; ROWINSKY et al., 1993; SISIGNANO et al., 2014).

Os sintomas sensoriais durante o tratamento com paclitaxel podem afetar negativamente o tratamento antineoplásico, uma vez que, geralmente levam a uma redução da dose ou a interrupção do tratamento com o quimioterápico (DOUGHERTY et al., 2004; POLOMANO et al., 2001). Apesar da investigação de diversas terapias para a prevenção e/ou tratamento da dor aguda e neuropática, até o momento não há terapias comprovadas para estas situações (LOPRINZI et al., 2011; PACHMAN et al., 2011). Desta forma, modelos animais estão sendo desenvolvidos para elucidar os mecanismos envolvidos na síndrome dolorosa induzida por paclitaxel (COSTA et al., 2011; POLOMANO et al., 2001; RIGO et al., 2013).

Tem sido mostrado o envolvimento de receptores de cininas na dor aguda e neuropática induzida por diferentes modelos (FERREIRA et al., 2005, 2008; GABRA; SIROIS, 2002; LAI et al., 2006; QUINTÃO et al., 2008; WERNER et al., 2007) e por quimioterápicos (BUJALSKA et al., 2008; BUJALSKA, MAKULSKA-NOWAK, 2009; COSTA et al., 2011). Embora estudos demonstrem o envolvimento das cininas na neuropatia induzida por paclitaxel (COSTA et al., 2011), não há estudos sobre seu papel na dor aguda induzida por este quimioterápico.

As cininas são potentes peptídeos algogênicos endógenos que atuam através da ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (CALIXTO et al., 2000; HIRATE et al., 2006). Os receptores B<sub>2</sub> medeiam à maioria dos efeitos fisiológicos das cininas na nocicepção e na resposta inflamatória e são expressos de um modo constitutivo em todos os tecidos periféricos e centrais. Este receptor exibe uma elevada afinidade para a bradicinina (Bk) e calidina (FERREIRA et al., 2002; MOREAU et al., 2005). Por outro lado, os receptores B<sub>1</sub> são normalmente ausentes ou sub-expressos e são regulados

positivamente durante algum processo inflamatório e após lesão tecidual; eles são ativados pelos metabólitos das cininas des-Arg<sup>9</sup>-Bk (DABk) e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-Bk (CALIXTO et al., 2004; FOX et al., 2003). A ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> desencadeia nocicepção espontânea (dor independente de estímulo), hiperalgesia (aumento da resposta a um estímulo que normalmente é doloroso) e alodínia (dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor) (LOESER; TREEDE, 2008) em humanos e em modelos de animais experimentais (CALIXTO et al., 2001; DRAY; PERKINS, 1997; FERREIRA et al., 2002).

A bradicinina pode ser clivada em metabólitos inativos pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (CASSIM et al., 2002; ERDÖS et al., 2010). Estudos prévios demonstraram que inibidores da ECA potencializam a sinalização do receptor B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas (ERDÖS et al., 2010). Além disso, uma das co-morbidades mais comuns que afeta pacientes com câncer é a hipertensão, que atinge aproximadamente 34% desses pacientes e é amplamente tratada com inibidores da ECA. Uma vez que, o paclitaxel provoca uma síndrome dolorosa caracterizada por dores agudas e neuropatia sensorial periférica e inibidores da ECA impedem a degradação das cininas o efeito da inibição da ECA poderia potencializar o estado doloroso induzido por paclitaxel (MANCIA et al., 2013; REYES-GIBBY et al., 2009).

Assim, é importante elucidar os mecanismos envolvidos na síndrome dolorosa aguda e neuropática crônica induzida por paclitaxel, bem como investigar se o uso de inibidores da ECA combinado a esse quimioterápico pode potencializar esta síndrome dolorosa. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas e o efeito da inibição da ECA na hipersensibilidade dolorosa aguda e crônica induzida por paclitaxel, assim como apontar o potencial dos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas no tratamento desta síndrome dolorosa.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o envolvimento dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas e o efeito da inibição da ECA na hipersensibilidade dolorosa aguda e crônica induzida por paclitaxel em camundongos, bem como, apontar uma alternativa terapêutica para tratá-la.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1 Avaliar o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pela administração aguda (única) ou crônica (repetida) de paclitaxel;

2.2.2 Investigar o papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas na hipersensibilidade dolorosa aguda e crônica induzida por paclitaxel.

2.2.3 Avaliar o efeito da inibição da ECA na hipersensibilidade dolorosa aguda e crônica induzida por paclitaxel.

2.2.4 Apontar o potencial terapêutico dos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas no tratamento da síndrome dolorosa aguda e crônica associada ao paclitaxel.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é uma experiência individual subjetiva que envolve a percepção de um estímulo aversivo. É composta de dimensões sensoriais, afetivas e cognitivas (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Sua origem e seu duplo papel como uma função fisiológica fundamental e por outro lado, como uma doença debilitante tem fascinado os cientistas durante séculos (KUNER, 2010). O termo dor é classicamente definido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (“IASP”-International Association for the Study of Pain) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão”. Já a nocicepção é um termo fisiológico que se refere ao componente sensorial da dor e compreende os processos neurais de codificação e processamento dos estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008; NAVRATILOVA et al., 2010).

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo (WOOLF, 2010). Desta forma, a dor é um recurso fundamentalmente desagradável de proteção, uma vez que sua aversão, ou seja, sua dimensão afetiva promove a retirada de estímulos prejudiciais aos tecidos e inibe ações que poderiam prejudicar ainda mais as áreas lesadas (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Porém, mesmo que a dor normalmente funcione como uma resposta de alerta e de caráter adaptativo, ela pode se tornar um sintoma debilitante (WOOLF, 2010). Essa condição surge quando a dor que ocorre após uma lesão aguda persiste além do processo natural de cura e se estende além de sua utilidade de proteção (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Neste caso, a dor é mal adaptada e acredita-se resultar do funcionamento anormal do sistema nervoso e por isso apresenta uma característica patológica (GRACE et al., 2014). Desta forma, ela pode levar a implicações em diversos níveis como psicológico e emocional, social, fisiológico e também econômico (KING; FRASER, 2013; NAVRATILOVA; PORRECA, 2014).

Comumente a dor é definida como aguda ou crônica. A dor aguda refere-se à dor de início recente e de duração provavelmente limitada que geralmente tem uma relação temporal e causal identificável (READY; EDWARDS, 1992; RUSSO; BROSE, 1998). Apresenta função biológica de preservação da integridade e da defesa, sendo consequência de uma lesão ou iminência de lesão tecidual (JULIUS; BASBAUM, 2001). Já a dor crônica geralmente persiste além do tempo de cura de uma lesão ou

quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. Frequentemente, a dor crônica pode não ter causa claramente identificável (ASHBURN; STAATS, 1999; MACINTYRE, 2010; READY; REDWARDS, 1992; RUSSO; BROSE, 1998). Além disso, é um dos principais fatores que levam à incapacidade e intensa redução da qualidade de vida dos pacientes (JULIUS; BASBAUM 2001). Ainda, a dor crônica pode estar associada com prejuízos afetivos e cognitivos, tais como ansiedade, depressão, anedonia e déficits de aprendizagem (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014).

À nível de sistema nervoso periférico e central, vários mecanismos moleculares e celulares operam isoladamente ou em combinação para produzir diferentes formas de dor, as quais podem ser nociceptiva, inflamatória ou neuropática (SCHOLZ; WOOLF 2002). A dor nociceptiva está associada à proteção fisiológica do organismo em circunstâncias que podem causar dano potencial aos tecidos (WOOLF, 2010). Este tipo de dor ocorre em resposta a estímulos nocivos e continua apenas na presença mantida deles. É a dor que nos alerta a estímulos como uma picada de agulha ou quando tocamos algo muito quente ou muito frio (TORRES et al., 2006). A perda da capacidade em detectar estímulos nociceptivos, como em doenças hereditárias associadas à insensibilidade congênita à dor (COX et al., 2006; INDO, 2001), leva a lesões repetidas e auto mutilação, o que demonstra a função altamente adaptável e importante deste tipo de dor (COSTIGAN et al., 2009).

Para que ocorra o processamento dos estímulos nociceptivos, sejam eles mecânicos, térmicos ou químicos é necessária a ativação de nociceptores que são terminações nervosas livres de neurônios nociceptivos capazes de traduzir e codificar estímulos nocivos e de transmitir estas informações até estruturas supra-espinhais envolvidas na percepção da dor (WOOLF; MA, 2007; WOOLF, 2010). O corpo celular dos neurônios nociceptivos está localizado em diferentes gânglios, como o gânglio da raiz dorsal que se dirige para o corpo (tronco e membros), o gânglio nodoso até as vísceras e o gânglio do trigêmio que se dirige para a face (cabeça, cavidade oral e pescoço) (MANTYH et al., 2006; BASBAUM et al., 2009). A partir de cada gânglio da raiz dorsal origina-se um axônio que se divide em dois troncos, sendo que um deles se dirige para os tecidos periféricos e o outro para a medula espinhal no caso dos nervos espinhais ou para o tronco encefálico no caso dos nervos cranianos (DEVOR, 1999).

Baseado em critérios anatômicos e funcionais, diferentes tipos de fibras são capazes de conduzir estímulos sensoriais (BASBAUM et al., 2009). Essas fibras aferentes sensoriais são as fibras A $\beta$ , fibras A $\delta$  e fibras C. As fibras A $\beta$  são fibras

mielinizadas, de grande diâmetro, apresentam velocidade de condução muito rápida, respondem a estímulos de baixo limiar (não-nocivos) e estão envolvidas na propriocepção. Apesar de estas fibras serem especializadas na detecção de estímulos inócuos como o tato, elas também são capazes de transmitir impulsos nervosos nociceptivos, por exemplo, após uma alteração nervosa causada por agentes quimioterápicos. Por outro lado, corpos celulares de médio diâmetro incluem as fibras A $\delta$  as quais são levemente mielinizadas e com velocidade de condução rápida. Já as fibras C são fibras não mielinizadas, de pequeno diâmetro e possuem velocidade de condução lenta do estímulo doloroso. Tanto as fibras A $\delta$  quanto as fibras C estão envolvidas na nocicepção mecânica, térmica ou química, bem como, na neuropatia induzida por quimioterápicos (BASBAUM et al 2009; GRACE et al., 2014; JULIUS; BASBAUM, 2001; MANTHY, 2006).

Desta forma, sendo os nociceptores terminações periféricas de axônios oriundos de neurônios sensoriais nociceptivos, cujos corpos celulares estão no gânglio da raiz dorsal (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010), eles atuam como neurônios de primeira ordem que conduzem estímulos dolorosos a partir da periferia até o sistema nervoso central (MANTHY, 2006; GRACE et al., 2014). Primeiramente, após os nociceptores serem ativados, a informação sensorial é transmitida, via potenciais de ação, da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, principalmente para as lâminas I, II e IV. Quando o potencial de ação alcança terminações pré-sinápticas na medula espinhal, ocorre a abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem com conseqüente influxo de cálcio e liberação de neurotransmissores excitatórios, principalmente substância P e glutamato na medula espinhal. Estes neurotransmissores ativam neurônios nociceptivos de segunda ordem que transmitem as informações nociceptivas até centros superiores. Esta informação pode ascender por duas vias nociceptivas até o córtex somatossensorial, insular e cingulado onde as diferentes dimensões da dor serão processadas. Uma das vias pelas quais a percepção do estímulo doloroso pode ascender é através do trato espinotalâmico em direção ao tálamo, com conseqüente direcionamento da informação, por neurônios de terceira ordem, para o córtex somatossensorial (via espinotalâmica), o qual fornece informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Após esse processo é normal que ocorra uma resposta reflexa de retirada do membro afetado ao estímulo nocivo, através da ativação de um neurônio motor reflexo (BASBAUM et al., 2009; GRACE et al., 2014; OSSIPOV et al., 2010). A outra via pela qual a percepção do estímulo doloroso pode ascender é através de projeções do núcleo parabraquial e amígdala as quais convergem

para o córtex insular e córtex cingulado (via espinoparabraquial amigdalóide), o qual é capaz de atribuir o componente afetivo emocional à experiência dolorosa (BASBAUM et al., 2009; OSSIPOV et al., 2010).

A segunda forma de dor, denominada dor inflamatória, é também adaptativa e tem função de proteger o organismo. No entanto, a sensibilidade sensorial é aumentada após o dano tecidual de maneira a auxiliar a recuperação da lesão. Para exercer essa função o sistema nervoso sensorial sofre uma profunda mudança na sua capacidade de resposta. Além de ocorrer dor espontânea, estímulos que normalmente eram inócuos passam a produzir dor (alodínia) e respostas a estímulos que já eram nocivos passam a ser exageradas e prolongadas (hiperalgesia) (COSTIGAN et al., 2009; LOESER; TREEDE, 2008; WOOLF, 2010). A dor inflamatória é causada pela ativação do sistema imune e por lesão ou infecção tecidual. Mediadores inflamatórios podem ativar diretamente os nociceptores evocando dor ou podem agir em conjunto para produzir uma sensibilização do sistema nervoso somatossensorial. Esta forma de dor é de fato uma das características principais da inflamação (WOOLF, 2010) e normalmente desaparece após a resolução da lesão tecidual inicial. No entanto, em doenças crônicas tais como artrite reumatóide a dor persiste durante tanto tempo quanto a inflamação é ativa (MICHAUD et al., 2007).

Finalmente, há a dor neuropática que é relativamente comum, não protetora e mal-adaptativa (WOOLF, 2010). Esta dor patológica não é um sintoma de alguma doença, mas sim um estado de doença do sistema nervoso periférico ou central. Surge como uma consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial alterando sua estrutura e função (WOOLF, 2010; GRACE et al., 2014). Ela é caracterizada por sintomas como hipersensibilidade mecânica ou térmica, alodínia, parestesias e sensação de queimação principalmente nas extremidades (BLACKBURN-MUNRO, 2004). É a forma de dor que pode resultar de traumas mecânicos, doenças metabólicas como o diabetes, produtos químicos neurotóxicos, infecção, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, bem como, é o sintoma sensorial associado ao próprio câncer ou ao tratamento quimioterápico, entre outros (CONSTIGAN et al., 2009).

A dor associada ao câncer, por exemplo, pode estar presente em qualquer momento durante o curso da doença e sua frequência e intensidade tende a aumentar com o avanço dos estágios da doença (MANTHY, 2006). A dor é um sintoma encontrado entre 30% e 60% dos pacientes com câncer, sendo que as neuropatias periféricas representam uma das suas principais causas. Além disso, a condição

dolorosa é um grande problema que dificulta a recuperação e reabilitação dos pacientes oncológicos (BROWN et al., 2014).

Desta forma, a elucidação dos mecanismos relacionados à dor é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos que visam especificamente às causas subjacentes e não apenas os sintomas (SCHOLZ; WOOLF 2002). Devido o aumento da expectativa de vida dos pacientes com câncer, novas terapias baseadas em mecanismos precisam ser desenvolvidas para reduzir a dor e a neuropatia sensorial relacionada ao câncer. Assim, os pacientes oncológicos sob tratamento com quimioterápicos poderiam ter uma vida mais produtiva, satisfatória e com melhor qualidade (MANTHY, 2006; ZHU et al., 2015).

### 3.2 DOR ASSOCIADA AO PACLITAXEL

Dados da Organização Mundial da Saúde no “World Cancer Report 2014”, demonstram que o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e que sua incidência está aumentando assustadoramente. O relatório prevê ainda que os casos mundiais de câncer vão aumentar de 14 milhões em 2012 para 19 milhões em 2025 e para 24 milhões em 2035 (STEWART; WILD, 2014; ZHU et al., 2015). Embora a taxa de sobrevivência dos pacientes venha sendo melhorada devido aos avanços do tratamento oncológico, os pacientes sofrem os efeitos da doença, sendo que a dor é o sintoma mais comum deles (ZHU et al., 2015).

Além da dor relacionada ao próprio tumor ou suas metástases, a etiologia da dor oncológica pode estar relacionada aos métodos de diagnóstico ou, ainda, à terapia antineoplásica (MANTYH et al., 2006). A terapia antineoplásica é responsável por sintomas dolorosos em aproximadamente 15-25% dos pacientes que recebem quimioterapia, radioterapia ou procedimento cirúrgico (HIGGINSON, 1997). Além disso, a incidência de neuropatia periférica induzida por quimioterapia ocorre em 30-70% dos pacientes que recebem algum tipo de tratamento quimioterápico (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002; MANTYH, 2006). O tratamento oncológico é um dos fatores mais importantes para a sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes, no entanto seus efeitos secundários como dor e neurotoxicidade limitam a sua utilização (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002; TAY; HO, 2009). Infelizmente, a gravidade da dor do câncer muitas vezes é subestimada e apesar da atual disponibilidade de fármacos analgésicos eficazes para o tratamento de diversas condições dolorosas o manejo clínico da dor do câncer continua a ser insatisfatório (WORKING GROUP NIENTEMALE



DEI et al., 2016). Desta forma, é necessário o desenvolvimento de novas terapias capazes de amenizar os sintomas dolorosos em pacientes oncológicos (ZHU et al., 2015).

O paclitaxel (Taxol®), originalmente isolado da *Taxus brevifolia* é uma droga antineoplásica amplamente utilizada para tratar a proliferação de células cancerosas de vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer de mama, ovário, pulmão, cabeça e pescoço (GORNSTEIN; SCHWARZ, 2014; GUASTALLA; DIÉRAS, 2003). Ele atua como um agente de ligação de microtúbulos, estruturas compostas e polimerizadas por heterodímeros de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, que desempenham papéis fundamentais em processos celulares vitais, como a segregação cromossômica e o transporte intracelular (BAAS; AHMAD, 2013; CONDE; CÁCERES, 2009). Sabe-se que o paclitaxel interage com um sítio específico na  $\beta$ -tubulina de microtúbulos no interior do citoplasma, resultando em polimerização e estabilização dos mesmos, formando assim feixes anormais. Como consequência acaba reprimindo a instabilidade dinâmica dos microtúbulos resultando na perturbação da divisão celular (De BRABANDER et al., 1981; SNYDER et al., 2001).

A instabilidade dinâmica dos microtúbulos durante a mitose é essencial porque a dinâmica de polimerização do fuso mitótico realiza o alinhamento correto e a segregação de cromossomos para as células filhas. A perda de instabilidade dinâmica causada pela estabilização dos microtúbulos pelo paclitaxel leva à interrupção da mitose celular na fase G2/M e, conseqüentemente, à morte celular das células cancerosas por apoptose (JORDAN; WILSON, 2004).

Além de estarem envolvidos na polimerização do fuso mitótico, os microtúbulos são também essenciais para o neurônio maduro pós-mitótico. Apresentam funções importantes para a manutenção da morfologia neuronal altamente alongada, transporte axonal e pelo rápido movimento de carga entre o corpo celular e o axônio distal (CARLSON; OCEAN, 2011). Desta forma, apesar de não estarem dividindo as células, os neurônios são igualmente susceptíveis ao paclitaxel e isto provoca complicações graves para a sua utilização como um agente terapêutico (PARK et al., 2011). Há evidências de que o paclitaxel atua diretamente sobre o axônio e induz a interrupção do transporte axonal. Devido o seu mecanismo de ação nas células em divisão, foi presumido que a estabilização dos microtúbulos contribui para este efeito neurotóxico (GORNSTEIN; SCHWARZ, 2014).

Desta maneira, embora esse mecanismo resulte no efeito desejado sobre o tumor, ele pode tornar o paclitaxel tóxico para o tecido normal (DOUGHERTY et al., 2004; TOFTHAGEN et al., 2011). Pacientes submetidos à quimioterapia desenvolvem

uma neurotoxicidade que normalmente se caracteriza por uma neuropatia sensorial periférica. Esta é um comum efeito colateral primário e queixa principal dos pacientes com câncer em tratamento quimioterápico, podendo persistir por anos após o tratamento (VELASCO; BRUNA, 2010; WU et al., 2014).

Embora estratégias venham sendo propostas para superar a resistência do paclitaxel sobre a barreira hematoencefálica, ele ainda possui uma baixa capacidade em atravessá-la (ZHAO et al., 2015) e assim acaba alterando majoritariamente o sistema nervoso periférico e por isso conduz a uma neuropatia axonal predominantemente sensorial (PARK et al., 2011). Tem sido demonstrado que essa neuropatia surge devido aos efeitos deletérios do paclitaxel sobre a morfologia do nervo ciático, tais como a perda de fibras nervosas além da degeneração do axônio (BENBOW et al., 2016).

A neuropatia sensorial periférica se manifesta nos pacientes predominantemente como hipersensibilidade a estímulos frios e mecânicos e dor espontânea (DOUGHERTY et al., 2004; TOFTHAGEN et al., 2011). Os sintomas sensoriais incluem dormência, formigamento e dor em queimação que iniciam de forma simétrica nas extremidades distais, mãos e pés, devido a um processo de degeneração de axônios sensoriais distais (POLOMANO et al., 2001; ROWINSKY et al., 1993).

Além disso, o uso do paclitaxel está associado a uma síndrome de dores agudas referidas como “artralgias e mialgias induzidas por paclitaxel”. Estas dores acometem até 58% dos pacientes e geralmente se desenvolvem dentro de 1-3 dias (LOPRINZI et al., 2007, 2011), ou até mesmo 3 horas após a infusão de paclitaxel (MOULDER et al., 2010). O fato dos sintomas dolorosos surgirem nos primeiros dias de tratamento se correlaciona com estudos realizados em animais que mostraram lesão no nervo 24 horas após a administração de paclitaxel (LOPRINZI et al., 2007). Além disso, esta dor aguda pode estar diretamente relacionada com a gravidade da dor neuropática (dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial) (RIGO et al., 2013).

O início dos sintomas sensoriais durante o tratamento com paclitaxel geralmente conduz a uma redução da dose ou a interrupção da terapia, afetando negativamente os resultados do tratamento contra o câncer (DOUGHERTY et al., 2004; POLOMANO et al., 2001). A neuropatia pode persistir por meses ou anos (TANABE et al., 2013), e até 30% dos pacientes apresentam sintomas graves com altas doses de paclitaxel (CARLSON; OCEAN, 2011) tendo, a longo prazo, um impacto negativo sobre a qualidade de vida (OCHI-ISHI, 2014).

Outro efeito colateral do uso do paclitaxel é a mielossupressão, a qual pode ser neutralizada pelo fator estimulante de colônias de granulócitos (ROWINSKY et al., 1993). Por outro lado, apesar de muitas terapias terem sido investigadas para a prevenção e/ou tratamento da dor aguda e neuropática, até o momento, nenhuma droga eficaz está disponível clinicamente para prevenir ou minimizar o efeito de neurotoxicidade (LOPRINZI et al., 2011; PACHMAN et al., 2011). Além disso, o diagnóstico correto deste estado doloroso geralmente é negligenciado e os mecanismos da neuropatia periférica induzida por paclitaxel permanecem desconhecidos (HALDER et al., 2013; OCHI-ISHI et al., 2014; TRUINI et al., 2013).

Desta forma, a identificação de novas terapias como adjuntos aos quimioterápicos para minimizar os efeitos colaterais indesejados causados por ele são urgentemente necessárias (JANES et al., 2014). Sabe-se que, para tratar a neuropatia periférica induzida por paclitaxel deve-se primeiro entender como esse mecanismo funciona através de modelos animais experimentais (WU et al., 2014). Assim, modelos animais de dor aguda e neuropática induzida por paclitaxel usando ratos ou camundongos foram desenvolvidos para elucidar os mecanismos envolvidos nestas dores (CATA et al., 2006; COSTA et al., 2011; POLOMANO et al., 2001; RIGO et al., 2013; TATSUSHIMA et al., 2011; XIAO et al., 2008).

Diversos mecanismos pelos quais o paclitaxel causa neuropatia têm sido sugeridos, entre eles, estão o comprometimento de axônios de fibras sensoriais, especialmente as fibras mielinizadas A $\beta$  as quais são as fibras preferencialmente lesionadas (DOUGHERTY et al., 2004). Os receptores TRPV4 (Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 4) e TRPA1 (Receptor de potencial transitório do tipo anquirina 1) (MATERAZZI et al., 2012) também parecem estar envolvidos na dor neuropática causada por quimioterápicos, bem como a ocorrência da plasticidade sináptica na medula espinal (CHEN et al., 2014). Ainda, a sinalização via TLR4 (Receptor do tipo Toll 4), MAP quinase (Proteína-quinase ativada por mitógeno), NF $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) (LI, Y. et al., 2015) e a up-regulação da CX3CL1 (quimiocina-fractalkine) via NF $\kappa$ B (LI, D. et al., 2015) também foram relatadas. O paclitaxel também parece promover vacuolização mitocondrial em axônios dos nervos periféricos (JAGGI; SINGH, 2012) e a liberação de substância P na medula espinal (CHIBA et al., 2016).

Diversos estudos tem mostrado o envolvimento das cininas na dor aguda e neuropática induzida por diferentes modelos (FERREIRA et al., 2005, 2008; GABRA; SIROIS, 2002; LAI et al., 2006; QUINTÃO et al., 2008; WERNER et al., 2007) e por

quimioterápicos (BUJALSKA et al., 2008; BUJALSKA; MAKULSKA-NOWAK, 2009). Também tem sido demonstrado o envolvimento de receptores de cininas na neuropatia induzida por paclitaxel (COSTA et al., 2011), no entanto não há estudos sobre seu papel na dor aguda induzida por este quimioterápico. Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas podem ser modulados de diferentes maneiras, inclusive pela inibição da ECA, a qual é capaz de promover a degradação da bradicinina. Uma vez inibida, a ECA não será capaz de degradar a bradicinina em metabólitos inativos. A bradicinina é um importante agonista do receptor B<sub>2</sub> para cininas e também é utilizada como substrato para formar agonistas do receptor B<sub>1</sub> (ERDÖS et al., 2010).

Além de a ECA degradar a bradicinina ela exerce outras funções no organismo, tais como a conversão da angiotensina I em angiotensina II, um importante vasoconstritor. Os efeitos cardioprotetores dos inibidores da ECA vão além da regulação dos efeitos vasoconstritores da angiotensina II, envolvendo ainda a potencialização da sinalização via receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas (MARIN-CASTAÑO, et al., 2002; ERDÖS et al., 2010). É sabido que os inibidores da ECA são fármacos amplamente utilizados para o tratamento da hipertensão (MANCIA et al., 2013), a qual é a co-morbidade mais comum que afeta pacientes com câncer, especialmente câncer de mama, podendo afetar aproximadamente 34% destes pacientes. Uma vez que inibidores da ECA impedem a degradação das cininas e o paclitaxel causa uma síndrome dolorosa aguda e crônica o efeito da inibição da ECA em pacientes submetidos a esse quimioterápico poderia potencializar a hipersensibilidade dolorosa induzida pelo paclitaxel (REYES-GIBBY et al., 2009).

### 3.3 SISTEMA CALICREÍNA-CININAS

Os componentes do sistema calicreína-cininas têm sido investigados desde 1909 quando os cirurgiões franceses Abelous e Bardier observaram que a injeção intravenosa de uma fração da urina humana causava efeito hipotensor (ABELOUS; BARDIER, 1909; NEGRAES et al., 2015). Em 1928, os pesquisadores alemães Frey e Kraut atribuíram este efeito à presença de uma substância, que chamaram de calicreína (do grego kallikreas, termo para o pâncreas), uma vez que o princípio hipotensor era similar ao encontrado no pâncreas (FREY; KRAUT, 1928; YAROVAYA; NESHKOVA, 2015). Entre a década de 40 e 60 houve a identificação da Bk e da calidina (WERLE et al., 1961), da cininase I (ERDÖS, 1961), da cininase II (YANG; ERDÖS, 1967) e dos cininogênios (HABERMANN, 1963). E entre a década de 70 e 80

os receptores para cininas foram caracterizados (REGOLI; BARABÉ, 1980; YAROVAYA; NESHKOVA, 2015).

O sistema caliceínas-cininas é formado por interações complexas entre seus vários componentes, as enzimas teciduais e plasmáticas envolvidas na síntese das cininas (caliceínas), os precursores das cininas (cininogênios), as enzimas que degradam as cininas (cininases), as próprias cininas e os seus receptores ( $B_1$  e  $B_2$ ) (MARCEAU; REGOLI, 2004; BARRETT et al., 2014) (Figura 1).

Os cininogênios são glicoproteínas de baixo (66 KDa) ou alto peso molecular (120 KDa) que apresentam em sua estrutura uma porção N-terminal (cadeia pesada) e uma porção C-terminal (cadeia leve) ligadas por uma ponte dissulfeto, além de uma porção de cininas intercalando estes polipeptídeos terminais (CASSIN et al., 2002; KAPLAN et al., 2002). Os cininogênios possuem seis domínios, incluindo a sequência de aminoácidos da bradicinina, que lhes confere propriedades distintas e específicas como inibição de cisteíno proteases ou sítios de ligação a macromoléculas (CASSIM et al., 2002; KASHUBA et al., 2013; MOREAU et al., 2005).

Os cininogênios são sintetizados primeiramente em hepatócitos, liberados na circulação e distribuídos por vários tecidos do organismo. Eles constituem o substrato para formação das cininas pela ação de um grupo de proteases chamadas de cininogenases, dentre as quais a caliceína tecidual e a plasmática são as mais potentes (BARRETT et al., 2014; CALIXTO et al., 2000). As caliceínas diferem em relação ao seu peso molecular, ponto isoelétrico, especificidade para substratos, características imunológicas, tipo de cinina liberada, gene codificador e sequência de aminoácidos (BHOOLA et al., 1992; CASSIM et al., 2002; 2009; KLAPHAN et al., 2002; MARCEAU; REGOLI 2004; UENO; OH-ISHI, 2003). A produção das cininas pode ser controlada por inibidores endógenos de caliceínas, como por exemplo, a  $\alpha 1$ -antitripsina no caso da caliceína tecidual, e a  $\alpha 2$ -macroglobulina e o inibidor esterase C1 para a caliceína plasmática (CASSIM et al., 2009).

A caliceína plasmática é uma serina protease sintetizada e secretada predominantemente pelo fígado como uma proteína inativa, um zimogênio, chamada de pré-caliceína plasmática. Além do fígado a pré-caliceína plasmática pode ser encontrada em diversos tecidos como rim, placenta, cérebro, células endoteliais, leucócitos, fibroblastos, entre outros (CASSIM et al., 2002). A pré-caliceína pode ser ativada em situações patológicas (principalmente pela ativação do fator XII ou via de contato) ou em situações fisiológicas (independente do fator XII) (KAPLAN et al., 2002; KASHUBA et al., 2013). Essa via pode iniciar por dois mecanismos, sendo que, o

primeiro é dependente da auto-ativação do fator XII em fator XIIa por meio de uma alteração conformacional. Assim, além de iniciar a via intrínseca da cascata de coagulação e fibrinolítica, o fator XIIa medeia a clivagem proteolítica e a ativação da pré-caliceína em caliceína o que inicia a produção de cininas. O segundo mecanismo pode ocorrer independentemente do fator XII, por exemplo, as proteínas policarboxilpeptidase e de choque térmico 90 (HSP90) podem ser ativadoras da pré-caliceína em caliceína (HARRIS et al., 2000; JOSEPH et al., 2002; MOREAU et al., 2005; YAROVAYA; NESHKOVA, 2015). Em ambas as circunstâncias o resultado é a hidrólise, mediada pela caliceína plasmática, dos resíduos arginina<sup>389</sup>-serina<sup>390</sup> e lisina<sup>380</sup>-arginina<sup>381</sup> do cininogênio de alto peso molecular resultando em um peptídeo de nove aminoácidos, a bradicinina (Arg<sup>1</sup> – Pro<sup>2</sup> – Pro<sup>3</sup> – Gly<sup>4</sup> – Phe<sup>5</sup> – Ser<sup>6</sup> – Pro<sup>7</sup> – Phe<sup>8</sup>–Arg<sup>9</sup>) (MOREAU et al., 2005; MORI et al., 1981).

As caliceínas teciduais são serinas proteases secretadas por diversos órgãos e células como pâncreas, rim, baço, neutrófilos, pituitária, placenta, glândulas sudoríparas e sebáceas, sistema nervoso central, e nervos periféricos (YAROVAYA; NESHKOVA, 2015; YOUSEF et al., 2003). Assim como à caliceína plasmática, a caliceína tecidual se forma a partir de uma pré-caliceína, porém age preferencialmente sobre o cininogênio de baixo peso molecular formando o decapeptídeo calidina (Lys<sup>1</sup>-bradicinina) por hidrolisar os resíduos amino-terminais metil<sup>379</sup>-lisina<sup>380</sup> e carboxi-terminais arginina<sup>389</sup>-serina<sup>390</sup>. Quando se trata de roedores, tanto a caliceína plasmática como a tecidual formam preferencialmente bradicinina (CAMPBELL, 2003). Além disso, a calidina pode ser convertida em bradicinina através da clivagem do resíduo de lisina N-terminal por aminopeptidases plasmáticas (GUIMARÃES et al., 1973). A bradicinina, juntamente com a calidina e os dois metabólitos, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e a des-Arg<sup>10</sup>-calidina, constituem as quatro cininas biologicamente ativas (MARCEAU; REGOLI, 2004).

Depois de formadas, as cininas se difundem através dos capilares ou vasos linfáticos dos tecidos e são rapidamente inativadas por um conjunto de peptidases chamadas cininases, entre elas as principais são as cininases do grupo I e do grupo II (MOREAU et al., 2005). As cininases I são representadas pela enzima carboxipeptidase M (membrana) que age preferencialmente em peptídeos contendo resíduos de arginina na porção C-terminal e carboxipeptidase N (plasma) que age preferencialmente em peptídeos contendo lisina na porção C-terminal. Desta forma, elas são capazes de remover os aminoácidos terminais das moléculas da bradicinina e da calidina, formando

os metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina, respectivamente (CASSIM et al., 2002).

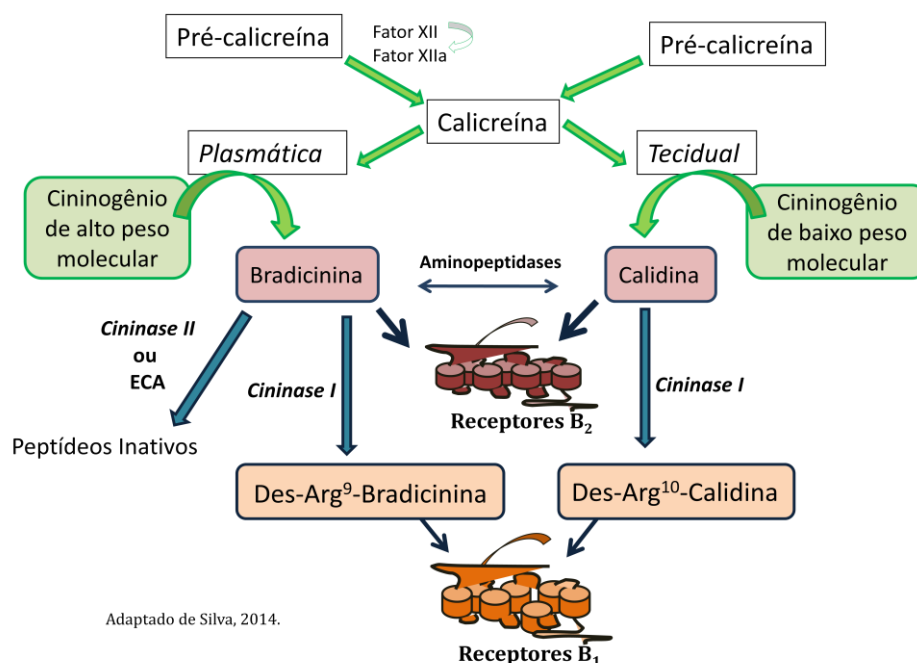
A enzima carboxipeptidase M pode ser encontrada ancorada na membrana ou solúvel e assim amplamente distribuída pelo fígado, rins, vasos sanguíneos, intestino, cérebro e nervos periféricos (ZHANG et al., 2013). Ela pode regular de forma alostérica o receptor B<sub>1</sub> para cininas, aumentando sua afinidade pela des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina. Além disso, a carboxipeptidase M pode formar um complexo com o receptor B<sub>2</sub>, se expressa próxima a ele, e assim facilitar a ativação do receptor B<sub>2</sub> pelo seu agonista, a bradicinina (ZHANG et al., 2011; 2013).

As cininases II são representadas pela enzima conversora de angiotensina (ECA) e pela endopeptidase neutra. A endopeptidase neutra (neprilisina ou encefalinase) é uma metaloprotease capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da bradicinina de maneira semelhante à ECA, podendo agir ainda em outros peptídeos (KASHUBA et al., 2013). A ECA é primeiramente sintetizada como uma proteína ligada à membrana que é posteriormente liberada na circulação (COSTEROUSSÉ et al., 1992). É uma enzima responsável por clivar o dipeptídeo Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> da porção C-terminal da bradicinina, transformando-a em um metabólito inativo, sendo que, a des-Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> bradicinina formada pode ser novamente degradada pela ECA, liberando o dipeptídeo Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> (CASSIM, et al., 2002; ERDÖS et al., 2010).

A ECA faz a ligação entre o sistema renina angiotensina e o sistema caliceína cininas. Esta enzima é capaz de atuar na conversão do hormônio angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II e também é capaz de inativar o peptídeo vasodilatador bradicinina, regulando desta forma a pressão arterial (MARIN-CASTAÑO, et al., 2002; NEGRAES et al., 2015). Por isso, inibidores da ECA são comumente utilizados para o tratamento da hipertensão (MANCIA et al., 2013) sendo uma das classes de fármacos mais bem sucedidas para o tratamento de alterações cardiovasculares e renais (MARCEU; REGOLI, 2004). Eles podem ainda agir como agonistas alostéricos diretos do receptor B<sub>1</sub> para cininas, facilitando a ligação dos agonistas desse receptor, as des-Arg-cininas (ERDÖS et al., 2010; IGNJATOVIC et al., 2002). Os inibidores da ECA também atuam como potencializadores alostéricos indiretos da atividade das cininas no receptor B<sub>2</sub> através de interações com a ECA na superfície celular, onde ambos estão co-localizados (CHEN et al., 2006; ERDÖS et al., 2010).

Além de aumentar a sinalização dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, os inibidores da ECA são capazes de promover um aumento dos níveis de bradicinina que serve como

substrato para a enzima cininase I, resultando na geração do agonista do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (ERDÖS et al., 2010). Outras cininases como a aminopeptidase P, as cininases A e B e a prolilcarboxipeptidase também podem hidrolizar, e conseqüentemente inativar as cininas (CASSIM et al., 2002; ERDÖS; SKIDGEL, 1997).



**Figura 1** – A auto ativação do fator XII em fator XIIIa medeia a ativação da pré-caliceína em caliceína o que inicia a produção de cininas. Os cininogênios constituem o substrato para formação das cininas pela ação de cininogênases, dentre as quais a caliceína tecidual e a plasmática são as mais potentes. A caliceína plasmática age sobre o cininogênio de alto peso molecular formando a bradicinina. Já a caliceína tecidual age sobre o cininogênio de baixo peso molecular formando a calidina. As cininas podem ser inativadas por peptidases chamadas cininases. As cininases II (enzima conversora de angiotensina-ECA) transformam a bradicinina em um metabólito inativo. No entanto, as cininases I removem aminoácidos terminais da bradicinina e da calidina formando os metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina. A bradicinina e a calidina exercem seus efeitos pela ativação dos receptores B<sub>2</sub> para cininas, ao passo que seus metabólitos des-Arg, ativam receptores B<sub>1</sub> para cininas.

As cininas exercem a maior parte dos seus efeitos biológicos através da ativação de dois tipos de receptores acoplados a proteína G, denominados de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Esses receptores apresentam sete domínios transmembrana, com uma porção N-terminal extracelular e outra porção C-terminal intracelular. A ativação destes receptores desencadeia a estimulação de diferentes sistemas de segundos mensageiros, conforme o tipo celular e a proteína G envolvida (MOREAU et al., 2005).

Os receptores de cininas se acoplam a proteína Gq e Gi, para estimular aumentos de Ca<sup>2</sup> intracelular e a produção de fatores de relaxamento derivados do endotélio, incluindo o óxido nítrico, que por sua vez aumenta a permeabilidade vascular



e a vasodilatação (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Na maioria das vezes a ativação desses receptores envolve a via da fosfolipase C, com consequente formação de inositol 3-fosfato e diacilglicerol e a ativação da proteína quinase C (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; SHARMA; AL-SHERIF, 2006). Ao serem estimulados podem ainda ativar canais de potássio sensíveis ao cálcio, a adenilato ciclase, a fosfolipase A<sub>2</sub>, a óxido nítrico sintase e várias proteínas quinases (BHOOLA et al., 1992; BLAUKAT, 2003; FERREIRA et al., 2008). Os sinais mediados pelo receptor B<sub>2</sub> são geralmente mais transitórios, enquanto que a estimulação de receptores B<sub>1</sub> causa respostas prolongadas (BLAUKAT et al., 2003).

O receptor B<sub>2</sub> é expresso de um modo constitutivo mediando ações fisiológicas das cininas na nocicepção e na resposta inflamatória. Já foi identificado no sistema gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, genitourinário, bem como no sistema nervoso central e periférico (MOREAU et al., 2005). Este receptor exibe uma elevada afinidade para a bradicinina (Bk) e calidina (FERREIRA et al., 2002). Por outro lado, o receptor B<sub>1</sub> é normalmente ausente ou sub-expresso em condições fisiológicas, porém pode ser regulado positivamente durante processos inflamatórios ou lesão tecidual. Ele exibe uma elevada afinidade para os metabolitos das cininas des-Arg<sup>9</sup>-BK (DABK) e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK, (CALIXTO et al., 2004; EHRENFELD et al., 2011; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). A sua expressão pode ocorrer predominantemente em neurônios de pequeno e médio diâmetro e de fibras C peptidérgicas e não peptidérgicas (MA et al., 2000, 2001). O receptor B<sub>1</sub> pode ainda ser expresso em regiões não-neuronais como células do sistema imune (macrófagos, fibroblastos, neutrófilos) e em células endoteliais (EHRENFELD et al., 2006; SCHAEFFER et al., 2001).

O receptor B<sub>1</sub> encontra-se no retículo endoplasmático, onde ocorre a formação de homo-oligômeros, que parece ser necessária para sua translocação e expressão funcional na membrana (SANDÉM; LEEB-LUNDBERG, 2013). Sugere-se também outro mecanismo para sua regulação. Esse mecanismo se daria pela interação do receptor B<sub>1</sub> com a enzima carboxipeptidase M, regulando assim a sua sinalização via Bk e calidina, sem a necessidade de clivagem. Desta forma, a Bk causaria alterações conformacionais na carboxipeptidase M levando à sinalização intracelular via receptor B<sub>1</sub> (ZHANG et al. 2011). A expressão do gene do receptor B<sub>1</sub> pode ainda ser regulada por citocinas, via proteína MAP quinase e via fatores de transcrição, tais como o NF-κB (MOREAU, et al., 2005).

Agindo sobre os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, as cininas medeiam processos fisiológicos e patológicos. Fisiologicamente, sua ação sobre as células endoteliais levam aos

sintomas clássicos da inflamação, da resposta vascular e de dor à lesão tecidual (MARCEAU; REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Estudos em animais demonstram que a injeção intraplantar de agonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas potencializa a nocicepção espontânea em animais neuropáticos a qual é bloqueada por antagonistas destes receptores (WERNER et al., 2007). Além disso, neurônios aferentes não mielinizados também expressam receptores para cininas, o que explica a capacidade deste peptídeo em produzir dor e ativar respostas reflexas pelo sistema nervoso autônomo (MARCEAU; REGOLI, 2004). Desta forma, além de seu papel fisiológico evidências demonstram o envolvimento das cininas em condições dolorosas agudas (FERREIRA et al., 2008; SILVA, et al., 2014), e crônicas tais como neuropatias (LAI et al., 2006; QUINTÃO et al., 2008; WERNER et al., 2007) assim como na dor neuropática induzida por quimioterápicos (BUJALSKA et al., 2008; COSTA et al., 2011). Seus efeitos podem ser diretos ou associados com a estimulação de mediadores secundários incluindo prostanóides, taucinininas, citocinas, produtos derivados de mastócitos, além do óxido nítrico (CALIXTO et al., 2000; MARCEAU; BACHVAROV, 1998).

Portanto, antagonistas dos receptores das cininas, por interagir com os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, podem ser moléculas alvo para o tratamento de condições patofisiológicas como hipertensão, doenças das vias aéreas, câncer, diabetes, doenças inflamatórias, asma, alergia, edema cerebral, e sepse. Conclusões mais claras precisam ser definidas sobre a aplicabilidade clínica desses antagonistas nessas condições (SHARMA; AL SHERIF, 2006). No entanto, estudos têm mostrado que o antagonista do receptor B<sub>2</sub>, Icatibant (Hoe 140), é clinicamente eficaz para o tratamento de angioedema hereditário sendo bem tolerado pelos pacientes sem provocar efeitos adversos graves (BAŞ, 2012). Assim, o potencial de antagonistas de receptores para cininas como novos agentes analgésicos que não resultem em tolerância ou dependência, ou outros efeitos adversos tem atraído grande interesse para estudos clínicos (MARCEAU; REGOLI, 2004).

#### **4 MANUSCRITO CIENTÍFICO**

A metodologia, os resultados e a discussão inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico. O manuscrito está disposto na mesma forma a qual foi submetido à revista científica Scientific Reports.

**POTENTIATION OF PACLITAXEL-INDUCED PAIN SYNDROME IN  
MICE BY ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITION AND  
INVOLVEMENT OF KININS**

Indiara Brusco<sup>1</sup>, Cássia Regina Silva<sup>1,2</sup>, Camila de Campos Velho Gewehr<sup>3,4</sup>,  
Flávia Karine Rigo<sup>3,4</sup>, Lidia La Rocca Tamiozzo<sup>1</sup>, Mateus Fortes Rossato<sup>1</sup>, Gabriela  
Trevisan<sup>5</sup>, Raquel Tonello<sup>1,7</sup>, Gerusa Duarte Dalmolin<sup>1</sup>, Daniela de Almeida Cabrini<sup>6</sup>,  
Marcus Vinícius Gomez<sup>3,4</sup>, Juliano Ferreira<sup>1,7</sup>, Sara Marchesan Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Federal  
University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>Pharmacology Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São  
Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>3</sup>Graduate Program in Biochemistry and Molecular Pharmacology, Faculty of  
Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>4</sup>Graduate Program in Medicine and Biomedicine-Institute of Education and  
Research Santa Casa, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>5</sup>Graduate Program in Health Sciences, University of the Extreme South of Santa  
Catarina, Criciúma, SC, Brazil.

<sup>6</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR,  
Brazil

<sup>7</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina,  
Florianópolis, SC, Brazil

\*Corresponding author: Sara Marchesan Oliveira

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Zip code:  
97105-900

Santa Maria, RS, Brazil, Phone: +55 3220-8053, email:  
[saramarchesan@hotmail.com](mailto:saramarchesan@hotmail.com).

## Abstract

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent used to treat solid tumours. However, it causes an acute and neuropathic pain syndrome that limits its use. Among the mechanisms involved in neuropathic pain caused by paclitaxel is activation of kinin receptors. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors can enhance kinin receptor signalling. The goal of this study was to evaluate the role of kinins and the effect of the ACE inhibition on paclitaxel-associated acute (P-APS) and chronic neuropathic pain syndromes (CIPN) in mice. Herein, we show that paclitaxel caused mechanical hyperalgesia and spontaneous nociceptive behaviour that was reduced by antagonists of kinin receptors B<sub>1</sub> (DALBk and SSR240612) and B<sub>2</sub> (Hoe140 and FR173657). Moreover, enalapril (an ACE inhibitor), enhanced the mechanical hyperalgesia induced by a low dose of paclitaxel. Likewise, paclitaxel injection inhibited ACE activity and increased expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors and bradykinin-related peptides levels in peripheral tissue. Together, our data support the involvement of kinin receptors in the hypersensitivity to pain induced by paclitaxel and suggest kinin receptor antagonists to treat this syndrome. Because hypertension is the most frequent co-morbidity affecting cancer patients, treatment of hypertension with ACE inhibitors in patients undergoing paclitaxel chemotherapy should be reviewed, since this could enhance the paclitaxel-induced pain syndrome.

**Key words:** Bradykinin, chemotherapy, mechanical hyperalgesia, neuropathy, nociceptive behaviour.

## INTRODUCTION

Paclitaxel (Taxol®) is an antineoplastic drug widely used alone or with other drugs in the treatment of many types of solid tumours, including breast, ovarian, lung, and head and neck cancers<sup>1</sup>. However, the use of paclitaxel is limited by its adverse effects. A prevalent adverse effect produced by paclitaxel is a painful syndrome, which affects a large proportion of patients (up to 70%) causing morbidity, impairing physical function, and compromising life quality<sup>2,3</sup>.

Paclitaxel-induced pain includes pain that occurs some hours after paclitaxel treatment (paclitaxel-associated acute pain syndrome, P-APS) and pain that persists for weeks to years after cessation of treatment (chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathy-CIPN)<sup>3,4,5,6</sup>. Although many therapies have been investigated for the prevention and/or treatment of both P-APS and CIPN, there is no proven therapy that is widely accepted<sup>2,3</sup>. Moreover, the mechanisms related to the induction and maintenance of paclitaxel-induced pain syndromes is not fully understood. Thus, animal models of acute and neuropathic paclitaxel-induced pain have been developed to elucidate the mechanisms involved, as well as to indicate efficacious treatments for these painful states<sup>7,8</sup>.

Hypertension is the most common comorbidity and a risk factor for peripheral neuropathy affecting patients with cancer<sup>9</sup>. Such patients frequently use angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, which have been associated with breast cancer recurrence<sup>10,11</sup>. Notably, the use of ACE inhibitors increased the risk to patients for developing acute and neuropathic pain<sup>12,13</sup>. Such an effect of ACE inhibitors is related to the increase in the peptide bradykinin and its metabolites, which act at both kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors that have pro-nociceptive action<sup>14</sup>. Accordingly, it has been demonstrated that kinin receptor antagonism or gene deletion reduced chronic neuropathic pain in animal models, including that induced by chemotherapeutic drugs<sup>15,16,17</sup>. Although evidence has shown the involvement of kinins on paclitaxel-induced neuropathy, there are no studies on its role in acute painful condition caused by this chemotherapy. In light of these findings, the aim of this study was to assess the participation of kinins and angiotensin converting enzyme in models of paclitaxel-induced chronic (CIPN) and acute (P-APS) pain syndromes in mice.

## RESULTS

### **Mechanical hyperalgesia induced by paclitaxel**

Acute or chronic paclitaxel administration (1 mg/kg, i.p.), but not vehicle, produced a significant decrease in the PWT in response to mechanical stimuli of von Frey filaments, featuring mechanical hyperalgesia. P-APS was demonstrated when mechanical hyperalgesia was observed at 12 and 24 h ( $86 \pm 18\%$  and  $91 \pm 10\%$  of threshold reduction, respectively) after acute administration (Figure 1A). CIPN was demonstrated when repeated injection of paclitaxel induced hyperalgesia at 21 days ( $91 \pm 12\%$  threshold reduction compared to vehicle) and 28 days ( $92 \pm 6\%$  threshold reduction compared to vehicle) after the beginning of the treatment (Figure 1B). Thus, we selected 1 day and 21 days after the beginning of the paclitaxel administration to characterise the role of kinins in the P-APS and CIPN models.

### **Effect of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists on paclitaxel-induced mechanical hyperalgesia**

We next assessed the effect of peptide and non-peptide B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors antagonists in P-APS and CIPN (Figure 2 and Figure 3). Treatment with B<sub>1</sub> (DALBk; 150 nmol/kg, i.p.) or B<sub>2</sub> (Hoe140; 100 nmol/kg, i.p.) peptide receptor antagonists reversed the mechanical hyperalgesia induced by acute paclitaxel administration observed from 0.5 up to 1 h or from 0.5 up to 2 h after drug administrations, respectively. Maximal inhibitions after treatments were  $99 \pm 15\%$  and  $94 \pm 11\%$  at 0.5 h after treatments, respectively (Figure 2A and 2C). Moreover, DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or Hoe140 (100 nmol/kg, i.p.) were able to reverse mechanical hyperalgesia induced by chronic paclitaxel administration from 0.5 up to 1 h and from 0.5 up to 2 h after treatment with maximal inhibition of  $90 \pm 7\%$  and  $95 \pm 3\%$  at 1 h after treatments, respectively (Figure 2B and 2D).

Similar effects were observed for B<sub>1</sub> (SSR240612; 150 nmol/kg, i.p.) or B<sub>2</sub> (FR173657; 100 nmol/kg, i.p.) non-peptide receptor antagonist. Anti-hyperalgesic effects were observed from 1 h up to 6 h and from 1 h up to 4 h after antagonist administrations, with maximal inhibition of  $56 \pm 8\%$  and 100% at 1 h after treatments, respectively (Figure 3A and 3C). Likewise, SSR240612 (150 nmol/kg, i.p.) or FR173657 (100 nmol/kg, i.p.) also reversed mechanical hyperalgesia induced by chronic paclitaxel administration from 1 h up to 6 h after antagonist administrations

with inhibitions of the  $93 \pm 9\%$  and  $86 \pm 11\%$  at 2 h after treatments, respectively (Figure 3B and 3D).

Moreover, it was also observed that the acute and chronic paclitaxel administration (1 mg/kg, i.p.) were capable of increasing bradykinin-related peptide levels in plantar tissue when compared with vehicle group (Table 1).

### **Spontaneous nociceptive behaviour induced by selective B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor agonists is prevented by antagonists these receptors in paclitaxel-treated animals**

To confirm the previous findings, we also investigated if paclitaxel administration could cause a painful hypersensitivity to kinin receptors agonists. The intraplantar injection of low doses of the selective B<sub>1</sub> receptor agonist DABk (1 nmol/paw, i.pl.) or the selective B<sub>2</sub> receptor agonist Bk (1 nmol/paw, i.pl.) was unable to produce spontaneous nociception in animals treated acutely or chronically with vehicle (Figure 4A and 4B). On the other hand, DABk or Bk caused nociceptive behaviour in the animals one day after acute administration or 21 days after the first chronic paclitaxel administration (Figure 4A and 4B).

Other groups of animals were pre-treated with B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or Hoe140 (100 nmol/kg, i.p.) respectively, and after 0.5 h animals received Bk (1 nmol/paw, i.pl.) or DABk (1 nmol/paw, i.pl.). The spontaneous nociceptive behaviour induced by DABk or Bk was largely prevented by the B<sub>1</sub> receptor antagonist DALBk (150 nmol/kg, i.p.;  $76 \pm 8\%$  of inhibition) or by the B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe140 (100 nmol/kg, i.p.;  $68 \pm 12\%$  of inhibition), respectively (Figure 4C and 4E) after acute paclitaxel administration. We also observed that spontaneous nociceptive behaviour induced by DABk or by Bk prevented by DALBk (150 nmol/kg, i.p.;  $71 \pm 22\%$  of inhibition) or by Hoe140 (100 nmol/kg, i.p.; 100% of inhibition), respectively, after chronic paclitaxel administration (Figure 4D and 4F). Next, we showed that acute and chronic paclitaxel administration (1 mg/kg, i.p.) was capable of increasing B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor expression in the sciatic nerve (Figure 5).

### **Effect of inhibition of ACE in paclitaxel-induced pain syndrome**

The acute and chronic high dose of paclitaxel administration (1 mg/kg, i.p.) itself was able to inhibit ACE activity in the sciatic nerve and paw tissue, but not in the serum, when compared with animals treated with vehicle (Table 2). Additionally, we demonstrated that a low dose of paclitaxel (0.001 mg/kg, i.p.) has no effects on ACE activity after either acute or chronic administration (Table 2). However, administration



of the selective ACE inhibitor enalapril (30 mg/kg, p.o.) with a low dose of paclitaxel reduced the ACE activity in serum, the sciatic nerve, and paw tissue when compared with vehicle plus paclitaxel group (Table 2). Thus, we chose the low dose of paclitaxel to determine whether an ACE inhibitor could potentiate the P-ASP or the CIPN.

The acute and chronic treatment with a low dose of paclitaxel (0.001 mg/kg) caused a reduction in the animals' mechanical thresholds when compared with baseline values (Figure 6). Treatment with the ACE inhibitor, enalapril (30 mg/kg, p.o.), increased the mechanical hyperalgesia induced by low paclitaxel dose (0.001 mg/kg, i.p.). This was observed after both acute (maximal reduction of  $80 \pm 4\%$  at 2 h) and chronic administration (maximal reduction of  $62 \pm 6\%$  at 1 h) when compared with animals that received vehicle (saline, 10 mL/kg, p.o.) (Figure 6).

Finally, acute and chronic low dose of paclitaxel (0.001 mg/kg, i.p.) also increased the expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the sciatic nerve (Figure 7) as well as the bradykinin-related peptide levels in plantar tissue (Table 1), as compared to the vehicle group. Enalapril did not modify the expression of kinin receptors (data not shown) or the bradykinin levels.

## DISCUSSION

Paclitaxel, a staple chemotherapeutic agent used in cancer patients, is associated with an acute pain syndrome and peripheral neuropathic pain which can be severe and debilitating<sup>2,4,5,18</sup>. Although some analgesic drugs are used to treat chemotherapy-induced acute and neuropathic pain, no standard therapy has been established to treat these symptoms and once the kinins are involved in acute and chronic painful conditions<sup>19,20,21,22</sup>, caused or not by chemotherapy, in the present study, we provide evidence, that in addition of neuropathic pain, there is the involvement of kinins and their B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in mechanical hyperalgesia and in nociceptive behaviour acute induced by the chemotherapeutic agent paclitaxel. Furthermore, we also showed the potentiation of mechanical hyperalgesia induced by the ACE inhibitor, enalapril, administered in animals pretreated with paclitaxel. These results are relevant because the pain syndrome is a hallmark response in patients undergoing paclitaxel chemotherapy<sup>23</sup>.

Firstly, we demonstrated that acute paclitaxel injection was able to cause mechanical hyperalgesia in mice starting 12 h after its administration, which is in accordance with pre-clinical and clinical data which demonstrated that paclitaxel-induced

acute pain in patients or rats begin as early as 3 h or within 1 to 2 days after its administration<sup>4,8,24</sup>. Moreover, animals that received chronic paclitaxel administration developed neuropathic pain characterised by mechanical hyperalgesia 21 and 28 days after its administration, and these data are similar to pre-clinical<sup>7,8,16,25</sup> and clinical data<sup>2,5</sup>.

The mechanical hyperalgesia induced by acute or chronic paclitaxel treatment was reverted by systemic administration of the kinin B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> peptide antagonists DALBk or Hoe140, respectively. B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> non-peptide antagonists SSR240612 and FR173657, respectively triggered a longer anti-hyperalgesic effect than the peptide antagonists. These results confirm the involvement of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in paclitaxel-induced mechanical hyperalgesia. These results are consistent with those of a previous study that demonstrated the involvement of kinin receptors in the development of acute painful conditions<sup>14,19</sup> and also in the maintenance of chronic painful conditions in experimental models, such as neuropathies<sup>20,21,22,26,27</sup>. Results of previous studies also indicate the involvement of kinin receptors in chemotherapy-induced neuropathic pain, which are also consistent with our results<sup>15,16,28</sup>.

In addition to mechanical hyperalgesia, some patients report persistent pain at rest, movement-associated pain, or both, after chemotherapy with paclitaxel that is characteristic of neuropathic pain<sup>29</sup>. Apart from paclitaxel-induced mechanical hyperalgesia, we found that kinin B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor agonists were able to induce spontaneous nociceptive behaviour in animals that received acute or chronic paclitaxel administration at doses that normally did not cause over nociception. Consistent with our findings, previous data in the literature demonstrate that the peripheral injection of B<sub>1</sub> receptor agonists rarely induces nociception in naive animals<sup>30,31,32,33</sup>. The spontaneous nociceptive behaviour caused by DABk or Bk after acute or chronic paclitaxel administration was prevented by co-administration of the kinin B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists, DALBk or Hoe140, respectively. These results agree with previously published studies in which neuropathic animals presented over nociception after intraplantar DABk or Bk injections, which are blocked by systemic DALBk or Hoe140 injections<sup>20,22</sup>. Moreover, studies carried out with B<sub>1</sub> receptor knockout mice have suggested that, in addition to chronic pain, the B<sub>1</sub> receptor is also greatly involved in acute pain development. For instance, B<sub>1</sub> receptor deficient mice present hypoalgesia against the acute nociception induced by capsaicin or formalin and by high intensity heat stimuli<sup>34,35</sup>. Further, previous data demonstrates that the nociceptive response to intraplantar injection of bradykinin was absent in B<sub>2</sub> receptor knockout mice, indicating that stimulation of B<sub>2</sub> receptors is an essential step in the induction of some nociceptive

responses<sup>36</sup>. This data clearly demonstrates the involvement of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in spontaneous nociceptive behaviour.

Because the most common co-morbidity that affects cancer patients is hypertension that is usually treated with ACE inhibitors, we observed that systemic administration of enalapril, an ACE inhibitor, enhanced mechanical hyperalgesia after acute or chronic administration of a low dose of paclitaxel. This hyperalgesic effect may have been caused by action of enalapril at both B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors, since ACE inhibitors can act as direct allosteric agonists of B<sub>1</sub> receptors at a site that differs from site of the peptide ligand des-Arg-kinin, facilitating their binding<sup>37,38</sup>. Further, ACE inhibitors also act as indirect allosteric enhancers of kinin activity on B<sub>2</sub> receptors via interactions with ACE on the cell surface, where ACE and the B<sub>2</sub> receptor are co-localised on the cell membrane<sup>38,39</sup>. In addition to the increase in B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor signalling by ACE inhibitors, ACE inhibitors also block bradykinin inactivation, which activates B<sub>2</sub> receptors and acts as a substrate for kininase I enzyme, resulting in the generation of the B<sub>1</sub> receptor agonist, des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin<sup>38</sup>.

In addition to the ability of ACE inhibitors to enhance mechanical hyperalgesia induced by a low dose of paclitaxel, enalapril plus paclitaxel also inhibited the ACE activity in the serum, the sciatic nerve, and paw tissue. This is consistent with previous data that demonstrated a wide distribution ACE not only in the serum, but at individual tissue sites<sup>40</sup>. Moreover, paclitaxel plus vehicle at a high dose, but not at a low dose, was able to inhibit ACE activity only in paw tissue and the sciatic nerve but not in the serum, suggesting that paclitaxel is able to inhibit ACE activity. Since paclitaxel causes endothelial damage, it could reduce the levels of ACE in these cells<sup>41</sup>. Thus, treatment of hypertension with ACE inhibitors in cancer patients undergoing paclitaxel chemotherapy should be avoided because it could enhance the paclitaxel-induced pain syndrome. This is an interesting observation because many cancer patients, including those with breast and ovarian cancer, are concomitantly treated for hypertension with ACE inhibitors<sup>9,38,42</sup>.

Furthermore, we also observed that acute or chronic paclitaxel administration increased the expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the sciatic nerve of animals. Similar results were previously reported, where levels of expression of kinin B<sub>1</sub> receptor mRNA was up-regulated in the sciatic nerve and in paw tissue after partial sciatic nerve ligation<sup>43</sup>. Together, these results are consistent with previous studies<sup>16</sup> that demonstrated the involvement of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in paclitaxel-induced peripheral neuropathy.

Despite the established role of kinin receptors in mediating the effects of ACE inhibition, there are controversies regarding the increase in kinin levels after ACE inhibitor treatment<sup>38</sup>. In our study, we observed that bradykinin-related peptide increased kinin levels in paw tissue after acute or chronic paclitaxel treatment; corroborating the hypothesis that paclitaxel acts as an ACE inhibitor. Likewise, previous studies<sup>44</sup> demonstrate increased kinin levels in the paw tissue of rats after administration of ACE inhibitors. On the other hand, we did not find increased kinins levels in the serum, which is consistent with related data<sup>38</sup> in which bradykinin levels in plasma, even after ACE inhibition, were lower than the effective doses of exogenous peptide. In addition, in serum, we did not find increased kinins levels in the sciatic nerve after acute or chronic paclitaxel treatment. This is probably because acute paclitaxel treatment increased kininase I activity (data not shown) in the sciatic nerve. Thus, kininase I could use bradykinin as substrate to form des-Arg-kinin<sup>45</sup>. Based on these results, we conclude that it is not plausible that ACE inhibitors increase bradykinin levels because ACE inhibitors can enhance the kinins actions does not necessarily by inhibit its degradation<sup>46</sup>.

Apart from its constitutive expression in some tissues, B<sub>1</sub> receptor expression can be up-regulated under inflammatory and nociceptive conditions, especially in the central nervous system<sup>33,47</sup>. It has been suggested that B<sub>1</sub> receptors present on peripheral sensory neurons require some kind of previous stimulation to initiate their nociceptive action<sup>48</sup>. On the other hand, B<sub>2</sub> receptors are expressed constitutively in many cells types and tissues. Activated B<sub>2</sub> receptors produce overt nociception and hyperalgesia to sensory stimuli<sup>49,50</sup>.

Because paclitaxel does not readily cross the blood-brain barrier, it specifically affects the peripheral nervous system, and leads to a predominantly sensory axonal neuropathy<sup>1</sup>. Furthermore, due to the peptide nature of DALBk and Hoe-140, it appears more likely that their effects reported herein resulted from blockade of peripheral kinin receptors. Altogether, these data indicate that, in addition of neuropathic pain, mechanisms mediated by kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors contribute to paclitaxel-induced acute pain syndrome. Thus, selective kinin B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists might represent valuable tools for the control of P-APS and CIPN, since studies have shown that Icatibant (Hoe140) is clinically effective for treating hereditary angioedema and is well tolerated by patients and presents no severe adverse effects<sup>51</sup>.

Moreover, data suggest that ACE inhibitor therapy in patients that are in treatment with paclitaxel requires careful consideration, since we showed that ACE inhibition enhances the paclitaxel-induced pain syndrome.

## **Methods**

### **Animals**

Experiments were performed using adult male Swiss mice (30-35 g). Animals were kept at a controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) on a 12 h light/12 h dark cycle with food and water *ad libitum*. Animals were acclimated to the experimental room approximately 2 h before experiments. All experiments were performed in accordance with the ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals<sup>52</sup> and were also approved by the Committee on the Ethical Use of Animals of the Federal University of Santa Maria (CEUA, process number 152/2014). Behavioural evaluations were performed blindly with respect to drug administration. The authors exerted all efforts to minimise the number of animals used and their suffering.

### **Drugs**

Bradykinin (Bk; B<sub>2</sub> receptor agonist), Hoe 140 (selective B<sub>2</sub> receptor antagonist), des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (DABk; B<sub>1</sub> receptor agonist), and des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradykinin (DALBk; selective B<sub>1</sub> receptor antagonist) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Enalapril maleate was from local suppliers. SSR240612 (non-peptide antagonist of the B<sub>1</sub> receptor) and FR173657 (non-peptide antagonist of the B<sub>2</sub> receptor) were obtained from Sanofi-Aventis (Germany). The fluorescent substrates dansyl-Ala-Arg and (N-[3-(2-furyh)-acryloyl]-L-phenyl alanyl glycyl glycine (FAPGG) were purchased from Bachem (California, USA). Stock solutions of the peptides were prepared in phosphate-saline buffer (PBS) in siliconised plastic tubes, maintained at  $-18^\circ\text{C}$ , and diluted to the desired concentration just before use. Paclitaxel (6 mg/mL paclitaxel in Cremophor EL and dehydrated ethanol) was purchased from Glenmark (Buenos Aires, Argentine), and was dissolved in PBS. The doses of the drugs used in this study were based in previous studies or pilot experiments<sup>14,19,30,53</sup>.

### **Paclitaxel-induced painful syndrome model**

In order to induce nociception (which was evaluated as mechanical hyperalgesia or spontaneous nociceptive behaviour), paclitaxel was administered as previously described<sup>7,8</sup>. For acute treatments, mice received only one intraperitoneal (i.p.) injection at a high (1 mg/kg) or low (0.001 mg/kg) dose of paclitaxel. For chronic treatments, four i.p. injections of paclitaxel at a high (1 mg/kg) or low (0.001 mg/kg) were administered on alternating, successive days (at days 1, 3, 5, and 7), resulting in a cumulative dose of 4 mg/kg (high dose protocol) or 0.004 mg/kg (low dose protocol).

Mechanical hyperalgesia was evaluated at 6, 12 and 24 h after acute treatment with paclitaxel (1 mg/kg, i.p.) or at 14, 21 and 28 days after the first injection of chronic paclitaxel treatment. Separate groups of animals were also investigated for spontaneous nociceptive behaviour (induced by B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor agonists) one day after acute treatment or 21 days after the first injection of chronic paclitaxel treatment (1 mg/kg, i.p.).

### **Evaluation of nociceptive behaviour**

#### **Mechanical hyperalgesia**

Mechanical hyperalgesia was evaluated with a series of flexible nylon von Frey filaments of increasing stiffness (0.02-10 g) using the Up-and-Down method<sup>54,55,56</sup>. The development of mechanical hyperalgesia was defined as a reduction in the paw withdrawal threshold (PWT) (g) when compared with the baseline values. Measurements were performed one day after acute administration or 21 days after the first chronic paclitaxel administration.

#### **Spontaneous nociceptive behaviours**

After acute or chronic paclitaxel administration (1 mg/kg, i.p.) or vehicle, animals were individually placed in chambers (transparent glass cylinders of 20 cm diameter) and were adapted for 20 min. These animals then received injections via the intraplantar (i.pl) route of B<sub>1</sub> (DABk; 1 nmol/paw, i.pl.) or B<sub>2</sub> (Bk; 1 nmol/paw; i.pl.) receptor agonists (both at submaximal doses) or vehicle (20 µL/paw, i.pl.). The amount of time licking the injected paw was measured with a stopwatch and was evaluated for 10 min. This was considered as spontaneous nociceptive behaviour and the results were expressed in seconds<sup>30</sup>.

## Treatments

One day after acute administration or 21 days after the first chronic administration of paclitaxel (1 mg/kg, i.p.) or vehicle, animals received intraperitoneal (i.p.) treatment with peptide B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptors antagonists, DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or Hoe140 (100 nmol/kg, i.p.), respectively, as well as with the non-peptide B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists, SSR240612 (150 nmol/kg, i.p.) or FR173657 (100 nmol/kg, i.p.). Mechanical hyperalgesia was evaluated from 0.5 h up to as long as 24 h after treatments, when necessary.

Mechanical hyperalgesia was also evaluated after oral (p.o.) treatment with the angiotensin I-converting enzyme inhibitor, enalapril (30 mg/kg), in animals previously exposed to low paclitaxel doses (0.001 mg/kg, i.p.; one or four paclitaxel injections) or vehicle. Mechanical hyperalgesia was evaluated from 0.5 h up to 4 h after treatments.

To verify the involvement of kinin receptors (B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>) in the spontaneous nociceptive behaviour induced by paclitaxel, B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists DALBk or Hoe140, respectively, were used. One day after acute administration or 21 days after the first administration of chronic treatment with paclitaxel or vehicle, the animals received intraperitoneal administration of DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or Hoe140 (100 nmol/kg, i.p.). 0.5 h following these administrations, the animals received intraplantar injections of B<sub>1</sub> (DABk; 1 nmol/paw, i.pl.) or B<sub>2</sub> (Bk; 1 nmol/paw, i.pl.) receptor agonists and the spontaneous nociceptive behaviour was evaluated.

## Measurement of kinin levels

Kinin levels in serum, paw tissue, or sciatic nerve were measured one day after acute administration or 21 days after the first chronic paclitaxel administration (1 mg/kg or 0.001 mg/kg, i.p.) or vehicle. Similar measurements were also performed after treatment with enalapril (30 mg/kg) in animals previously exposed to low paclitaxel doses (0.001 mg/kg, i.p.; one or four paclitaxel injections). Kinin levels were measured by enzyme immunoassays by using a high-sensitivity kit for bradykinin (Bachem, USA)<sup>57</sup>. The concentration of total protein in the samples of serum, paw tissue and sciatic nerve were determined as described in previous studies<sup>58</sup>, and the concentration of bradykinin-related peptides normalised to the protein concentration. The results were expressed in ng/mg protein.

### **Evaluation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor expression**

Expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the sciatic nerve samples was assessed by Western blotting after acute administration (1 mg/kg and 0.001 mg/kg, i.p.) or 21 days after the first chronic paclitaxel administration (1 mg/kg and 0.001 mg/kg, i.p.). Western blot analysis was performed as previously described<sup>14</sup>.  $\beta$ -actin staining served as a loading control. A specific anti-B<sub>1</sub> or anti-B<sub>2</sub> primary antibody (anti-B<sub>1</sub> or anti-B<sub>2</sub> polyclonal antibodies; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used. The results were normalised to control group densitometry values and expressed as the relative amount of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> immunoreactivity.

### **Determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity**

ACE is an enzyme responsible for degrading kinins to inactive metabolites. Thus, we evaluated the activity of this enzyme in serum, paw tissue and sciatic nerve of mice one day after acute administration or 21 days after the first chronic paclitaxel administration (1 mg/kg and 0.001 mg/kg, i.p.), as well as 2 h after administration of the ACE inhibitor, enalapril (30 mg/kg, p.o.). For measuring ACE activity, samples were incubated in the presence of the ACE substrate (N-[3-(2-furyh)-acryloyl]-L-phenyl alanyl glycyl glycine (FAPGG)<sup>14</sup>. The product was measured at 340 nm, and the results expressed as nmol of cleaved substrate/microlitre/minute.

### **Statistical analysis**

Results were expressed as the means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software. Significance of differences between groups was evaluated with a Student's *t*-test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls' test, Tukey's test, or a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, when appropriate. To meet parametric assumptions, the data of mechanical threshold were log transformed before analysis. P values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered significant. No statistical methods were used to predetermine group sizes, but our group sizes are similar to those reported in previous publications in the field.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior



(CAPES) (Brazil). We also acknowledge fellowships from CNPq, CAPES and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

### Author Contributions

Participated in research design: I.B., C.R.S., C.C.V.G., F.K.R., L.R.T., M.F.R., G.T, R.T., G.D.D., D.A.C., M.V.G., J.F., S.M.O.

Conducted experiments: I.B., C.R.S., C.C.V.G., F.K.R., L.R.T., M.F.R., G.T, R.T., G.D.D., S.M.O.

Performed data analysis: I.B., C.R.S., F.J., S.M.O.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: I.B., C.R.S., F.J., S.M.O.

All authors reviewed the manuscript.

**Conflict of interest:** The authors declare no competing financial interests.

### References

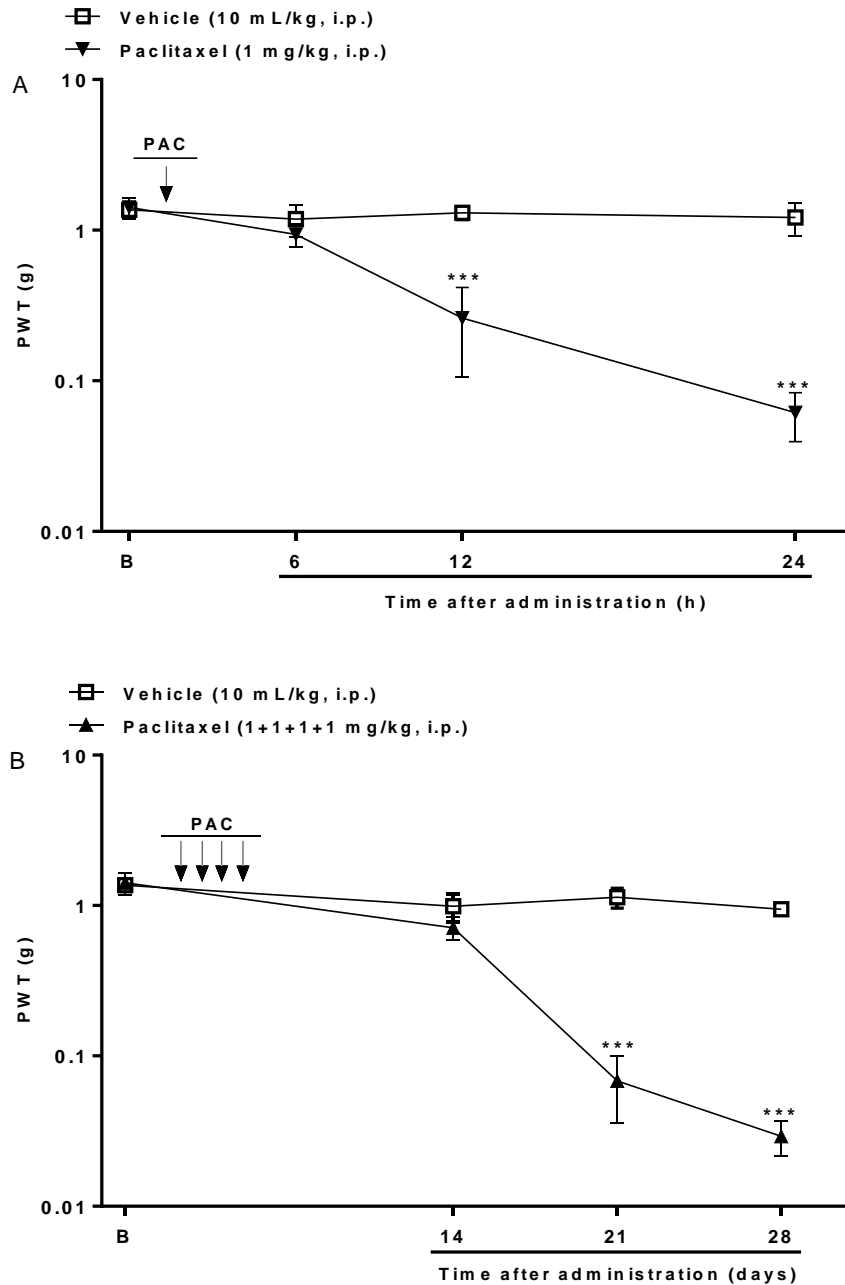
1. Gornstein, E. & Schwarz, T. L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology* **76**, 175–183 (2014).
2. Loprinzi, C. L. *et al.* Natural history of paclitaxel-associated acute pain syndrome: prospective cohort study NCCTG N08C1. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1472–1478 (2011).
3. Pachman, D.R., Barton, D.L., Watson, J.C. & Loprinzi, C. L. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* **90**, 377–387 (2011).
4. Loprinzi, C. L. *et al.* The Paclitaxel acute pain syndrome: sensitization of nociceptors as the putative mechanism. *Cancer J.* **13**, 399–403 (2007).
5. Reeves, B. N. *et al.* Further data supporting that paclitaxel-associated acute pain syndrome is associated with development of peripheral neuropathy. *Cancer* **118**, 5171–5178 (2012).
6. Sisignano, M., Baron, R., Scholich, K. & Geisslinger, G. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 694–707 (2014).
7. Polomano, R.C., Mannes, A.J, Clark, U.S. & Bennet, G. J. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* **94**, 293–304 (2001).
8. Rigo, F. K. *et al.* Effect of  $\omega$ -conotoxin MVIIA and Ph $\alpha$ 1 $\beta$  on paclitaxel-

- induced acute and chronic pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **114-115**, 16–22 (2013).
9. Reyes-Gibby, C. C., Morrow, P. K., Buzdar, A. & Shete, S. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy as a predictor of neuropathic pain in breast cancer patients previously treated with paclitaxel. *J. Pain* **10**, 1146–1150 (2009).
10. Ganz, P. A., Habel, L. A., Weltzien, E. K., Caan, B. J. & Cole, S. W. Examining the influence of beta blockers and ACE inhibitors on the risk for breast cancer recurrence: results from the LACE cohort. *Breast Cancer Res. Treat.* **129**, 549–556 (2011).
11. Chae, Y. K. *et al.* Use of ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers and primary breast cancer outcomes. *J. Cancer* **4**, 549–556 (2013).
12. de Mos, M., Huygen, F.J., Stricker, B.H., Dieleman, J.P. & Sturkenboom, M. C. The association between ACE inhibitors and the complex regional pain syndrome: Suggestions for a neuro-inflammatory pathogenesis of CRPS. *J. Pain* **142**, 218–224 (2009).
13. Choi, H. K., Soriano, L. C., Zhang, Y. & Rodríguez, L. a G. Antihypertensive drugs and risk of incident gout among patients with hypertension: population based case-control study. *BMJ* **344**, d8190 (2012).
14. Silva, C. R. *et al.* The role of kinin B<sub>1</sub> receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. *Ann. Rheum. Dis.* 1–9 (2014). doi:10.1136/annrheumdis-2014-205739
15. Bujalska, M. & Makulska-Nowak, H. Bradykinin receptor antagonists and cyclooxygenase inhibitors in vincristine-and streptozotocin-induced hyperalgesia. *Pharmacol. Reports* **61**, 631–640 (2009).
16. Costa, R. *et al.* Anti-nociceptive effect of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 681–693 (2011).
17. Ferreira, J., Campos, M. M., Arau, R. C. & Bader, M. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant- induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. **41**, 1006–1012 (2001).
18. Rowinsky, E.K., Eisenhauer, E.A., Chaudhry, V., Arbuck, S.G. & Donehower, R. C. Clinical toxicities encountered by paclitaxel (Taxol). *Semin. Oncol.* **20**, 1–15 (1993).
19. Ferreira, J. *et al.* The role of kinin B<sub>1</sub> receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. *Neuropharmacology* **54**, 597–604 (2008).
20. Ferreira, J., Trichês, K. M., Medeiros, R. & Calixto, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* **117**, 171–81 (2005).

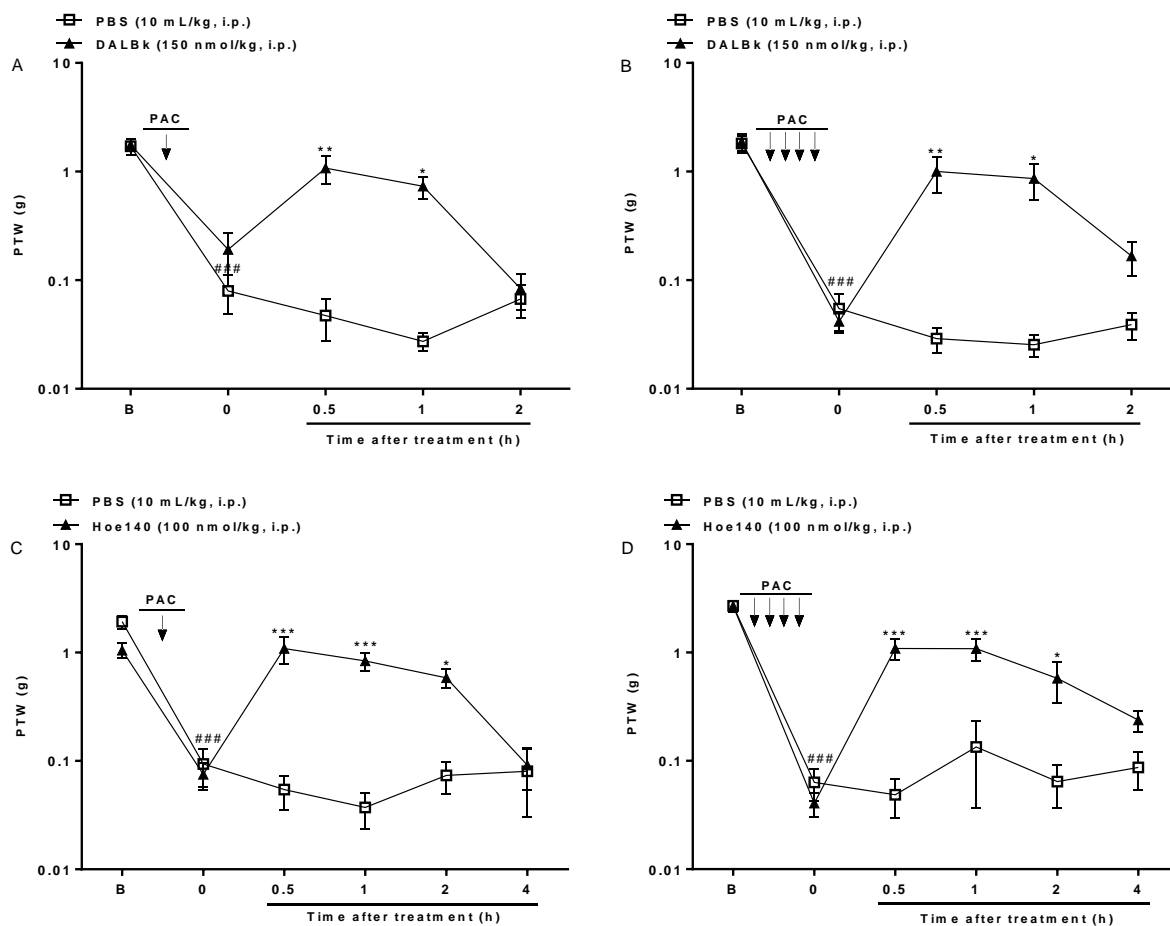
21. Lai, J. *et al.* Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* **9**, 1534–1540 (2006).
22. Werner, M. F. P. *et al.* Peripheral kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology* **53**, 48–57 (2007).
23. Geber, C. *et al.* Pain in chemotherapy-induced neuropathy-more than neuropathic? *Pain* **154**, 2877–87 (2013).
24. Moulder, S.L. *et al.* A randomized phase 2 trial comparing 3-hour versus 96- hour infusion schedules of paclitaxel for the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer* **116**, 814-821 (2010).
25. Meyer, L., Patte-Mensah, C., Taleb, O. & Mensah-Nyagan, A. G. Neurosteroid 3 $\alpha$ -androstenediol efficiently counteracts paclitaxel-induced peripheral neuropathy and painful symptoms. *PLoS One* **8**, e80915 (2013).
26. Gabra, B. H. & Sirois, P. Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur J Pharmacol* **457**, 115–124 (2002).
27. Quintão, N. L. M. *et al.* Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors. *J. Neurosci.* **28**, 2856–2863 (2008).
28. Bujalska, M., Tatarkiewicz, J. & Gumulka, S. W. Effect of bradykinin receptor antagonists on vincristine- and streptozotocin-induced hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced and diabetic neuropathy. *Pharmacology* **81**, 158–163 (2008).
29. Geber, C. *et al.* Pain in chemotherapy-induced neuropathy – More than neuropathic ? *Pain* **154**, 2877–2887 (2013).
30. Ferreira, J., da Silva, G. L. & Calixto, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B<sub>2</sub> kinin receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 787–794 (2004).
31. Perkins, M.N. & Kelly, D. Interleukin-1 beta induced-desArg<sup>9</sup>bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* **33**, 657–60 (1994).
32. Khasar, S. G., Miao, F. J.-P. & Levine, J. D. Inflammation modulates the contribution of receptor-subtypes to bradykinin-induced hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* **69**, 685–690 (1995).
33. Fox, A. *et al.* Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B<sub>1</sub> bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain* **104**, 683–691 (2003).
34. Pesquero, J. B. *et al.* Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B<sub>1</sub> receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8140–8145 (2000).

35. Porreca, F., *et al.* Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[[(4-methoxy-2,6-dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 195-205 (2006).
36. Levy, D. & Zochodne, D. W. Increased mRNA expression of the B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in animal model of neuropathic pain. *Pain* **86**, 265–271 (2000).
37. Ignjatovic, T., Tan, F., Brovkovich, V., Skidgel, R. A. & Erdös, E. G. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors. *J. Biol. Chem.* **277**, 16847–16852 (2002).
38. Erdös, E.G., Tan, F. & Skidgel, R.A. Angiotensin I–converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor function. *Hypertension* **55**, 14-220 (2010).
39. Chen, Z. *et al.* Human ACE and bradykinin B<sub>2</sub> receptors form a complex at the plasma membrane. *FASEB J.* **20**, 2261–2270 (2006).
40. Sharifi, A. M., Akbarloo, N., Heshmatian, B. & Ziai, A. Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Pharmacol. Res.* **47**, 201–209 (2003).
41. Pasquier, E. *et al.* Antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in canc. *Cancer Res.* **65**, 2433–2440 (2005).
42. Yancik, R. *et al.* Cancer and comorbidity in older patients: A descriptive profile. *Ann. Epidemiol.* **6**, 399–412 (1996).
43. Ferreira, J., Beirith, A., Mori, M. A. S., Arau, R. C. & Bader, M. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B<sub>1</sub> receptor knock-out mice. *Receptor* **25**, 2405–2412 (2005).
44. Décarie, A. Development of digoxigenin-labeled peptide: Application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* **15**, 511–518 (1994).
45. Zhang, X. *et al.* Carboxypeptidase M augments kinin B<sub>1</sub> receptor signaling by conformational crosstalk and enhances endothelial nitric oxide output. *Biol. Chem.* **394**, 335–45 (2013).
46. Sivieri, D. O., Bispo-da-Silva, L. B., Oliveira, E. B., Resende, A. C. & Salgado, M. C. O. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. *Hypertension* **50**, 110–5 (2007).
47. Calixto, J. B. *et al.* Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and

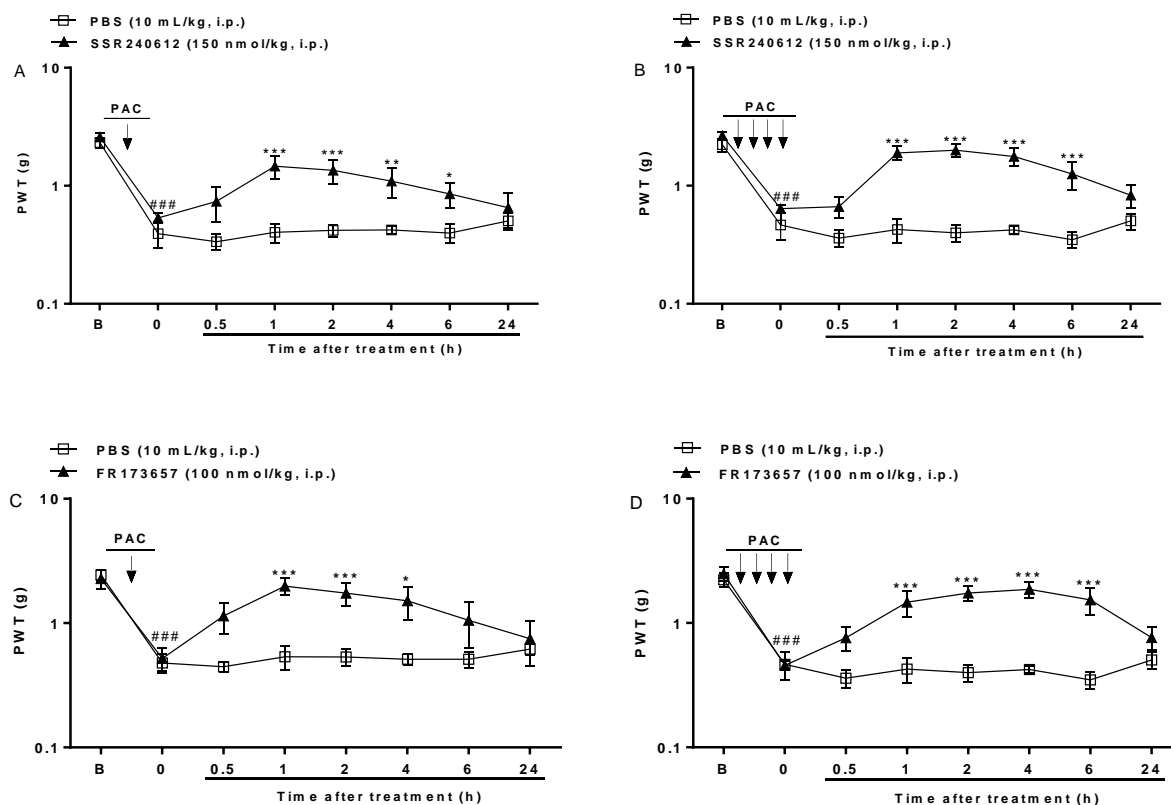
- their role in inflammatory and painful processes. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 803–818 (2004).
48. Ma, Q. P. The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience* **107**, 665–673 (2001).
49. Dray, A. & Perkins, M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* **16**, 99–104 (1993).
50. Calixto, J. B., Cabrini, D. a, Ferreira, J. & Campos, M. M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **14**, 519–526 (2001).
51. Baş, M. Clinical efficacy of icatibant in the treatment of acute hereditary angioedema during the FAST-3 trial. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **8**, 707–717 (2012).
52. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109–110 (1983).
53. Ferreira, J. *et al.* The use of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology* **43**, 1188–1197 (2002).
54. Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. & Yaksh, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* **53**, 55–63 (1994).
55. Oliveira, S. M. *et al.* Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur. J. Pharmacol.* **672**, 88–95 (2011).
56. Oliveira, S. M., Silva, C. R. & Ferreira, J. Critical role of protease-activated receptor 2 activation by mast cell tryptase in the development of postoperative pain. *Anesthesiology* **118**, 679–690 (2013).
57. Gewehr, C. *et al.* Mechanisms involved in the nociception triggered by the venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2198 (2013).
58. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).



**Figure 1.** Paclitaxel induces acute and chronic mechanical hyperalgesia in mice. Effects of (A) acute (1 mg/kg, i.p.) or (B) chronic (1 + 1 + 1 + 1 mg/kg, i.p.) administration of paclitaxel or vehicle (10 mL/kg, i.p.) on paw withdrawal threshold (PWT) in response to a mechanical stimulus in mice. B denotes baseline threshold before paclitaxel injection. Data are expressed as the means  $\pm$  S.E.M. of 5 animals per group. \*\*\*P < 0.01 when compared with the vehicle pre-treated group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

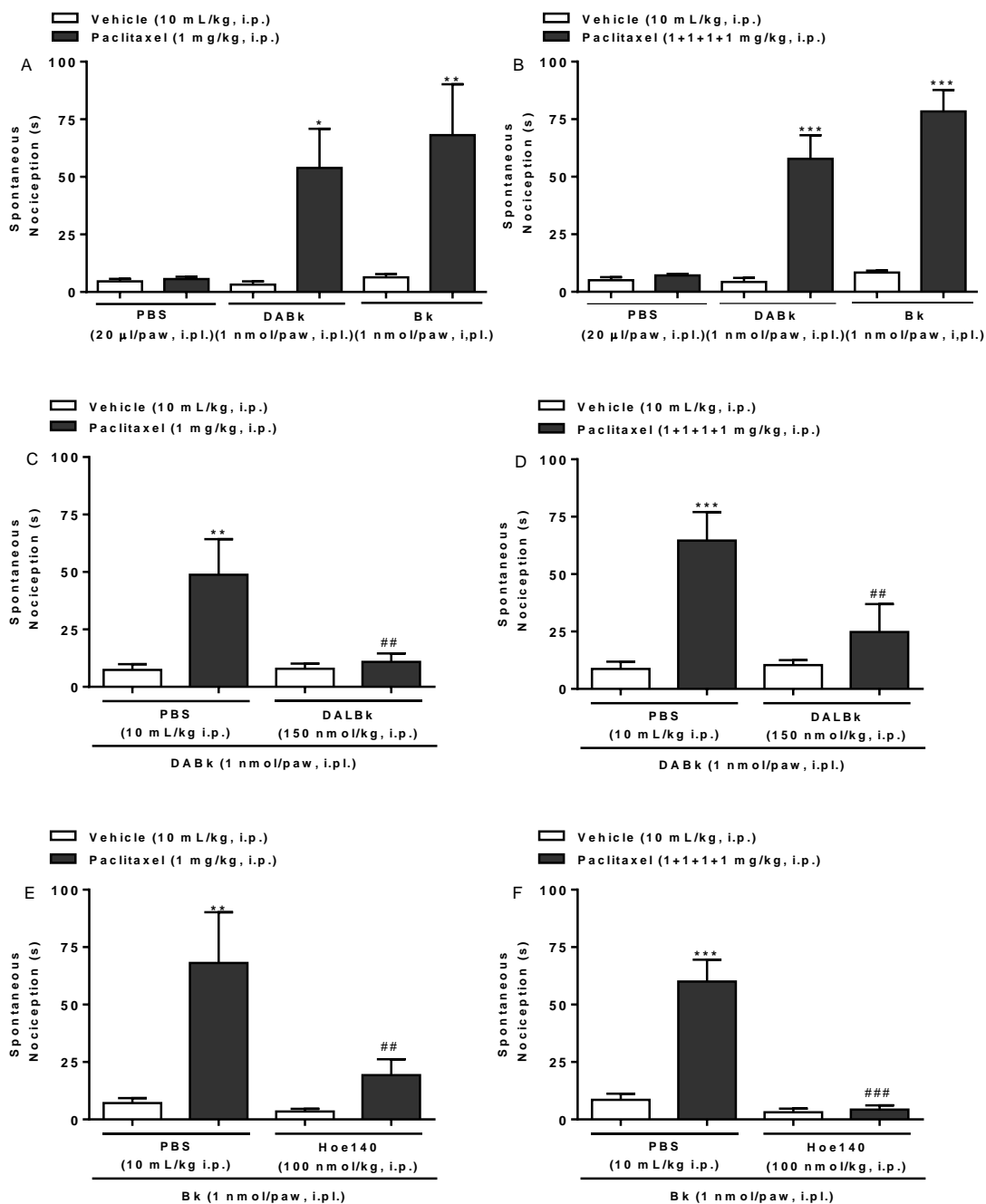


**Figure 2.** Effect of B<sub>1</sub> (DALBk) or B<sub>2</sub> (Hoe140) receptor antagonists on mechanical hyperalgesia induced by paclitaxel. Time-course curves resulting from pre-treatment with DALBk (150 nmol/kg, i.p.; A,B) or Hoe140 (100 nmol/kg, i.p.; C,D) in animals that received acute paclitaxel administration (1 mg/kg, i.p.) (A and C) or chronic paclitaxel administration (1 + 1 + 1 + 1 mg/kg, i.p.) (B and D). B denotes the baseline threshold before paclitaxel administration, while 0 indicates the basal mechanical threshold one day after paclitaxel administration (A and C) 21 days after the first paclitaxel administration (B and D) and before treatment with DALBk or Hoe140. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of 7 animals per group (A,C or D) and 6 animals per group (B). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 when compared with the PBS group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ###P < 0.01 when compared with the basal mechanical threshold (B); one-way ANOVA followed by Tukey's test.



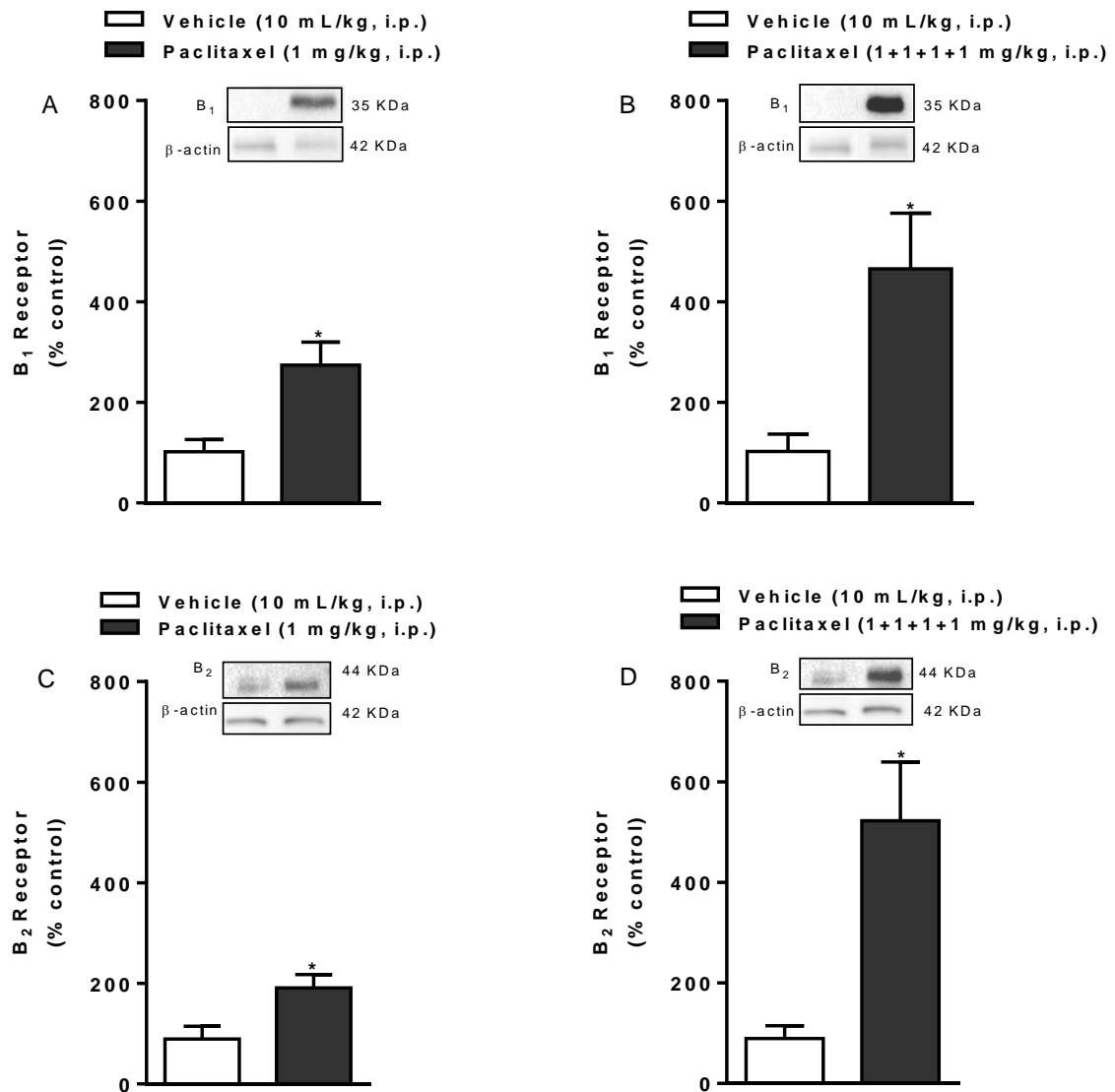
**Figure 3.** Effect of B<sub>1</sub> (SSR240612) or B<sub>2</sub> (FR173657) receptor antagonists on mechanical hyperalgesia induced by paclitaxel. Time-course curves resulting from pre-treatment with SSR240612 (150 nmol/kg, i.p.; A and B) or FR173657 (100 nmol/kg, i.p.; C and D) in animals that received acute paclitaxel administration (1 mg/kg, i.p.) (A and C) or chronic paclitaxel administration (1 + 1 + 1 + 1 mg/kg, i.p.) (B and D). B denotes the baseline threshold before paclitaxel administration, while 0 indicates the basal mechanical threshold one day after paclitaxel administration (A and C) or 21 days after the first paclitaxel administration (B and D) and before treatment with SSR240612 or FR173657. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-8 animals per group (A), 8 animals per group (C), and 6-7 animals per group (B and D). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  when compared with the PBS group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ### $P < 0.001$  when compared with the basal mechanical threshold (B); one-way ANOVA followed by Tukey's test.



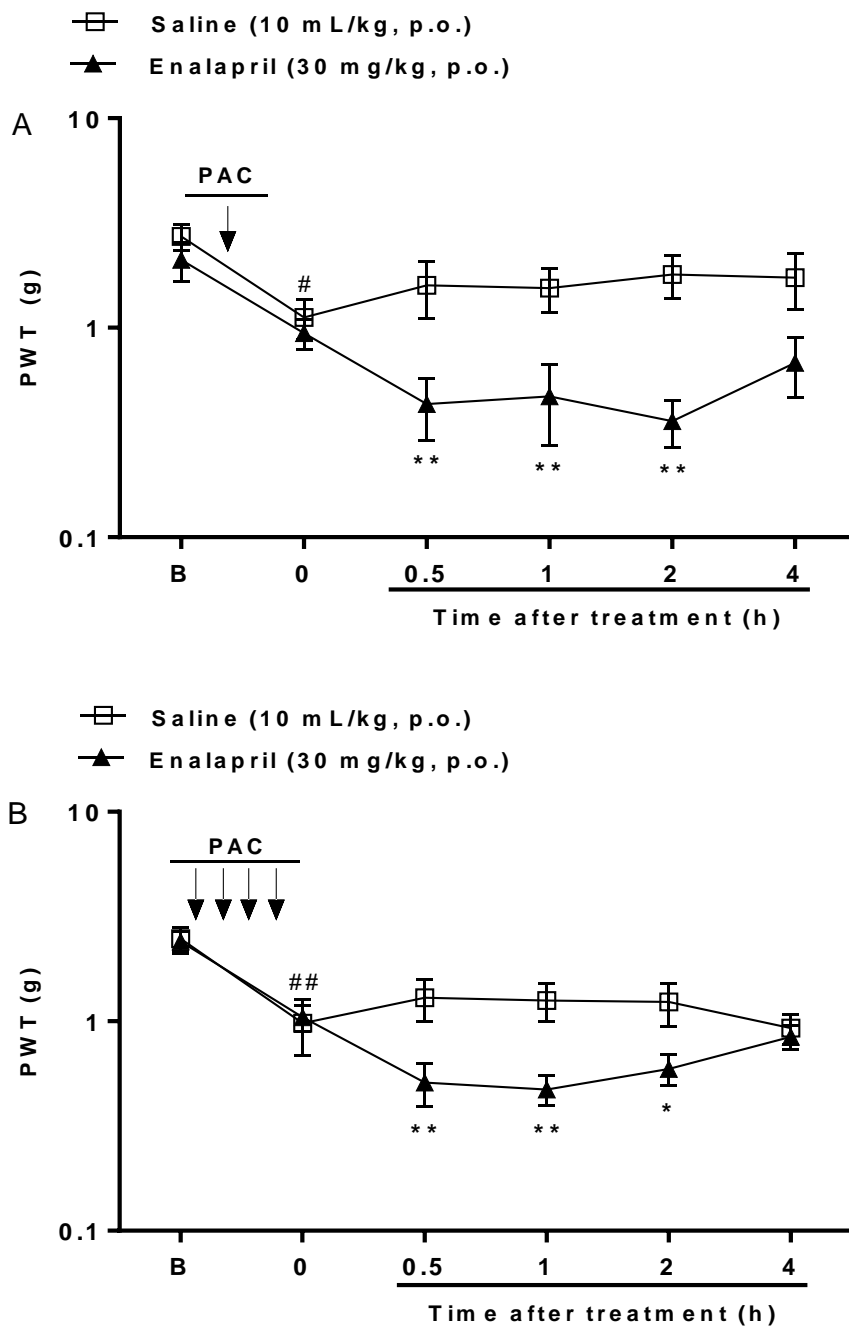


**Figure 4.** Effect of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor agonists or antagonists on nociceptive behavior induced by paclitaxel. (A and B) Nociceptive behavior induced by B<sub>1</sub> (DABk; 1 nmol/paw, i.pl.) or B<sub>2</sub> (Bradykinin; 1 nmol/paw, i.pl.) receptor agonists in mice that received (A) acute or (D) chronic administration of paclitaxel or vehicle. (C and E) Effect of B<sub>1</sub> (DALBk, 150 nmol/kg, i.p.; C) or B<sub>2</sub> (Hoe140, 100 nmol/kg, i.p.; E) receptor antagonists on nociceptive behavior induced by DABk (1 nmol/paw, i.pl.) or Bradykinin (1 nmol/paw, i.pl.) in mice after (C and E) acute or (D and F) chronic paclitaxel or vehicle administration. Data are expressed as the mean ± S.E.M. of 5 to 7 animals per group to (A,C, D,E or F) or 4 to 5 animals per group (B). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 when compared with the vehicle group; ##P < 0.01, ###P < 0.001

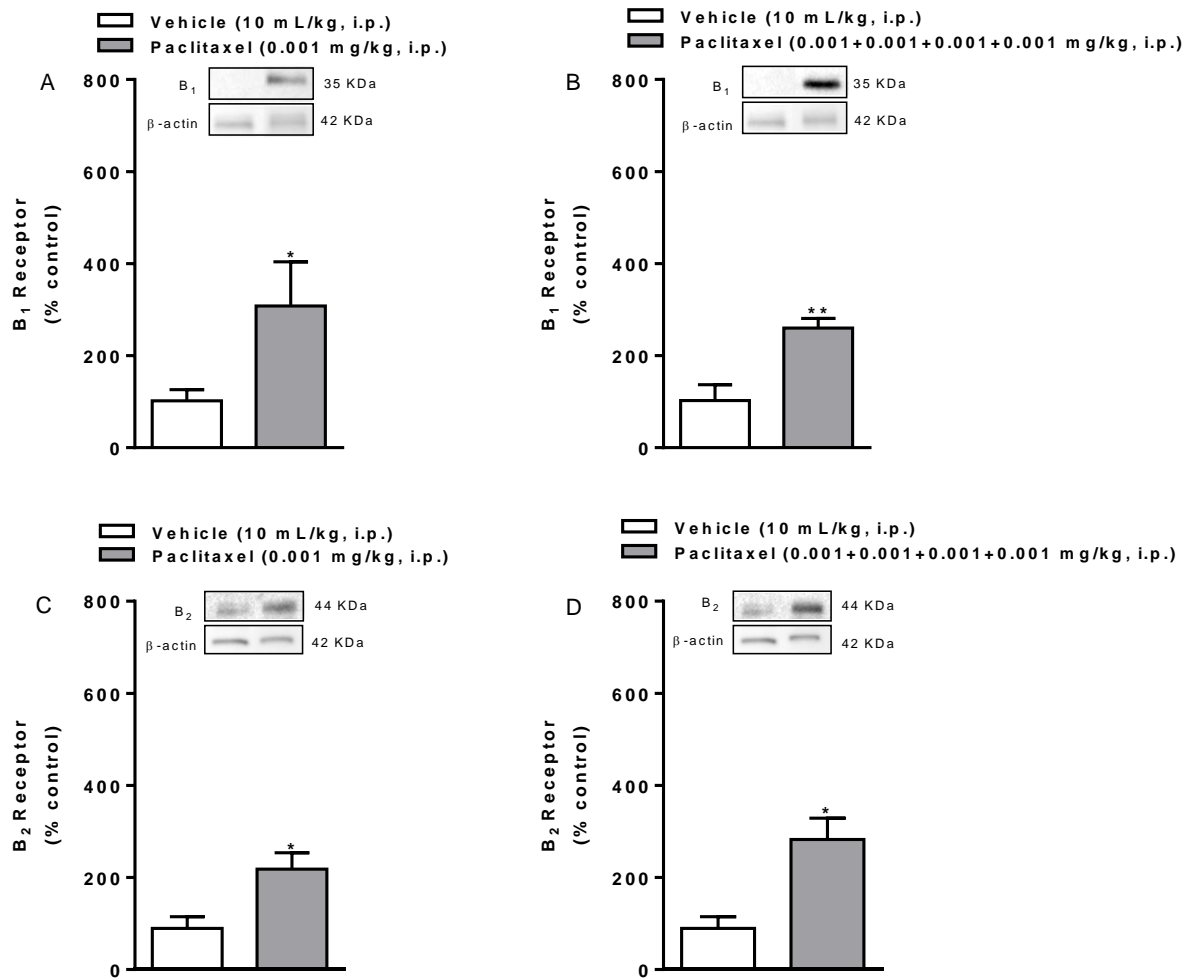
when compared with the DABk/PBS (C and D) or Bk/PBS (E and F) group; one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test.



**Figure 5.** Levels of expression of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the sciatic nerve after acute or chronic paclitaxel administration. B<sub>1</sub> (A, B) or B<sub>2</sub> (C, D) receptor expression in the sciatic nerve of animals that received vehicle or acute paclitaxel administration (1 mg/kg for A and C) or chronic paclitaxel administration (1 + 1 + 1 + 1 mg/kg for B and D). Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 3 per group). \*P < 0.05 when compared with the vehicle group; Student's t test.



**Figure 6.** Effect of Enalapril (30 mg/kg, p.o.) or vehicle (saline 10 mg/kg, p.o.) on mechanical hyperalgesia induced by paclitaxel (0.001 mg/kg; i.p.). Time-course curves in animals that received (A) acute (0.001 mg/kg, i.p.) or (B) chronic (0.001 + 0.001 + 0.001 mg/kg, i.p.) paclitaxel administration. B denotes the baseline threshold before paclitaxel administration, while 0 indicates the basal mechanical threshold one day after paclitaxel administration (A) or 21 days after of first paclitaxel injection (B). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 animals per group (A) and 8-9 animals per group (B). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  when compared with the saline group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  when compared with basal mechanical threshold (B); one-way ANOVA followed by Tukey's test.



**Figure 7.** Levels of expression of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the sciatic nerve after acute or chronic low dose paclitaxel administration. B<sub>1</sub> (A, B) or B<sub>2</sub> (C, D) receptor expression in the sciatic nerve of animals that received vehicle or acute paclitaxel administration (0.001 mg/kg to A and C) or chronic paclitaxel administration (0.001 + 0.001 + 0.001 mg/kg, to B and D). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3 per group). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 when compared with the vehicle group; Student's t test.

**Table 1**

Bradykinin levels in the paw tissue of animals that received vehicle or acute or chronic paclitaxel (PAC) administration. Effect of the vehicle (10 mL/kg, i.p.) or acute (0.001 mg/kg, i.p. or 1 mg/kg, i.p.) or chronic (0.001 + 0.001 + 0.001 + 0.001 mg/kg or 1 + 1 + 1 + 1 mg/kg, i.p.) administration of paclitaxel (PAC) on levels of bradykinin (ng/mg protein) in paw tissue of mice.

Treatment	Acute Administration (ng/mg protein)	Chronic Administration (ng/mg protein)
Vehicle (10 mL/kg)	1.23 ± 0.4	1.30 ± 0.4
PAC (0.001 mg/kg)	4.17 ± 0.4 *	2.95 ± 0.5 *
PAC (1 mg/kg)	2.93 ± 0.8 *	2.81 ± 0.3 *

Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 5 for vehicle group; n = 5 for paclitaxel 0.001 mg/kg; n = 3-6 for paclitaxel 1 mg/kg) \*P < 0.05, when compared with the vehicle group; Student's t test.

**Table 2.**

ACE activity in the serum, the sciatic nerve, and paw tissue of animals that received vehicle (10 mg/kg, i.p.) or acute (1 mg/kg, i.p.) or chronic (1 + 1 + 1 + 1 mg/kg, i.p.) paclitaxel (PAC) administration or ACE activity 2 h after treatment with vehicle (saline 10 mg/kg, p.o.) or Enalapril (30 mg/kg, p.o.) in animals that received acute (0.001 mg/kg, i.p.) or chronic (0.001 + 0.001 + 0.001 + 0.001 mg/kg, i.p.) paclitaxel (PCT) administration.

Treatment	Serum nmol/uL/min		Sciatic nerve nmol/uL/min		Paw tissue nmol/uL/min	
	Acute administration	Chronic administration	Acute administration	Chronic administration	Acute administration	Chronic administration
Vehicle (10 mL/kg)	0.22 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.40 ± 0.05
PAC (0.001 mg/kg) + Vehicle	0.33 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.39 ± 0.06	0.39 ± 0.13
PAC (0.001 mg/kg) + Enalapril	0.12 ± 0.01***	0.11 ± 0.03***	0.09 ± 0.01**	0.12 ± 0.01***	0.14 ± 0.04**	0.11 ± 0.03**
PAC (1 mg/kg)	0.25 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.05 ± 0.02***	0.23 ± 0.02**	0.13 ± 0.03***	0.22 ± 0.02**

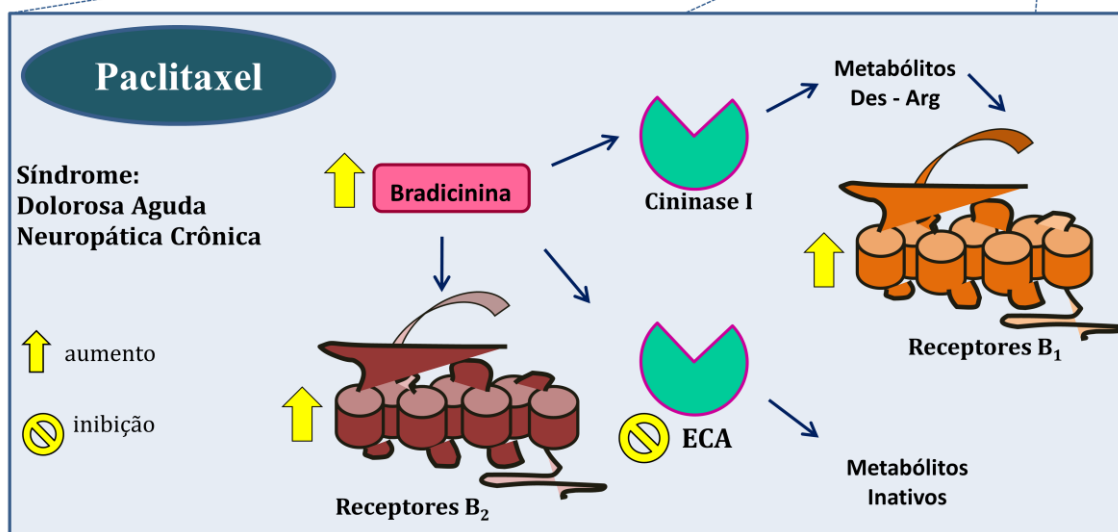
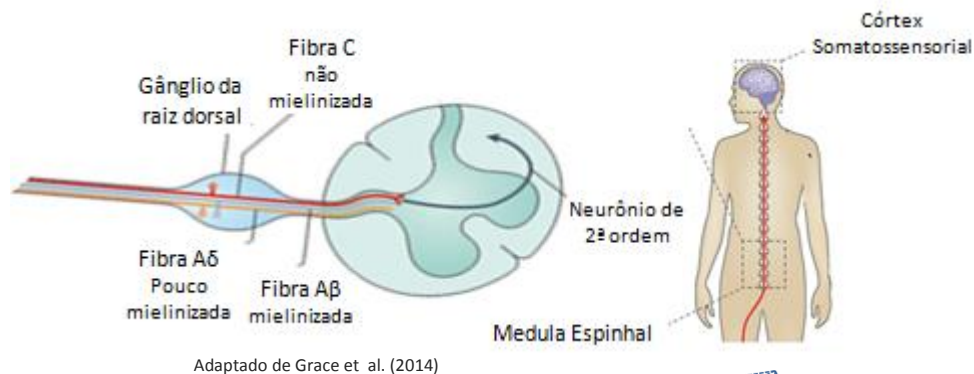
Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 5-6 samples per group). \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 when compared with the vehicle group; Student's t-test.

## 5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- ▶ Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas estão envolvidos na síndrome dolorosa aguda e neuropática crônica induzida pelo paclitaxel;
- ▶ O paclitaxel aumenta a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas no nervo ciático, assim como os níveis de peptídeos relacionados à bradicinina no tecido plantar;
- ▶ O paclitaxel inibe a atividade da ECA no nervo ciático e no tecido plantar. Ainda, a associação de paclitaxel em uma baixa dose com um inibidor da ECA potencializa a inibição desta enzima no nervo ciático, tecido plantar e soro.
- ▶ A inibição da enzima conversora de angiotensina potencializa a síndrome dolorosa aguda e crônica em animais submetidos a uma baixa dose de paclitaxel.

As evidências sugerem que o uso de antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas podem representar uma ferramenta valiosa para o controle da síndrome dolorosa aguda e neuropática induzida pelo paclitaxel. Assim como, a terapia com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) em pacientes que estão em tratamento com paclitaxel requer cuidados, uma vez que a inibição da ECA potencializa a síndrome dolorosa induzida por paclitaxel em animais experimentais (Figura 2).



**Figura 2 – Proposta para o efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e o envolvimento das cininas na síndrome dolorosa induzida por paclitaxel.**

Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas estão envolvidos na síndrome dolorosa aguda e neuropática crônica induzida pelo paclitaxel, uma vez que o paclitaxel aumenta a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas assim como, aumenta os níveis de peptídeos relacionados à bradicinina. Além disso, o paclitaxel inibe a atividade da ECA impedindo a degradação da bradicinina. Desta forma, a bradicinina age como agonista do receptor B<sub>2</sub> e serve como substrato para a cininase I a qual origina os metabólitos Des-Arg, agonistas do receptor B<sub>1</sub>. A inibição da ECA pelo paclitaxel potencializa a síndrome dolorosa, já que, além de impedir a degradação das cininas, inibidores da ECA agem como agonistas alostéricos diretos do receptor B<sub>1</sub> e como potencializadores alostéricos indiretos da atividade das cininas no receptor B<sub>2</sub>. Após ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, o estímulo doloroso será transmitido por meio dos nociceptores até a medula espinhal e deste para o córtex somatossensorial, onde o processo discriminativo-sensorial da dor será identificado.

## 6 PERSPECTIVAS

▶ Verificar os níveis de peptídeos relacionados à bradicinina após a administração de paclitaxel plus enalapril.

▶ Verificar a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas no nervo ciático após a administração de paclitaxel plus enalapril.

▶ Realizar o ensaio da atividade da ECA purificada *in vitro* para comprovar que o paclitaxel é capaz de inibi-la.



## 7 REFERÊNCIAS

- ABELOUS, J.E.; BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. **CR Seances Societe de Biologie**, v.66, p.511, 1909.
- ASHBURN, M.A.; STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet**, v.353, p.1865-1869, 1999.
- BAAS, P. W.; AHMAD, F. J. Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system. **Brain** v.136, p.2937–2951, 2013.
- BARRETT, K.E. et al. **Fisiologia Médica de Ganong**. 24ª ed. São Paulo: AMGH Ltda, 2014. cap.32, 598 p.
- BAŞ, M. Clinical efficacy of icatibant in the treatment of acute hereditary angioedema during the FAST-3 trial. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 8, p.707–717, 2012.
- BASBAUM, A.I., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p.267-284, 2009.
- BENBOW, S.J. et al. Effects of Paclitaxel and Eribulin in Mouse Sciatic Nerve: A Microtubule-Based Rationale for the Differential Induction of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Neurotoxicity Research**, v. 29, p. 299-313, 2016.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacological Reviews**, v. 44, p. 1-44. 1992.
- BLACKBURN-MUNRO, G. Pain-like behaviours in animals –how human are they? **Trends in Pharmacological Sciences** v.25, p. 299-305, 2004.
- BLAUKAT , A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia**. v. 35, p. 17-23. 2003.
- BROWN, M.R.D.; RAMIREZ, J.D.; FARQUHAR-SMITH, P. Pain in cancer survivors. **British Journal of Pain**, v. 8, p.139-153, 2014.
- BUJALSKA, M.; TATARKIEWICZ, J.; GUMUŁKA, S.W. Effect of bradykinin receptor antagonists on vincristine- and streptozotocin-induced hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced and diabetic neuropathy. **Pharmacology**, v. 81, p. 158-163, 2008.
- BUJALSKA, M.; MAKULSKA-NOWAK, H. Bradykinin receptor antagonists and cyclooxygenase inhibitors in vincristine- and streptozotocin-induced hyperalgesia. **Pharmacol Reports**, v.61, p.631-640, 2009.
- CALIXTO, J.B. et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p.1-5, 2000.
- CALIXTO, J.B. et al. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Current Opinion in Anesthesiology**, v.14, p. 519-526, 2001.

CALIXTO, J.B. et al. Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**, v.143, p. 803-818, 2004.

CAMPBELL, D.J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 784-791. 2003.

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

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacology & Therapeutics**, v.94, p.1-34, 2002.

CASSIM, B. et al. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 48, p. 490-496. 2009.

CATA, J.P., et al. Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. **Neuroscience**, v. 138, p. 329-338, 2006.

CHEN, Z. et al. Human ACE and bradykinin B<sub>2</sub> receptors form a complex at the plasma membrane. **FASEB J.** v. 20, p. 2261–2270, 2006.

CHEN, S. R. et al. Increased Spinal Cord Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter-1 (NKCC1) Activity Contributes to Impairment of Synaptic Inhibition in Paclitaxel-induced Neuropathic Pain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 31111–31120, 2014.

CHIBA T. et al. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy increases substance P release in rat spinal Cord **European Journal of Pharmacology**, v.770, p.46–51, 2016.

CONDE, C.; CÁCERES, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p.319–332, 2009.

COSTA, R. et al. Anti-nociceptive effect of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 681-693, 2011.

COSTEROUSSE, O., et al. Angiotensin converting enzyme (kininase II). Molecular and physiological aspects. **C R Seances Societe Biologie Filiales**. v. 186, p. 586-598. 1992.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. **Annual Review Neurosciwnce**, v.32, p.1-32, 2009.

COX, J.J., et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**, v.444, p.894–898, 2006.

De BRABANDER, M. et al. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.78, p.5608–5612, 1981.

DEVOR, M. Unexplained Peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**. v. 6, p.S27-35, 1999.

DOUGHERTY, P.M. et al. Weng, Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelin-ated fiber function in cancer patients. **Pain**, v. 109, p. 132-142, 2004.

DRAY, A.; PERKINS, M.N. Kinins and pain. In: Farmer SG (ed). **The Handbook of Immunopharmacology. The kinin system**. Londres: Academic Press, p. 157, 1997.

DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway, **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120 p. 3760-72, 2010.

EHRENFELD, P., et al. Activation of kinin B<sub>1</sub> receptors induces chemotaxis of human neutrophils. **Journal Leukocyte Biology**, v. 80, p. 117-124. 2006.

EHRENFELD, P.; FIGUEROA, C.D.; BHOOLA, K.D. Kinin: kallikreins and kinins in cancer. In: Bader M, editor. Kinin. **De Gruyter**, p. 217–245, 2011.

ERDÖS, E.G. Enzymes that inactivates active polypeptides. **Biochem Pharmacol** v.8, p. 21, 1961.

ERDÖS, E.G.; SKIDGEL, R.A. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: Farmer SG (Ed.). **The Handbook of Immunopharmacology. The kinin system**. Londres: Academic Press, p. 9-43, 1997.

ERDÖS, E.G.; TAN, F.; SKIDGEL, R.A. Angiotensin I–Converting Enzyme Inhibitors Are Allosteric Enhancers of Kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> Receptor Function. **Hypertension**, v. 55, p. 214-20. 2010.

FERREIRA, J. et al. The use of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v.43, 1188–1197, 2002.

FERREIRA, J. et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, p. 171-81, 2005.

FERREIRA, J. et al. The role of kinin B<sub>1</sub> receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 597–604, 2008.

FORSYTH, P.A. et al. Prospective study of paclitaxel-induced peripheral neuropathy with quantitative sensory testing. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 35, p. 47-53, 1997.

FOX, A. et al. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B<sub>1</sub> bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. **Pain**, v. 104, p. 683-691, 2003.

FREY, E.K.; KRAUT, H. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Path Pharmacol**, v.133, p.1-56, 1928.

- GABRA, B.H.; SIROIS, P. Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 457, p. 115-124, 2002.
- GORNSTEIN, E.; SCHWARZ, T.L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 175-183, 2014.
- GRACE, et al. Pathological pain and the neuroimmune interface **Nature Reviews Immunology**, v. 14, 217 -231, 2014.
- GUASTALLA, J.P.; DIÉRAS, V. The taxanes: Toxicity and quality of life considerations in advanced ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 16-22, 2003.
- GUIMARÃES, J.A. et al. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, p. 3157-3172. 1973.
- HABERMANN, E. On pH-related modifications of kinin-producing alpha-globulin (kininogen) from bovine serum and the molecular weight of kininogen I. **Biochem Z** v.337, p.440-448, 1963.
- HALDER, S.K. et al. Involvement of LPA1 receptor signaling in cerebral ischemia-induced neuropathic pain. **Neuroscience Journal**, v. 235, p. 10-15, 2013.
- HARRIS, M.B., et al. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. **General Pharmacology**, v.35, p.165–170, 2000.
- HIGGINSON, I.J. **Innovations in assessment: epidemiology and assessment of pain in advanced cancer**. In: Jensen TS, Turner JA, Wiesenfeld- Hallin Z, editors. Proceedings of the 8th World Congress on Pain. Progress in Pain Research and Management, Vol. 8. Seattle: IASP Press; 1997. p.707-16.
- HIRATE, K., et al. Zaltoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, inhibits bradykinin-induced pain responses without blocking bradykinin receptors. **Neuroscience Research**, v.54, p.288–294, 2006.
- IGNJATOVIC, T. et al. Novel mode of action of angiotensin i converting enzyme inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.16847–16852, 2002.
- INDO, Y. Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. **Human Mutation**, v.18, p.462–471, 2001.
- JAGGI, A.S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy, **Toxicology**, v. 291, p. 1–9, 2012.
- JANES, K. et al. A3 adenosine receptor agonist prevents the development of paclitaxel-induced neuropathic pain by modulating spinal glial-restricted redox-dependent signaling pathways. **Pain**, v.155, 2560–2567, 2014.
- JORDAN, M.A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs, **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.253–265, 2004.

- JOSEPH, K.; THOLANIKUNNEL, B.G.; KAPLAN, A.P. Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII. **Proceedings National Academy Sciences U S A**, v.99, p.896–900, 2002.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p.203-210, 2001.
- KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.109, p.195-209, 2002.
- KASHUBA E. et al. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers**, v. 18, p. 279-296. 2013.
- KING, N. B.; FRASER, V. Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. **PLoS Medicine**, v. 10, p. e1001411. 2013.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**. v.16, p.1258-1266, 2010.
- LAI, J. et al. Activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. **Nature Neuroscience**, v. 9, p.1534-40, 2006.
- LEEB-LUNDBERG, L.M.F, et al. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 27–77, 2005.
- LI, D. et al. Up-regulation of CX3CL1 *via* Nuclear Factor- $\kappa$ B–dependent Histone Acetylation Is Involved in Paclitaxel-induced Peripheral Neuropathy, **Anesthesiology**, v.122, p.1142–1151, 2015
- LI, Y et al. MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.49, 255–266, 2015.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.
- LOPRINZI, C.L. et al. The Paclitaxel acute pain syndrome: sensitization of nociceptors as the putative mechanism. **The Cancer Journal**, v. 13, p. 399-403, 2007.
- LOPRINZI, C.L. et al. Natural history of paclitaxel-associated acute pain syndrome: prospective cohort study NCCTG N08C1. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, p.1472-1478, 2011
- MA, Q.P.; HILL, R.; SIRINATHSINGHJI, D. Basal expression of bradykinin B(1) receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. **Neuroreport**, v.11, p.4003–4005, 2000.
- MA, Q. P. The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. **Neuroscience**, v.107, p.665–673, 2001.

MACINTYRE, P.E., et al. Acute pain management: scientific evidence. **Australian and New Zealand College of Anaesthetists and Faculty of Pain Medicine**. 3<sup>a</sup> Ed., pp. 1- 533, 2010.

MANCIA G., et al. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) **European Heart Journal**, v.34, p.2159–2219, 2013.

MANTYH, P.W. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. **Nature Reviews Neuroscience**. v.7, p.797–809, 2006.

MARCEAU, F.; BACHVAROV, D.R. Kinin receptors. **Clinical Reviews Allergy & Immunology**, v.16, p.385, 1998.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 845-852. 2004.

MARIN-CASTAÑO, M.E., et al. Induction of Functional Bradykinin B<sub>1</sub>-Receptors in Normotensive Rats and Mice Under Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Treatment. **Circulation**, v.105, 627-632, 2002.

MATERAZZI, S. et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **Pflugers Archiv**, v. 463, p. 561–569, 2012.

MICHAUD, K.; BOMBARDIER, C.; EMERY, P. Quality of life in patients with rheumatoid arthritis: Does abatacept make a difference? **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 25 p. 35–45, 2007.

MOREAU, M.E. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences** ,v. 99, p. 6-38. 2005.

MORI, K.; SAKAMOTO, W.; NAGASAWA, S. Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. III. Cleavage of HMW kininogen by the action of human salivary kallikrein. **Journal of Biochemistry**, v. 90, p. 503-509, 1981.

MOULDER, S.L. et al. A randomized phase 2 trial comparing 3-hour versus 96-hour infusion schedules of paclitaxel for the treatment of metastatic breast cancer. **Cancer**, v. 116, p. 814-821, 2010.

NAVRATILOVA, E. et al. Evaluation of reward from pain relief. **Annals of the New York Academy of Sciences** , v.1282, p. 1-11. 2010.

NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nature Neuroscience**, v. 17, p. 1304-1312, 2014.

NEGRAES et al. Roles of Kinins in the Nervous System. **Cell Transplantation**, v. 24, p. 613–623, 2015.

OCHI-ISHI, R. et al. Involvement of the chemokine CCL3 and the purinoceptor P2X7 in the spinal cord in paclitaxel-induced mechanical allodynia. **Molecular Pain**, v.10, p.53, 2014.

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

PACHMAN, D.R. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p.377-387, 2011.

PARK, S. Early, progressive, and sustained dysfunction of sensory axons underlies paclitaxel-induced neuropathy. **Muscle Nerve**,v.43, 367-374, 2011.

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

QUASTHOFF, S.; HARTUNG, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of Neurology**, v.249, p.9-17, 2002.

QUINTÃO, N.L. et al. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, p.2856-2863, 2008.

READY, L.B.; EDWARDS, W.T. Management of Acute Pain: a Pratical Guide. **Taskforce on Acute Pain**. Seattle, 1992.

REEVES, B. N. *et al.* Further data supporting that paclitaxel-associated acute pain syndrome is associated with development of peripheral neuropathy. **Cancer** v.118, p. 5171–5178, 2012.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Reviews**, v.32, p.1-46, 1980.

REYES-GIBBY, C.C. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy as a predictor of neuropathic pain in breast cancer patients previously treated with paclitaxel. **The Journal of Pain**, v. 10, 1146-1150, 2009.

RIGO, F.K. et al. Effect of  $\omega$ -conotoxin MVIIA and Ph $\alpha$ 1 $\beta$  on paclitaxel-induced acute and chronic pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 114-115, p. 16-22, 2013.

ROWINSKY, E.K. et al. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). **Seminars in Oncology**, v. 20, p.115, 1993.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.123-133, 1998.

SANDÉN, C.; LEEB-LUNDBERG, L.M. Kinin B<sub>1</sub> receptor homo-oligomerization is required for receptor trafficking to the cell surface. **Int Immunopharmacol**, v. 15, p. 121-128. 2013.

SCHAEFFER, P. et al. Detection of bradykinin B<sub>1</sub> receptors in rat aortic smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol**, v. 61, p. 291-298, 2001.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience** v.5, p.1062-1067, 2002.

SHARMA, J.N; AL SHERIF, G.J. Pharmacologic Targets and Prototype Therapeutics in the Kallikrein-Kinin System: Bradykinin Receptor Agonists or Antagonists. **Scientific World J.**, v. 6, p. 1247–1261, 2006.

SILVA, C. R. **Papel do receptor B<sub>1</sub> para cininas e o efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina em ataques agudos de gota em roedores.** 2014. p.30 Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

SISIGNANO, M.; BARON, R.; SCHOLICH, K.; GEISSLINGER, G. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v.10, p. 694–707, 2014.

SNYDER, J. P. et al. The binding conformation of taxol in  $\alpha$ -tubulin: a model based on electron crystallographic density. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 5312–5316, 2001.

STEWART, B.W.; WILD, C.P. **World Cancer Report 2014** (Print). Lyon Cedex: IARC Nonserial Publication; 2014.

TANABE, Y. et al. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v.18, p.132-138, 2013.

TATSUSHIMA, Y. et al. Involvement of substance P in peripheral neuropathy induced by paclitaxel but not oxaliplatin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, p. 226–235, 2011.

TAY, W.; HO, K.Y. The role of interventional therapies in cancer pain management. **Ann Acad Med Singapore** v.38, p.989-997, 2009.

TOFTHAGEN, C.; MCALLISTER, R.D.; MCMILLAN, S.C. Peripheral neuropathy in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 15, p.182–188, 2011.

TORRES, L., et al. The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v.14, p.1033–1040, 2006.

TRUINI, A.L. et al. Reappraising neuropathic pain in humans-how symptoms help disclose mechanisms. **Nature Reviews Neurology**, v.9, p. 572-582, 2013.

UENO, A.; OH-ISHI, S. Roles for the kallikrein-kinin system in inflammatory exudation and pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, p.1-20, 2003.

VELASCO, R.; BRUNA, J. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: an



unresolved issue. **Neurologia** v.25, p.116-131, 2010.

WERLE, E.; TRAUTSCHOLD, I.; LEYSATH, G. Isolation and structure of kallidine. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v.326, p.174-176, 1961.

WERNER, M.F.P. et al. Peripheral kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**, v.53, p.48-57, 2007.

WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors-noxious stimulus detectors. **Neuron**, v.55, p.353-364, 2007.

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **Journal of Clinical Investigation**. v. 120, p. 3742-3744. 2010.

WORKING GROUP NIENTEMALE DEI et al. What to Do, and What Not to Do, When Diagnosing and Treating Breakthrough Cancer Pain (BTcP): Expert Opinion **Drugs**. p. 1-16, 2016. doi 10.1007/s40265-015-0519-2

WU, Y.; LI, J.; ZHOU, J.; FENG, Y. Dynamic long-term microstructural and ultrastructural alterations in sensory nerves of rats of paclitaxel-induced neuropathic pain. **Chinese Medical Journal**, v. 127, p. 2945-2952, 2014.

XIAO, W.; NASO, L.; BENNETT, G.J. Experimental studies of potential analgesics for the treatment of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. **Pain Medicine**, v. 9, p. 505-517, 2008.

YANG, H.Y.; ERDÖS, E.G. Second kininase in human blood plasma. **Nature**, v.215, p. 1402-1403, 1967.

YAROVAYA, G.A.; NESHKOVA, A.E. Past and Present Research on the Kallikrein Kinin System (On the 90th Anniversary of the Discovery of the System) **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.41, p. 245-259, 2015.

YOUSEF, G.M.; KISHI, T.; DIAMANDIS, E.P. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 1-8. 2003.

ZHANG X. et al. Cross-talk between carboxypeptidase M and the kinin B<sub>1</sub> receptor mediates a new mode of G protein-coupled receptor signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 18547-18561. 2011.

ZHANG, X.; TAN, F.; SKIDGEL, R.A. Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B<sub>1</sub> receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 33226-33240, 2013.

ZHAO, Y.; MU, X.; DU, G. Microtubule-stabilizing agents: New drug discovery and cancer therapy, **Pharmacology and Therapeutics**, 2015  
doi:10.1016/j.pharmthera.2015.12.006

ZHU et al., Advances in cancer pain from bone metastasis. **Drug Design, Development and Therapy** v.9, p.4239-4245, 2015.

## 8 ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

**CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Envolvimento das Cininas e o Efeito na Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina sobre a Síndrome Dolorosa induzida por Paclitaxel em Camundongos."

**Número do Parecer:** 152/2014

**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Sara Marchesan de Oliveira

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

**OBS:** Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

\* Foram Aprovados 384 camundongos machos swiss adultos (heterogênico).

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DE APROVAÇÃO:** 06/05/2015.

Santa Maria, 14 de maio de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Daniela", is written over a horizontal line.

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM