

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM UM MODELO DE
DOR DO CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DA
PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NESTE MODELO
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Amanda Spring de Almeida

Santa Maria, RS
2021

Amanda Spring de Almeida

CARACTERIZAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM UM MODELO DE DOR DO CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NESTE MODELO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Defesa de Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Gabriela Trevisan dos Santos

Santa Maria, RS

2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Almeida, Amanda Spring de
CARACTERIZAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM UM MODELO DE DOR DO
CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR
TRPA1 NESTE MODELO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS / Amanda Spring
de Almeida.- 2021.
117 p.; 30 cm

Orientadora: Gabriela Trevisan
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. Dor do câncer 2. Câncer de Mama 3. Metástase óssea 4.
Nociceptores I. Trevisan, Gabriela II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

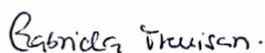
Declaro, AMANDA SPRING DE ALMEIDA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Amanda Spring de Almeida

CARACTERIZAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM UM MODELO DE DOR DO CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NESTE MODELO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Defesa de Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia.**

Aprovada em **27 de agosto de 2021:**



Gabriela Trevisan dos Santos, Dra.
(Presidente/Orientadora)



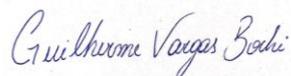
Daniela de Almeida Cabrini, Dra. (UFPR)



Eunice André, Dra. (UFPR)



Paulo Cesar Lock Silveira, Dr. (UNESC)



Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes oncológicos e suas famílias, que necessitam de atenção e carinho ao enfrentarem esta fase tão intensa de suas vidas. Ainda, em especial, dedico a minha mãe, Simone Aparecida da Silva, que enfrentou as dores do câncer e venceu o câncer de mama durante o período deste doutorado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tarcísio Spring de Almeida e Simone Aparecida da Silva, por sempre me apoiarem, e não medirem esforços para me proporcionar sempre o melhor até os dias de hoje.

Meus avós, Juvino de Almeida e Luci Alves da Silva, por estarem sempre preocupados e demonstrando, mesmo de longe, o quanto torcem pelo meu sucesso.

Minha orientadora, Gabriela Trevisan, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e em suas pesquisas, pela sua paciência em me ensinar, pela preocupação, pelo empenho em me ajudar a ser cada vez melhor e por todas as oportunidades.

Minhas grandes amigas, Gabriele Cheiran Pereira e Karen Luise Moreira, por terem sido meu alicerce durante estes anos.

Minha fiel amiga, Juliana Santos, que foi a primeira pessoa a me acolher de braços abertos em Santa Maria, me apoia, e está sempre ao meu lado.

As minhas companheiras de profissão, de laboratório e amigas, Brenda Moreira e Camila Ritter, por termos dividido tantos momentos que me fizeram estar aqui hoje.

As pesquisadoras do LabNeuro, por terem me ensinado e compartilhado comigo tanto conhecimento necessário para o desenvolvimento destas pesquisas, desde o meu primeiro dia de doutorado.

Ao Felipe Ruviaro, por estar comigo em momentos desafiadores, me ajudar em inúmeras situações, ser meu porto seguro e me proporcionar mais leveza e carinho nos momentos intensos durante esses anos.

As minhas colegas de laboratório, meus professores da pós-graduação, aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e a Universidade Federal de Santa Maria.

A Capes pelos recursos financeiros e pela bolsa que me foi concedida.

Aos professores componentes da banca, pelas contribuições e tempo dedicado para avaliação deste estudo.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM UM MODELO DE DOR DO CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NESTE MODELO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

AUTORA: Amanda Spring de Almeida
ORIENTADORA: Gabriela Trevisan dos Santos

O câncer de mama pode causar metástase óssea, contribuindo para a dor dos pacientes. Ainda existe uma parcela dos pacientes com câncer de mama que apresentam tratamento inadequado para a dor. Os mecanismos associados à dor do câncer são ainda incertos, sendo que diversos canais iônicos parecem estar envolvidos na transdução de estímulos nocivos. O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) é um sensor à estímulos nocivos, como o isotiocianato de alila (AITC) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este trabalho teve como objetivo caracterizar a nocicepção em um modelo de dor do câncer de mama com metástase óssea e avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 neste modelo. As células 4T1 (10⁴) foram inoculadas na quarta glândula mamária de camundongos BALB/c fêmeas; após, foi realizada uma curva de tempo para observar o desenvolvimento de alodínia mecânica e ao frio, e alteração no escore facial. Para determinar a presença de metástase óssea, realizou-se o teste clonogênico metastático e avaliação dos níveis séricos de cálcio. Aos 20 dias após a indução do tumor, o efeito antinociceptivo de diferentes analgésicos (paracetamol, naproxeno, codeína ou morfina), de um agonista canabinoide (WIN 55,212-2), de antagonistas TRPA1 (via oral de forma aguda e repetida e intraplantar), da administração intratecal de um oligonucleotídeo antisentido (AS) para o TRPA1, de um antioxidante (ácido α -lipoico), foram testados. Foi testado a ação da administração repetida de um antagonista. Foi realizada a dosagem de H₂O₂ e atividade da NADPH oxidase e superóxido dismutase (SOD), e a expressão do receptor TRPA1. A metástase óssea foi confirmada pelo ensaio clonogênico e a hipercalemia foi observada 20 dias após a inoculação das células. A administração de paracetamol, naproxeno, codeína, morfina, WIN 55,212-2, antagonistas TRPA1 (HC-030031 ou A967079), oligonucleotídeo antisentido, ácido α -lipoico tiveram efeito antinociceptivo. O tratamento com doses repetidas utilizando um antagonista do TRPA1 também teve efeito antinociceptivo. A injeção intraplantar do agonista TRPA1 (AITC) causou hiperalgesia química 20 dias após a inoculação das células 4T1. No entanto, não ocorreu aumento da expressão do TRPA1 no osso. A atividade das enzimas SOD e NADPH oxidase e os níveis de H₂O₂ foram aumentados na pele da pata, no nervo ciático e no tecido ósseo 20 dias após a inoculação das células 4T1. O teste de viabilidade celular mostrou que o antagonista do TRPA1 (HC-030031) e o composto antioxidante não diminuíram a viabilidade celular, enquanto o paclitaxel diminuiu significativamente. As células da linhagem 4T1 não expressam o TRPA1. Pela técnica SAR as células 4T1 não tem expressão proteica à nível transcrricional do TRPA1 e nem os osteoblastos e osteoclastos das linhagens estudadas. Não há expressão proteica e a nível transcrricional de TRPA1 em tecido ósseo de camundongos, entretanto existem evidências da presença de TRPV4 a nível transcrricional. Assim, este modelo de dor do câncer pode ser uma forma confiável para observar os mecanismos da dor induzida por câncer de mama com metástase óssea ou para observar a eficácia de novos compostos analgésicos e novos mecanismos analgésicos. Além disso, o TRPA1 é um importante alvo para o estudo da dor do câncer e desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos para a dor do câncer.

Palavras-chave: Câncer de mama. Peróxido de hidrogênio. Morfina. Metástase óssea. Dor óssea.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF NOCICEPTION A NEW BREAST CANCER PAIN MODEL AND EVALUATION OF TRPA1 PARTICIPATION IN THIS MODEL IN FEMALE MICE

AUTHOR: Amanda Spring de Almeida
ADVISOR: Gabriela Trevisan dos Santos

Breast cancer can cause bone metastasis, contributing to patients' pain. There is still a portion of patients with breast cancer who have inadequate treatment for pain. The mechanisms associated with cancer pain are still uncertain, and several ion channels seem to be involved in the transduction of noxious stimuli. The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a sensor for noxious stimuli, such as allyl isothiocyanate (AITC) and hydrogen peroxide (H₂O₂). This study aimed to characterize nociception in a breast cancer pain model with bone metastasis and to evaluate the TRPA1 receptor involvement in this model. 4T1 cells (10⁴) were inoculated into the fourth mammary gland of female BALB/c mice; then, a time curve was performed to observe the development of mechanical and cold allodynia, and changes in the facial score. To determine the presence of bone metastasis, the clonogenic metastatic test and assessment of serum calcium levels were performed. At 20 days after tumor induction, the antinociceptive effect of different analgesics (paracetamol, naproxen, codeine or morphine), a cannabinoid agonist (WIN 55,212-2), TRPA1 antagonists (acute and repeated oral and intraplantar), of intrathecal administration of an antisense (AS) oligonucleotide for TRPA1, of an antioxidant (α -lipoic acid), were tested. The action of repeated administration of an antagonist was tested. H₂O₂ and NADPH oxidase and superoxide dismutase (SOD) activity and TRPA1 receptor expression were performed. Bone metastasis was confirmed by clonogenic assay and hypercalcemia was observed 20 days after cell inoculation. The administration of paracetamol, naproxen, codeine, morphine, WIN 55,212-2, TRPA1 antagonists (HC-030031 or A967079), antisense oligonucleotide, α -lipoic acid had an antinociceptive effect. Repeated dose treatment using a TRPA1 antagonist also had an antinociceptive effect. Intraplantar injection of TRPA1 agonist (AITC) caused chemical hyperalgesia 20 days after inoculation of 4T1 cells. However, there was no increase in TRPA1 expression in bone. SOD and NADPH oxidase enzyme activity and H₂O₂ levels were increased in paw skin, sciatic nerve and bone tissue 20 days after inoculation of 4T1 cells. The cell viability test showed that TRPA1 antagonist (HC-030031) and the antioxidant compound did not decrease cell viability, while paclitaxel significantly decreased. Cells of the 4T1 lineage do not express TRPA1. By the SAR technique, 4T1 cells do not have protein expression at the transcriptional level of TRPA1 and neither do osteoblasts and osteoclasts of the analyzed strains. There is no protein and transcriptional expression of TRPA1 in bone tissue of mice, however there is evidence of the presence of TRPV4 at the transcriptional level. Thus, this cancer pain model can be a reliable way to look at the mechanisms of pain induced by breast cancer with bone metastasis or to look at the efficacy of new analgesic compounds and new analgesic mechanisms. Furthermore, TRPA1 is an important target for the study of cancer pain and the development of new pharmacological treatments for cancer pain.

Keywords: Breast cancer. Hydrogen peroxide. Morphine. Bone metastasis. Bone pain.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4 hidróxi-2-nonal
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
AITC	Isotiocianato de alila
AS	Anti-sentido
ASIC	Canal iônico sensível a ácidos
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrópico derivado do cérebro
CB1R	Receptor canabinoide 1
CB2R	Receptor canabinoide 2
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CID	Classificação internacional de doenças
COX-2	Ciclooxygenase
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EBR	Radioterapia por feixe externo
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EVA	Escala visual analógica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IASP	Associação internacional para o estudo da dor
IL1 β	Interleucina 1 β
IRSN	Inibidor de recaptção de serotonina e norepinefrina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção da serotonina
MGS	Medida de escore fácil
Nav1.7	Canal de sódio controlado por voltagem 1.7
NGF	Fator de crescimento neuronal
NMDA	Receptor N-metil D-aspartato
OMS	Organização mundial da saúde
PTHrP	Peptídeo relacionado ao hormônio paratireóide
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sequence read archive
TCA	Antidepressivo tricíclico
TG	Gânglio do trigêmeo
TGF β	Fator de crescimento tumoral β
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA	Receptor de potencial transitório anquirina
TRPC	Receptor de potencial transitório canônico
TRPM	Receptor de potencial transitório melastatina
TRPML	Receptor de potencial transitório mucolipina
TRPP	Receptor de potencial transitório policistina
TRPV	Receptor de potencial transitório vaniloide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 DOR.....	15
2.2 DOR DO CÂNCER	21
2.3 TRATAMENTOS PARA DOR DO CÂNCER E MECANISMOS INOVADORES ESTUDADOS.....	24
2.3.1 Tratamentos para dor do câncer	25
2.3.2 Tratamentos para dor óssea induzida pelo câncer	27
2.3.3 Efeitos adversos dos tratamentos farmacológicos para dor do câncer e dor óssea induzida pelo câncer	29
2.3.4 Possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor do câncer	30
2.4 MODELOS UTILIZADOS PARA OBSERVAR NOVOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DOR DO CÂNCER DE MAMA COM METÁSTASE ÓSSEA	33
2.4.1 Modelos animais de dor do câncer com utilização de células de câncer de mama	36
2.5 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1.....	38
2.5.1 Receptores de Potencial Transitório – TRP	38
2.5.2 Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1)	40
2.5.2.1 <i>Aspectos gerais do TRPA1</i>	40
2.5.2.2 <i>Participação do receptor TRPA1 na dor do câncer</i>	41
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 ARTIGOS	47
4.1 ARTIGO 1	47
4.2 ARTIGO 2	60
4.3 ARTIGO 3	71
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	89
7 PERSPECTIVAS	91

APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados e a metodologia sob forma de artigos científicos. O item discussão representa a interpretação e análise dos resultados alcançados dos artigos que compõem esse trabalho. Na parte final, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho, considerando todos os artigos. Nas referências menciona-se somente as citações utilizadas nos itens introdução, revisão teórica e discussão geral.

1 INTRODUÇÃO

O corpo humano possui diversos mecanismos de detecção de estímulos externos que são essenciais para a sua sobrevivência. Entre estes estímulos, existe a dor, que apesar de ser um sintoma desagradável, é importante para proteger o organismo humano de possíveis danos e lesões (JULIUS; BASBAUM, 2001; LEE; NEUMEISTER, 2020; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018).

A dor, apesar de ser importante para alertar e proteger o organismo de patógenos e estímulos agressores, pode tornar-se prejudicial. Isso ocorre quando a sua sinalização se apresenta de forma anormal e, em alguns casos, torna-se crônica (LEE; NEUMEISTER, 2020; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). Independente daquilo que torna a dor um processo anormal, isso faz com que ocorra a busca por tratamentos e medicações, que apesar de terem a capacidade de diminuir este sintoma, podem levar ao desenvolvimento de efeitos adversos significativos (TSAGARELI et al., 2018). Com isso, existe a necessidade de elucidar melhor os mecanismos fisiológicos da dor e encontrar melhores tratamentos para pacientes que sofrem com dores crônicas, como a dor neuropática e a dor do câncer.

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), traz o conceito de dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão real ou potencial”. Além disso, a IASP também traz o conceito de nocicepção sendo “o processo neural de codificação de estímulos nocivos” (DESANTANA et al., 2020; TREEDE, 2018). Essa diferenciação é importante pois os estudos sobre os mecanismos da dor que ocorrem em laboratórios utilizando modelos animais, buscam, na verdade, entender o mecanismo da nocicepção, que nada mais é que a ativação fisiológica de vias neurais por diversos estímulos potencialmente nocivos (LEE; NEUMEISTER, 2020; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015).

Devido ao fato de a dor ser um processo complexo, ela é classificada em diferentes formas, como dor nociceptiva, inflamatória, neuropática ou nociplástica (TSAGARELI et al., 2018; WOOLF, 2010). A dor nociceptiva é caracterizada como dor aguda e está relacionada com o sistema de proteção do organismo em situações que possam desencadear lesões aos tecidos, onde os neurônios sensoriais estão alertas à estímulos de alto limiar (LOESER; TREEDE, 2008; SNEDDON, 2018). A dor inflamatória também possui a função de proteger o organismo, porém, está associada

ao aumento da sensibilidade sensorial após lesões teciduais para que ocorra o auxílio na recuperação do tecido lesionado (LOESER; TREEDE, 2008; YEKKIRALA et al., 2017). Já a dor nociplástica é aquela forma de dor normalmente crônica (com duração maior que 3 meses) e pode se apresentar em situações que não haja dano tecidual, como a enxaqueca (KOSEK et al., 2016). Já em casos onde existam uma lesão ou disfunção do sistema nervoso periférico ou central, temos a presença de dor neuropática (VON HEHN; BARON; WOOLF, 2012). Além dessas classificações, a dor pode ser classificada em aguda e crônica de acordo com a sua duração. Essas classificações são importantes pois permitem o desenvolvimento de novas terapêuticas e abordagens para o tratamento da dor, com maior eficácia e menos efeitos adversos (BELL, 2018).

Em 2019, foi aprovado a nova classificação de dor crônica dentro da Classificação Internacional de Doenças (CID) que deverá entrar em uso em 2022. Essa atualização ajuda no melhor manejo dos pacientes que sofrem com diversas patologias dolorosas, que muitas vezes não tem cura e assim necessitam de cuidados pelo resto da vida (TREEDE et al., 2019). Dentro da CID-11, encontra-se a dor do câncer, a qual é considerada um tipo de dor crônica secundária, e necessita de estudos para melhores tratamentos em pacientes que sofrem com esta patologia (LOESER; TREEDE, 2008; TREEDE et al., 2019). Isso deve-se ao fato de que pacientes que estão em estágio avançado da doença tendem a sofrer com dores crônicas, as quais podem ser proveniente do desenvolvimento da massa tumoral, bem como devido aos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, pelo desenvolvimento de metástases, processos cirúrgicos e ainda por tratamentos a longo prazo (SMYTH et al., 2016).

O câncer de mama é um tipo de câncer que tem grandes chances de desenvolver metástase, sendo então de grande preocupação, já que é a o tipo de tumor mais frequentemente diagnosticado em mulheres em todo o mundo (BRAY et al., 2018; ZHU et al., 2015). Apesar de ter uma taxa alta de cura, que varia de 70 a 80% das pacientes, a grande preocupação é o fato dele ter a capacidade de desenvolver metástases à distância, podendo afetar outros órgãos, bem como ossos de diversas partes do corpo, como coluna e íliaco. Isso exige extrema atenção, já que o desenvolvimento de metástase no osso pode levar ao aparecimento de dor óssea, a qual pode limitar a qualidade de vida, bem como desenvolver fraturas, levando a um grande estresse emocional (HARBECK et al., 2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

Com isso, observa-se a necessidade de se desenvolver tratamentos adequados para esses quadros de dor crônica relacionadas ao câncer.

Baseado nesta necessidade, a Organização Mundial da Saúde (OMS), desenvolveu uma escala analgésica para o tratamento da dor do câncer, possuindo eficácia de 70% nestes quadros dolorosos. Esta escala apresenta medicamentos anti-inflamatórios da classe dos não esteroides, como também o paracetamol, bem como opioides fracos e fortes. Ainda, a escala mostra que estas classes de medicamentos podem ser associadas a outras classes, denominadas, neste caso, como medicamentos adjuvantes. Estes medicamentos adjuvantes são das classes do anticonvulsivantes, antidepressivos, bifosfonatos e corticoesteroides (ANEKAR; CASCELLA, 2020; WHO, 1986).

Apesar desta escala analgésica ser de extrema necessidade para o tratamento da dor crônica proveniente do câncer, sabe-se que os medicamentos que a compõem possuem diversos efeitos adversos, principalmente quando utilizados por longos períodos (SINDHI; ERDEK, 2019). Além disso, uma parcela dos pacientes desenvolve dor refratária que não é efetivamente controlada, e isso pode ocorrer pelo fato de os mecanismos envolvendo a dor óssea relacionada ao câncer ainda não serem bem elucidados (KOLB et al., 2019; ZHU et al., 2015). Acredita-se que com o desenvolvimento do tumor, ocorre a ativação de diferentes canais iônicos, bem como liberação de mediadores inflamatórios e aumento na produção de fatores de crescimento, e assim o aparecimento da dor (SCHMIDT, 2014).

Entretanto, para entender melhor como ocorre todo esse processo, é necessário utilizar modelos animais. Assim, muitos trabalhos já demonstraram que a administração de células tumorais diretamente nos ossos de roedores, leva ao desenvolvimento de dor óssea proveniente do câncer (GOBLIRSCH; ZWOLAK; CLOHISY, 2005; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015). É interessante ressaltar que muitas dessas células tumorais, utilizadas em modelos animais para avaliação da dor do câncer, são de linhagem de câncer de mama, já que este tipo de câncer pode causar metástase óssea (HAVELIN et al., 2017; REMENIUK et al., 2018; WANG et al., 2019). Muitos destes trabalhos são realizados para buscar o entendimento de todo esse processo fisiológico e assim encontrar uma nova alternativa para o tratamento da dor do câncer (HAVELIN et al., 2017; REMENIUK et al., 2018; WANG et al., 2019). Com isso, é necessário a caracterização de modelos animais que sejam mais fidedignos com o que ocorre clinicamente no câncer de mama

com metástase óssea e desenvolvimento de dor.

Alguns modelos animais que estudam a dor buscam o entendimento do mecanismo dos canais iônicos conhecidos como receptores de potencial transitório (TRPs) (ZHU et al., 2015). Os TRPs são amplamente expressos no corpo, sendo encontrados no sistema nervoso central e periférico, e atuam como sensores moleculares para estímulos térmicos e químicos. E muitos desses canais podem ser ativados por subprodutos do estresse oxidativo e mediadores inflamatórios (KANEKO; SZALLASI, 2014; TODA et al., 2016). Estes receptores são amplamente estudados em diversas patologias, mas em especial o TRP anquirina 1 (TRPA1), nos últimos anos tem ganhado mais visibilidade em pesquisas relacionadas com o processo da dor oncológica em modelos animais (ANTONIAZZI et al., 2019; BRUSCO et al., 2020; DE LOGU et al., 2020a; FUSI et al., 2014; MATERAZZI et al., 2012; NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013).

O TRPA1 é um receptor que pode ser ativado por substâncias irritantes, bem como produtos derivados do estresse oxidativo. Dessa forma, muitos de seus agonistas estão relacionados a processos inflamatórios e dolorosos, tornando este receptor um alvo importante de estudo para terapias antiinflamatórias e analgésicas (DE ALMEIDA et al., 2021; MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019).

Já foi demonstrado a ativação do TRPA1 em modelos de dor do câncer, onde os animais demonstraram comportamento nociceptivo após a inoculação das células tumorais, e após o tratamento, o qual buscou diminuir a expressão do receptor TRPA1, a nocicepção foi aliviada (YE et al., 2011). Outros estudos também já demonstraram essa associação, onde o antagonismo do TRPA1 diminuiu a nocicepção (ANTONIAZZI et al., 2019; BRUSCO et al., 2020; MAQBOUL; ELSADEC, 2017; ZHAO et al., 2019). Entretanto, nesses modelos, as células tumorais foram inoculadas diretamente no osso, no nervo ciático ou na pele da pata dos animais (ANTONIAZZI et al., 2019; BRUSCO et al., 2020; MAQBOUL; ELSADEC, 2017; ZHAO et al., 2019). Com isso, é interessante desenvolver mais estudos que avaliem a ativação do TRPA1 em modelos onde as células sejam inoculadas no sítio primário, como a glandula mamária, e fisiologicamente ocorra o processo de metástase óssea.

Além disso, sabe-se que pacientes com dor do câncer necessitam muitas vezes de tratamentos analgésicos por longos períodos. Entretanto, como já foi mencionado, inúmeros medicamentos clinicamente utilizados possuem muitos efeitos adversos, como a tolerância. Isso faz com que os pacientes continuem sentindo dor e por muitas

vezes desistam de seus tratamentos para o câncer (MAGEE et al., 2019; NEUFELD; ELNAHAL; ALVAREZ, 2017). Dessa forma, é interessante buscar novas estratégias para tratamentos mais longos para a dor do câncer, que não possuam esses efeitos.

Já se sabe que a ativação do TRPA1 por agonistas endógenos, está relacionada ao desenvolvimento de nocicepção em camundongos (ANTONIAZZI et al., 2019). Porém, quando falamos em dor óssea, ainda não se sabe se existe o aumento de agonistas TRPA1 no tecido ósseo, e até mesmo a expressão deste receptor neste local, o que poderia estar relacionado com a dor óssea proveniente de metástase.

É importante salientar, que o papel do TRPA1 em diferentes tipos de câncer já foi explorado, não somente para o tratamento da dor, mas para outros fins relacionados ao câncer (BUJAK et al., 2019; CHEN et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2021; FATTORI et al., 2016; LIBERATI et al., 2013; SANTONI et al., 2019; TAKAHASHI et al., 2018; YANG et al., 2019). Mas, ainda existem questões a serem respondidas, para assim buscar melhores tratamentos para os pacientes que sofrem com este sintoma. Com isso, percebe-se que o papel do receptor TRPA1 é importante no desenvolvimento da dor do câncer, sendo então, um importante alvo para estudos e desenvolvimento de novos medicamentos relacionados a esta patologia.

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a nocicepção em modelo de dor do câncer de mama metastático e avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 neste modelo em camundongos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOR

O sistema sensorial tem como função informar ao cérebro sobre o que está ocorrendo com o corpo usando diferentes vias sensoriais. Por isso, existem vários sistemas sensoriais relevantes no organismo humano para detecção de estímulos internos e externos. Estes podem ser de natureza visual, auditiva, olfatória, tátil ou ainda dolorosa. Dessa forma, cada estímulo é identificado por estruturas específicas das vias sensoriais, que expressam receptores sensíveis para as formas específicas de estímulos. Neste contexto, a dor é normalmente utilizada pelo organismo humano como um sistema de proteção para prevenção de lesões teciduais, sendo essencial para a sobrevivência (JULIUS; BASBAUM, 2001; LEE; NEUMEISTER, 2020; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018).

A capacidade de distinguir os estímulos nocivos daqueles que são inócuos é relevante para a sobrevivência e bem-estar dos animais vertebrados ou invertebrados (BURRELL, 2017; SNEDDON, 2018). Isso foi confirmado ainda no ano de 1906, quando um pesquisador chamado Sherrington propôs a existência de nociceptores, os quais já se sabem que são neurônios sensoriais primários, que realizam a transdução de estímulos dolorosos em tecidos periféricos, que poderiam gerar lesões teciduais (BURKE, 2007). A dor pode ser provocada por qualquer estímulo que tenha potencial de danificar um tecido, ou seja, estímulos de alto limiar. Com isso, a dor alerta o organismo de possíveis patógenos ou estímulos agressores que possam vir a causar danos maiores para o indivíduo (LEE; NEUMEISTER, 2020; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018).

Apesar da sensação de dor ser uma maneira de proteger o organismo, em algumas patologias a sua sinalização pode se apresentar anormal e tornar-se crônica, sendo prejudicial ao organismo acometido (LEE; NEUMEISTER, 2020; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). Neste caso pode-se citar a dor neuropática que é causada por doença ou danos no sistema nervoso, ou a dor inflamatória crônica, onde a inflamação nas articulações passa a não ser mais um fator benéfico à reestruturação do tecido e este sintoma pode ser de difícil tratamento (WOOLF, 2010).

Neste cenário, a dor é um sintoma que frequentemente leva a busca por tratamentos ou o uso constante de medicamentos, os quais nem sempre trarão o alívio

desejado e poderão causar efeitos adversos (TSAGARELI et al., 2018). Independente da origem, a dor crônica é incapacitante, tornando-se uma doença ou sintoma com grande impacto na qualidade de vida do indivíduo e de sua família, bem como na sociedade (RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). Cabe salientar que a dor, apesar de estar relacionada com a transmissão de estímulos nocivos por parte dos nociceptores, também pode ser modulada por experiências emocionais, sendo então considerada como um fenômeno subjetivo (TSAGARELI et al., 2018).

Dessa forma, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão real ou potencial” (DESANTANA et al., 2020). Assim, pode-se notar que muitas vezes a dor é de difícil avaliação devido ao fato de cada indivíduo experimentar este estímulo de forma pessoal, trazendo diferentes conotações físicas e emocionais (LEE; NEUMEISTER, 2020; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). Por isso, compreender quais são os mecanismos fisiológicos pelos quais os estímulos nocivos podem ser percebidos pelo organismo, é essencial para o entendimento dos diversos tipos de patologias dolorosas e suas possíveis formas de tratamento.

Dessa maneira, para o estudo fisiológico da dor, utiliza-se o termo nocicepção, definido pela IASP como “o processo neural de codificação de estímulos nocivos”, sendo que este processo pode ocorrer sem que ocorra dor ou vice-versa (TREEDE, 2018). Assim, é descrito que os estímulos nocivos que são mensurados em modelos experimentais em animais são descritos como nocicepção (LEE; NEUMEISTER, 2020; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015). A nocicepção é a ativação fisiológica das vias neurais por estímulos de alto limiar, como temperaturas extremas, força mecânica ou compostos químicos. Estes estímulos induzem alguma ação comportamental ou uma resposta de escape, tanto em animais quanto em humanos. Ainda, estes têm a capacidade de ativar fibras aferentes especializadas presentes no sistema nervoso periférico (SNP) (conhecidas como nociceptores). Os nociceptores tem a morfologia pseudo-unipolar na periferia, tendo uma terminação livre em órgãos internos e na pele, e outra terminação no corno dorsal da medula espinal ou no tronco cerebral (LEE; NEUMEISTER, 2020; LEFAUCHEUR, 2019; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018).

Os nociceptores possuem corpos celulares que se localizam no gânglio do nervo trigêmeo (para as inervações da face), no gânglio da raiz dorsal (para as

inervações do corpo) e nos gânglios nodoso e vagal (para as vísceras). No SNP, a dor tem relação com a ativação destes nociceptores que possuem fibras nervosas de pequeno diâmetro, as quais podem ser mielinizadas, conhecidas como fibras A δ , ou fibras não mielinizadas, conhecidas como fibras C. As fibras C têm condução mais lenta e possuem menor diâmetro, estando relacionadas com as sensações de dor em queimação, mal localizada, difusa e contínua. As fibras A δ , de maior diâmetro e com velocidade mais rápida que as fibras C, estão associadas com as sensações de picada, pontiagudas, dor aguda e bem localizada (BASBAUM et al., 2009; LEE; NEUMEISTER, 2020; RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). Estas fibras reconhecem o sinal nociceptivo através de diferentes canais iônicos, ou ainda por receptores acoplados à proteína G, e assim este sinal é conduzido até o corno dorsal da medula espinhal, onde é realizada a primeira sinapse. Após a sinapse espinal, o sinal é conduzido até diferentes estruturas do sistema nervoso central (SNC) através de vias para o processamento cerebral da dor, ocorrendo a percepção da dor (LEFAUCHEUR, 2019).

No corno dorsal da medula espinhal, os nociceptores ativam neurônios de segunda ordem, pela geração do potencial de ação que ocorre por conta da liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e assim o sinal ascende para estruturas do SNC. Após o processo de sinapse na medula espinhal, a informação nociceptiva ascende pelo trato espinotalâmico até chegar no tálamo e posteriormente é projetada para o córtex somatossensorial. Através desta via, a dor é discriminada para o reconhecimento do local e da intensidade do estímulo doloroso (JULIUS; BASBAUM, 2001; WOOLF, 2010). A segunda via percorrida pelos axônios provenientes do corno dorsal da medula espinhal, é a via espinoparabraquial amigdalóide. Esta via é constituída de projeções do núcleo parabraquial e amígdala, que convergem para o córtex insular, responsável pelo descontentamento e sofrimentos associados à dor, e para o córtex cingulado, envolvido na aversão emocional e na reação autonômica ao estímulo desencadeador da dor. Com isso, é possível notar que estas regiões são capazes de relacionar o aspecto afetivo-emocional com à experiência dolorosa (BASBAUM et al., 2009; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

A sinapse entre neurônios nociceptivos na medula espinhal e a liberação dos neurotransmissores, depende da ativação de diferentes canais iônicos como os canais de sódio dependentes de voltagem e do influxo de cálcio causado pela abertura de

canais de cálcio dependentes de voltagem (principalmente do tipo N), porém outros canais podem estar envolvidos nestes mecanismos como os TRPs (BASBAUM et al., 2009; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; JULIUS, 2013; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Devido ao fato da transmissão do estímulo doloroso ser um processo complexo, o qual envolve componentes sensoriais e fatores emocionais, ela pode ser classificada de diferentes formas (Figura 1) (TSAGARELI et al., 2018; WOOLF, 2010). A dor nociceptiva é geralmente uma forma de dor aguda que está associada à proteção do organismo em processos que podem causar lesões potenciais ou reais aos tecidos, onde os neurônios sensoriais estão alertas à estímulos de alto limiar (LOESER; TREEDE, 2008; SNEDDON, 2018). Este tipo de dor deve permanecer intacta após a administração de um analgésico, ou pode ser bloqueada com o uso de anestésicos locais. A perda da capacidade de detectar a dor nociceptiva, devido a alterações raras no gene *SC9A* que está envolvido na codificação dos canais de sódio regulados por voltagem 1.7 (Nav 1.7), pode levar a danos teciduais frequentes nestes pacientes, demonstrando a necessidade da detecção constante de estímulos aversivos (RAOUF; QUICK; WOOD, 2010; WOOLF, 2010).

A dor inflamatória também possui a função de proteger o organismo, porém, está associada ao aumento da sensibilidade sensorial após lesões teciduais para que ocorra o auxílio na recuperação do tecido lesionado. Na dor inflamatória observa-se a ativação do sistema imune com a liberação de mediadores inflamatórios de neurônios sensoriais ou de células inflamatórias causando a sensibilização dos nociceptores. Dessa maneira, indivíduos acometidos por este tipo de dor sentem a sensação dolorosa frente a estímulos que antes eram descritos como inofensivos, que seria a caracterização do sintoma de alodínia. Ainda assim, estes indivíduos podem relatar o aparecimento de dor exacerbada frente a estímulos que antes já causavam dor, um sintoma denominado como hiperalgesia (LOESER; TREEDE, 2008; YEKKIRALA et al., 2017). Na dor inflamatória aguda este tipo de hipersensibilidade auxilia a resguardar o tecido lesado, porém na artrite reumatoide ou em outras formas de artrite, a dor inflamatória crônica necessita de controle com o uso de medicamentos de forma contínua (YEKKIRALA et al., 2017).

Além disso, a dor nociplástica é aquela forma de dor que é normalmente crônica (com duração maior que 3 meses). Ela pode ser observada em situações em que não há dano tecidual detectável, como no caso da fibromialgia ou da enxaqueca (KOSEK

et al., 2016). Já para a dor neuropática é observada lesão ou disfunção do SNP ou SNC, que causa conseqüentemente anormalidades das vias nociceptivas mesmo após a resolução da lesão neuronal (VON HEHN; BARON; WOOLF, 2012). Assim, ocorre a facilitação da geração de estímulos dolorosos devido a sensibilização central e/ou periférica, com o aparecimento de dor espontânea, alodínia e hiperalgesia (LOESER; TREEDE, 2008; WOOLF, 2010). A dor neuropática periférica pode ser detectada após a administração de quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer. Neste caso, este tipo de dor pode influenciar na terapêutica e reduzir a qualidade de vida dos pacientes (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017).

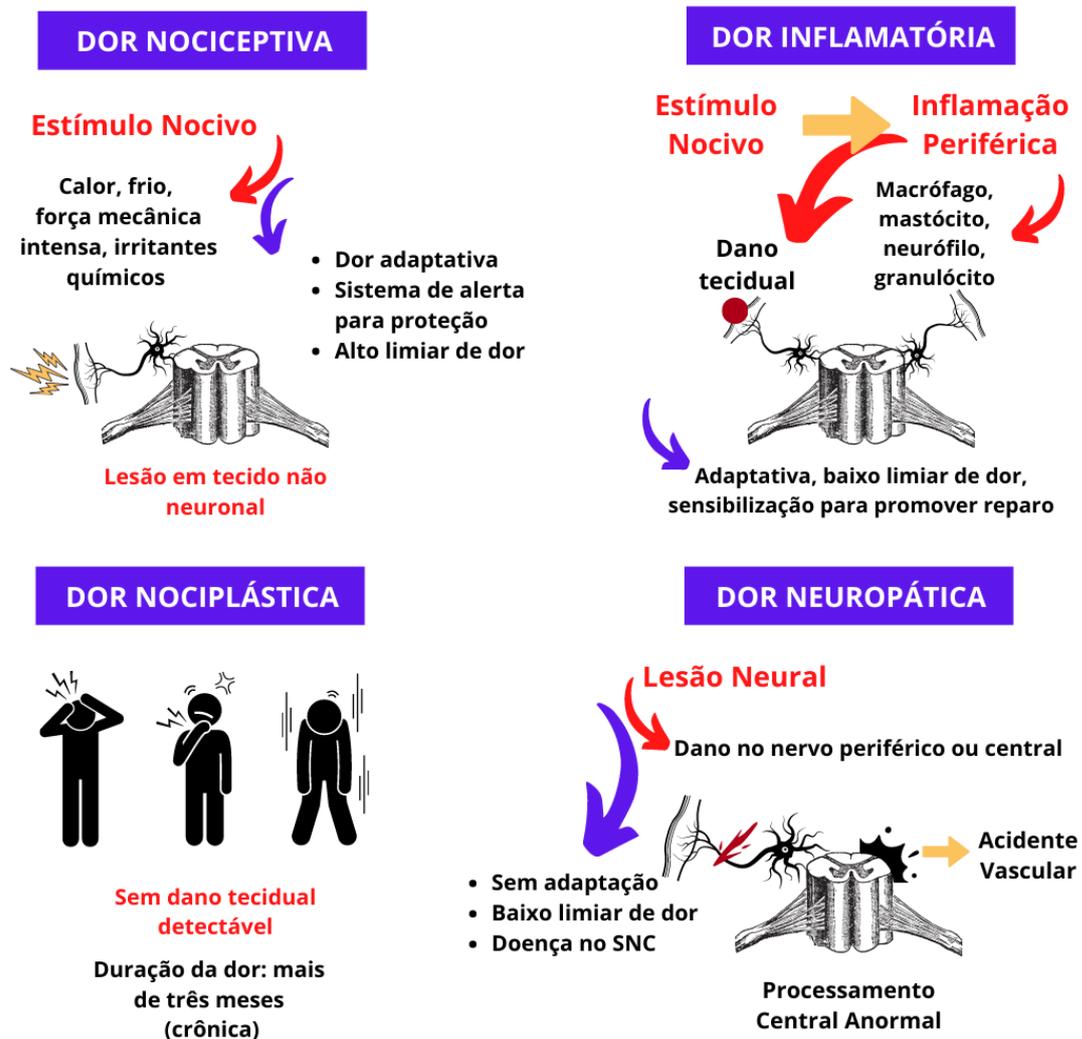
Em 2019, foi aprovada a nova classificação de dor crônica para a Classificação Internacional de Doenças (CID), a CID-11, que deverá entrar em vigor em 2022. Dentro dela as dores crônicas foram divididas em duas categorias: dores primárias e dores secundárias. A dor crônica primária é definida como dor que persiste ou recorre por mais de três meses, em uma ou mais regiões anatômicas, e está associada a sofrimento emocional ou incapacidade funcional, podendo interferir nas atividades sociais e diárias do indivíduo. Exemplos de dores crônicas que estão nesta categoria são as dores crônicas generalizadas, como a fibromialgia, dores regionais complexas, cefaleia primária crônica e dor orofacial, como a enxaqueca crônica e distúrbio temporomandibular, além da dor visceral primária crônica, como a síndrome do intestino irritável, e dores musculoesqueléticas primária crônica, como dor lombar inespecífica. A dor crônica secundária está relacionada a outras doenças como causa subjacente, onde essa dor pode inicialmente ser considerada um sintoma. Dentro desta classificação podemos citar a dor crônica relacionada ao câncer, dor crônica pós-cirúrgica ou pós-traumática, dor neuropática crônica, dor crônica secundária orofacial ou de cabeça, dor crônica secundária visceral e dor crônica secundária musculoesquelética (TREEDE et al., 2019).

É importante ressaltar que tem se dado ênfase a estudos sobre dores difíceis de serem enquadradas como um sintoma único, como ocorre na dor do câncer, que agora faz parte do CID-11, sendo um tipo de dor crônica secundária. Neste caso, a dor depende de muitos fatores e pode muitas vezes possuir características de dor neuropática ou inflamatória (MANTYH, 2013).

O aparecimento da dor do câncer pode estar relacionado com vários processos importantes de serem entendidos e estudados. O crescimento tumoral pode causar dano tecidual tanto no local de crescimento primário como em locais de metástase,

levando a liberação de uma grande quantidade de mediadores inflamatórios. Além disso, a expansão do tumor pode levar a compressão dos nociceptores ou ao dano ao sistema nervoso, levando à dor neuropática (FALK; DICKENSON, 2014; FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017). Dessa maneira, torna-se importante investigar os mecanismos envolvidos na dor do câncer para que o tratamento desta forma de dor seja mais eficaz.

Figura 1 - Classificação dos tipos de dores.



Fonte: Autora.

2.2 DOR DO CÂNCER

A dor oncológica é um problema frequente encontrado pelos pacientes durante a doença e muitas vezes é causada pela proliferação do câncer, metástase do câncer nos ossos, tratamento do câncer e/ou cirurgia (HUI; BRUERA, 2014; PORTENOY, 2011). No entanto, é um sintoma difícil de controlar, causando ansiedade, depressão, fadiga, alteração do apetite e distúrbios do sono; e, posteriormente, interferindo na qualidade de vida dos pacientes (PORTENOY, 2011). A dor no cenário do câncer ainda é inadequadamente controlada, mostrando a importância da busca por novas terapias e do cumprimento adequado das diretrizes para o tratamento da dor (HUI; BRUERA, 2014).

A avaliação da dor em pacientes com câncer deve caracterizar-se após a queixa de dor, levando em consideração o estado da doença subjacente, esclarecendo a dor em termos de sua causa, síndrome e fisiopatologia e obtendo detalhes sobre outros fatores que podem contribuir para a doença (SEXTON; ATAYEE; BRUNER, 2018). O aparecimento deste sintoma afeta drasticamente a qualidade de vida dos pacientes (HENSON et al., 2020; LIEPE, 2018; MANTYH et al., 2002). Pacientes que se apresentam em estágios avançados da doença relatam o aparecimento da dor crônica (SMYTH et al., 2016). Aproximadamente 35% a 96% dos destes pacientes sofrem por diferentes graus de dor, dos quais cerca de 30% apresentam dor persistente e intensa (HENSON et al., 2020; LIEPE, 2018; ZHU et al., 2015).

O câncer de mama é uma preocupação comum de saúde pública em todo o mundo, mesmo com as diferentes e inovadoras terapias para diminuir a prevalência e mortalidade (ZHU et al., 2015). Este tipo de câncer é o tumor maligno mais frequentemente diagnosticado em mulheres, além de ser a principal causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo (BRAY et al., 2018). Cerca de 40 a 89% das pacientes com câncer de mama terão dor crônica (BOKHARI; SAWATZKY, 2009; LIEPE, 2018). O câncer de mama é frequentemente curável em cerca de 70 a 80% das pacientes quando está no estágio inicial e não desenvolveu metástase (HARBECK et al., 2019). No entanto, esse tipo de câncer comumente produz metástases à distância que podem afetar os pulmões, o cérebro, o fígado e os ossos. Como o câncer de mama avançado só é considerado tratável, é relevante controlar a dor óssea, prevenir fraturas ósseas e reduzir o estresse emocional (HARBECK et al.,

2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

A dor óssea é um dos tipos mais comuns de dor crônica nestes pacientes, e a principal razão para este tipo de dor é devido à metástase de câncer ao osso, sendo o osso o primeiro local de metástase para esse câncer primário (HIASA et al., 2017; ZHU et al., 2015). O câncer de mama é a causa mais comum de câncer com doença metastática, e aproximadamente 73% dos pacientes que apresentam câncer de mama em estágio terminal desenvolvem metástases ósseas (CURRIE et al., 2013; SHENOY et al., 2016). Estes indivíduos apresentam um estado de dor complexa sofrendo com dor espontânea, sem nenhum estímulo aparentemente claro, e dor evocada, aquela que é causada por um estímulo, como o simples movimento de caminhar (CURRIE et al., 2013; LIEPE, 2018; MANTYH et al., 2002).

Dessa forma, a dor induzida pelo câncer envolve mecanismos inflamatórios e neuropáticos, pois a expansão do tumor induz danos nos tecidos e liberação de vários mediadores inflamatórios. Além disso, o câncer também pode comprimir ou crescer dentro de um nervo sensorial, causando alterações neuropáticas, ocasionando o aparecimento desta dor, que é gerada por lesão ou patologia do sistema somatossensorial em seus elementos periféricos (dor neuropática periférica) ou no SNC (dor neuropática central) (FALK; DICKENSON, 2014; MANTYH, 2018)

As metástases ósseas, além de levarem o indivíduo a desenvolver dor, estão relacionadas a eventos potencialmente fatais relacionados ao esqueleto como as fraturas ósseas (GUISE, 2013). O desenvolvimento de metástase necessita de diferentes processos, sendo que se um deles não estiver completo, o aparecimento de metástase não ocorre (BIEHLER-GOMEZ; GIORDANO; CATTANEO, 2019). A “cascata metastática” é o processo em que as células tumorais são disseminadas através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos para órgãos distantes do local de desenvolvimento do tumor primário. Ao aderirem neste local, as células tumorais se proliferam e promovem a angiogênese dentro do novo órgão (DUPRÉ; REDELMAN; HUNTER, 2007). A “invasão” é o processo que se relaciona com a adesão das células tumorais à matriz extracelular que posteriormente leva a degradação da mesma por fatores diversos que são secretados, os quais se diferenciam em cada tipo de tecido, como as metaloproteinases (MCSHERRY et al., 2007).

A “migração e mobilidade” é o processo em que as células metastáticas migram do local primário, sendo que estas são capazes de migrar isoladamente ou

coletivamente. As células metastáticas de tumores de mama altamente diferenciados, são capazes de migrar coletivamente, necessitando da presença de junções intercelulares. Entretanto, células que migram isoladamente podem fazer isso de duas maneiras, através de movimento mesenquimal dependente de protease ou movimento independente de protease (MCSHERRY et al., 2007). Outro ponto importante para o desenvolvimento de metástase é o “microambiente tumoral”, o qual é crítico para a proliferação de células metastáticas. Diferentes células, tanto do sistema imune quanto do próprio órgão, vão interagir com as células tumorais, e juntamente com vasos sanguíneos e linfáticos e com a matriz extracelular, formam um ambiente adequado para o desenvolvimento do tumor metastático (GEIGER; PEEPER, 2009; NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009).

O microambiente ósseo possui fatores de crescimento, que são liberados durante a reabsorção óssea, os quais são capazes de atrair células tumorais e estimular a proliferação deste tumor metastático. Além disso, as células de câncer de mama são capazes de secretar fatores osteoblásticos e osteoclásticos que promovem diferenciação das células ósseas em osteoblastos (células formadoras de osso) e osteoclastos (células de remodelação óssea) e consequente ativação. Assim, os osteoblastos sintetizam fatores de crescimento, que ficam armazenados na matriz óssea, até que a atividade dos osteoclastos os liberte, promovendo assim a proliferação de células tumorais (GOODMAN et al., 2009; ZHOU; LIU; WANG, 2018). O mecanismo do processo de metástase óssea é complexo e envolve interações entre as células tumorais, osteoblastos, osteoclastos e a matriz óssea mineralizada, porém este mecanismo ainda vem sendo bastante discutido, mas pode ser chamado de “ciclo vicioso” devido a interação contínua entre o tumor metastático e as células do estroma ósseo (FUTAKUCHI; FUKAMACHI; SUZUI, 2016; LEIBBRANDT; PENNINGER, 2009).

As células tumorais ao atingirem o microambiente ósseo, secretam fatores que estimulam os osteoblastos, como o peptídeo relacionado ao hormônio paratireóideo (PTHrP). Os osteoblastos que são ativados aumentam a expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). Já foi demonstrado em estudos, que o RANKL, por ligar-se ao seu receptor RANK, é essencial na mediação da ativação de osteoclastos (LIPTON; GOESSL, 2011; WU et al., 2018). Os osteoclastos ativados degradam a matriz óssea produzindo ácido forte e proteinases como as metaloproteinases. A degradação óssea pelos osteoclastos libera alguns fatores de

crescimento, dentre eles o fator de crescimento tumoral β (TGF β), o qual está armazenado na matriz óssea, e juntamente com os outros fatores, estimulam o crescimento do tumor e levam ao aumento dos níveis de PTHrP derivado do tumor (DELAISSÉ et al., 2003; FUTAKUCHI; FUKAMACHI; SUZUI, 2016; ZHOU et al., 2018). Esse processo contínuo faz com que ocorra a aceleração estromal do tumor no microambiente ósseo, proporcionando um local fértil que leva a ação agressiva das células tumorais que chegarem a este local (FUTAKUCHI; FUKAMACHI; SUZUI, 2016). Com isso, as metástases ósseas podem ser divididas em três tipos: as osteolíticas, osteoblásticas ou mistas. No câncer de mama as metástases são predominantemente osteolíticas, pois estão relacionadas ao aparecimento de hipercalcemia em 30% dos pacientes com metástase óssea, fraturas ósseas e principalmente a dor óssea grave (BIEHLER-GOMEZ; GIORDANO; CATTANEO, 2019).

Curiosamente, a presença e a intensidade da dor não estão necessariamente correlacionadas com o tamanho ou o número de neoplasias ativas. Enquanto alguns sítios metastáticos são completamente indolores, outros causam dor severa a partir de uma única metástase óssea, mesmo na ausência de fratura (BUEHLMANN et al., 2018; FALK; DICKENSON, 2014). Isso é provavelmente o resultado de diferentes balanços entre os mecanismos periféricos e centrais e a capacidade dos sistemas moduladores centrais de reduzir a atividade periférica, podendo ambos variar entre os pacientes. Além disso, a neuropatia no câncer de mama pode surgir como consequência subsequente da intervenção terapêutica, tal como quimioterapia ou cirurgia. Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia são induzidos de forma periférica e centralmente, e impulsos alterados do osso e tecidos circundantes poderiam resultar em um estado de hiperexcitabilidade geral dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal (FALK; DICKENSON, 2014). Devido a estes fatores, pacientes em estágios avançados desta doença relatam a presença de dor em atividades simples, necessitando assim, de uma terapêutica adequada para a melhora deste sintoma (BALLANTYNE; KALSO; STANNARD, 2016; CURRIE et al., 2013; MANTYH et al., 2002).

2.3 TRATAMENTOS PARA DOR DO CÂNCER E MECANISMOS INOVADORES ESTUDADOS

2.3.1 Tratamentos para dor do câncer

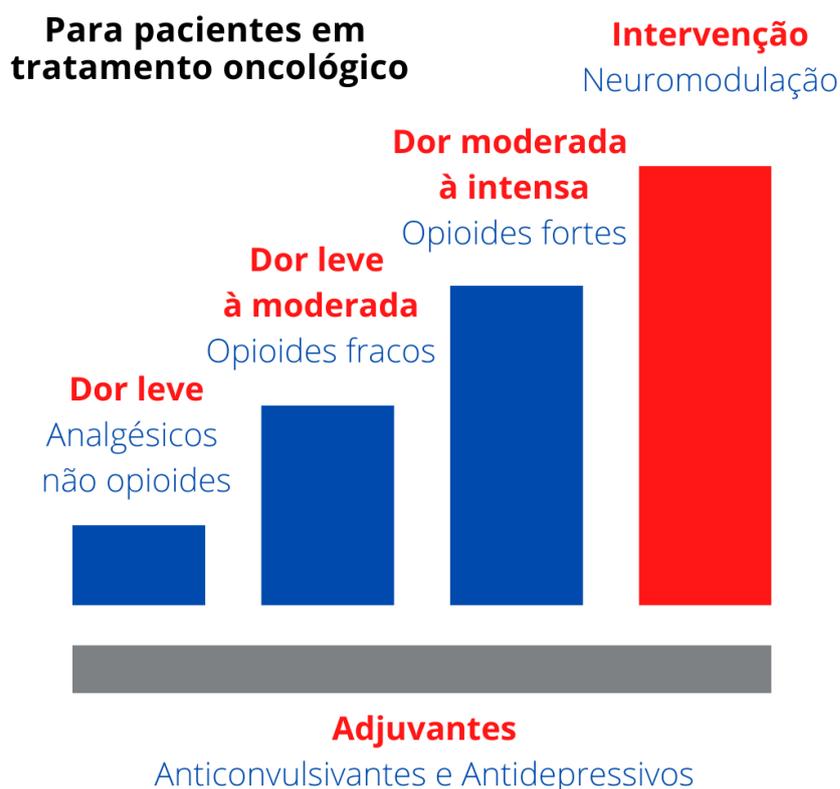
O tratamento para a dor do câncer pode seguir diferentes guias e protocolos dependendo do manejo que cada país adota. Porém, a OMS, possui uma escala analgésica, a qual é utilizada como uma estratégia para diminuir a dor e seus efeitos de forma adequada (Figura 2). A escala analgésica descreve passo a passo, através de uma hierarquia de medicamentos, quais compostos analgésicos devem ser utilizados para cada estágio da dor do câncer em geral aliados a outras abordagens intervencionistas (ANEKAR; CASCELLA, 2020). A escala analgésica da OMS foi criada no ano de 1986 e possui eficácia de 70% para o tratamento da dor do câncer (ANEKAR; CASCELLA, 2020; WHO, 1986). Hoje a escala da dor da OMS inclui quatro etapas que foram revisadas ao longo dos anos, as quais são:

- Primeira etapa: para dor leve, inclui analgésicos não opioides, como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e paracetamol (grupo de analgésicos não opioides), associados ou não a medicamentos adjuvantes. Essa etapa pode ser associada na Escala Visual Analógica (EVA) da dor, que vai de 0 a 10, aos pontos 1, 2 e 3.
- Segunda etapa: para dor leve a moderada, inclui a utilização de opioides fracos, como tramadol, hidroxidona e codeína. Esses medicamentos podem ser associados aos analgésicos não opioides ou ainda a um medicamento adjuvantes. Na EVA, esta etapa relaciona-se aos pontos 4, 5 e 6.
- Terceira etapa: para dor moderada a intensa, inclui a utilização de opioides fortes, como a morfina, oxicodona, tapentadol, metadona, buprenorfina, fentanil, hidromorfona e oximorfona. Esses medicamentos podem ser associados a analgésicos não opioides ou a medicamentos adjuvantes. Na EVA, esta etapa relaciona-se aos pontos 7, 8, 9 e 10.
- Quarta etapa: esta etapa é considerada de intervenção, pois inclui diferentes práticas intervencionistas ou aplicação de fármacos por via espinal ou local para o alívio da dor intensa. Estas práticas podem ser utilizadas em combinação com opioides potentes e outros medicamentos para dor. A etapa de intervenção ocorre quando o médico detecta uma falha na produção de analgesia adequada, mesmo com

altas doses de opioides, ou ainda quando há o desenvolvimento de efeitos adversos intensos. Esta etapa inclui abordagens de neuromodulação, estratégias neurocirúrgicas, administração intratecal ou local de analgésicos ou anestésicos, analgesia epidural, radioterapia paliativa, bloqueio nervoso, fisioterapia, terapia ocupacional e procedimentos ablativos.

Em relação as terapias adjuvantes, que podem ser utilizadas nas etapas de controle da dor, estas englobam inúmeros compostos de diferentes classes farmacológicas. Estes medicamentos são anticonvulsivantes (gabapentina e pregabalina), lidocaína tópica ou capsaicina, antidepressivos tricíclicos (TCAs, incluindo nortriptilina e amitriptilina), inibidores de recaptção de serotonina-norepinefrina (IRSNs, venlafaxina e duloxetina), inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs), bisfosfonatos e corticosteroides. Ainda, para a dor neuropática relacionada ao câncer, podem ser utilizados antidepressivos ou anticonvulsivantes. Também, agentes tópicos (como a capsaicina e a lidocaína) podem ser úteis em alguns casos, bem como tramadol e/ou opioides fortes no tratamento da dor neuropática (ANEKAR; CASCELLA, 2020; BALLANTYNE; KALSO; STANNARD, 2016; DERRY et al., 2017; HUI; BRUERA, 2014; LIU et al., 2017; WHO, 1986; PORTENOY, 2011; SINDHI; ERDEK, 2019; VARRASSI et al., 2018). É importante salientar que a escala analgésica deve ser usada em uma abordagem bidirecional e que se a dor crônica diminuir ou desaparecer, os medicamentos podem ser alterados de acordo com as etapas já mencionadas. Ainda, o manejo da dor também deve seguir a causa inicial do sintoma (ANEKAR; CASCELLA, 2020; HUI; BRUERA, 2014; LIU et al., 2017; PORTENOY, 2011).

Figura 2 - Ilustração da Escala Analgésica da Dor



Fonte: Autora.

2.3.2 Tratamentos para dor óssea induzida pelo câncer

O controle da dor óssea, proveniente do câncer com metástase óssea, tem seu controle muito parecido com a dor do câncer em geral. Dever ser controlado por uma abordagem multimodal, utilizando-se de estratégias farmacológicas e/ou não farmacológicas (HENSON et al., 2020; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). Entretanto, alguns pontos podem ser considerados.

Devido ao fato da dor óssea induzida pelo câncer ser originada, principalmente pela proliferação e consequente migração de células tumorais, os próprios tratamentos anticâncer, como radioterapia, quimioterapia e cirurgia, podem reduzir a dor do indivíduo. Isso ocorre pelo fato destes tratamentos diminuírem o crescimento, a proliferação e a infiltração das células cancerígenas no tecido ósseo (SINDHI; ERDEK, 2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019b). Além disso, a utilização de analgésicos, também pode auxiliar neste processo. Assim, estas abordagens tem a capacidade de reduzir a dor e aumentar a qualidade de vida dos pacientes (FELLER

et al., 2019; SINDHI; ERDEK, 2019)

Ainda, para pacientes resistentes a estas terapias analgésicas, existem outras opções que podem ser analisadas: neurodestruição e neuromodulação (SINDHI; ERDEK, 2019). A neurodestruição induz a interrupção das vias da dor para o cérebro a partir da medula espinhal, podendo ser utilizada em casos de doença metastática espinal. Entretanto, o efeito analgésico é curto, sendo útil em casos de baixa expectativa de vida. A neuromodulação também pode ser usada para dor intratável de origem neuropática, e a estimulação elétrica da medula espinhal pode ser útil para esse conjunto de pacientes (SINDHI; ERDEK, 2019).

Além disso, em casos seletivos de dor óssea difusa e refratária, existe a opção de administração sistêmica de radiofármacos direcionados aos ossos (samário-153 e estrôncio-89) (GUERRA LIBERAL; TAVARES; TAVARES, 2016). Ainda, existe o tratamento com radioterapia por feixe externo (EBR), sendo muito útil para dor em pacientes com risco de fratura patológica ou pacientes com compressão da medula espinhal, com resultados obtidos rapidamente (LACHGAR; SAHLI; BENJAAFAR, 2017; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

Em relação a tratamentos sistêmicos para dor óssea, existem os inibidores de osteoclastos (bifosfonatos e denosumabe) que retardam a osteólise e reduzem a dor (FELLER et al., 2019; SINDHI; ERDEK, 2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). Os bifosfonatos também são úteis no tratamento da hipercalemia maligna e na redução de fraturas patológicas. Eles agem retardando o dano ósseo causado pelo câncer, reduzindo os níveis de cálcio no sangue e diminuindo os riscos das fraturas ósseas. A ação dessa classe de medicamentos se dá basicamente pelo fato de suas moléculas terem a capacidade de se ligar fortemente ao osso e impedir a reabsorção óssea, através da diminuição da atividade dos osteoclastos (ERDOGAN; CICIN, 2014). Dessa forma, os pacientes que apresentam dor óssea generalizada, podem ser tratados com a administração destas substâncias (clodronato, pamidronato, zoledronato ou ibandronato) (O'CARRIGAN et al., 2017; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). O denosumabe é um anticorpo monoclonal humano que inibe o RANKL, diminuindo a maturação e proliferação dos osteoclastos e, em seguida, a destruição óssea mediada pelos osteoclastos (LUENGO-ALONSO et al., 2019; SINDHI; ERDEK, 2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

Os glicocorticóides (dexametasona e prednisona) são utilizados como adjuvantes nestes casos, e também podem reduzir a dor do câncer ósseo em casos

avançados. Eles tem a capacidade de reduzir a inflamação e o edema, sendo os analgésicos adjuvantes mais utilizados para o tratamento da dor óssea induzida pelo câncer (ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

2.3.3 Efeitos adversos dos tratamentos farmacológicos para dor do câncer e dor óssea induzida pelo câncer

Apesar da necessidade dos tratamentos farmacológicos analgésicos para pacientes com dor do câncer, sabe-se que os medicamentos possuem efeitos adversos, ainda mais quando utilizados continuamente e por longos períodos de tempo (SINDHI; ERDEK, 2019). Os AINEs podem levar à toxicidade gastrointestinal, cardiovascular e renal (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020; SINDHI; ERDEK, 2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). Os opioides estão relacionados com quadros de constipação, podendo também levar ao aparecimento de quadros com náuseas, vômitos, sonolência, confusão mental, coceira, retenção urinária e hipogonadismo. Além disso, os opioides podem induzir hiperalgesia, bem como alucinação e delírio em doses altas (BRUERA; PAICE, 2015; SINDHI; ERDEK, 2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

Em relação aos analgésicos adjuvantes, é muito importante estar atento as interações medicamentosas. Isso, deve-se ao fato de que, os pacientes em tratamento oncológico podem estar fazendo uso de outras medicações (ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). Além disso, alguns adjuvantes podem induzir a sonolência, retenção urinária, boca seca, prisão de ventre, náuseas e tonturas (ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

Para a dor óssea, o tratamento com radiofármacos pode causar mielossupressão, toxicidade renal e aumento de dor (SINDHI; ERDEK, 2019; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). Os bifosfonatos podem induzir a osteonecrose da mandíbula, entretanto seus efeitos adversos mais frequentes são artralgia, mialgia, febre e fraqueza, além de náuseas, edema periférico, dispneia e náuseas (ERDOGAN; CICIN, 2014; O'CARRIGAN et al., 2017; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). O denosumabe também pode aumentar o risco de osteonecrose da mandíbula, mas seus efeitos adversos mais comuns são náusea, fraqueza e diarreia (ERDOGAN; CICIN, 2014; O'CARRIGAN et al., 2017; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019). E em relação aos glicocorticóides, estes devem ser utilizados em um curto período de tempo, caso contrário, os efeitos adversos estão relacionados a imunossupressão, hiperglicemia,

hipertensão, psicose e úlceras gástricas (ZAJACZKOWSKA et al., 2019).

Por todas essas razões, a utilização dos fármacos analgésicos deve ser limitada e acompanhada por um profissional responsável. Além disso, 45% dos pacientes com câncer são acompanhados por dor que não pode ser efetivamente controlada. Uma das razões para isso, pode ser devido ao fato de os mecanismos moleculares envolvidos na dor do câncer ósseo ainda não terem sido bem esclarecidos (KOLB et al., 2019; ZHU et al., 2015b). Assim, ainda é necessária a busca por novos tratamentos e o desenvolvimento de novos fármacos para a dor do câncer, através da elucidação dos mecanismos envolvidos neste sintoma.

2.3.4 Possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor do câncer

Os mecanismos associados à dor do câncer são ainda incertos, mas acredita-se que possa ocorrer a ativação de diferentes canais iônicos após a instalação do tumor no tecido, como os canais iônicos ativados por ácidos (ASIC), os canais de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), os receptores canabinoides (CB1 e CB2), bem como um aumento na produção de fatores de crescimento (fator de crescimento neuronal, NGF e o fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF) e a liberação de mediadores inflamatórios (triptase e trifosfato de adenosina – ATP) (SCHMIDT, 2014). Também, as causas da dor relacionada ao câncer dependem de muitos fatores, incluindo tipo de tumor, local, estágio da doença, além da tolerância do paciente à dor, sendo assim considerada uma doença heteróloga (PLANTE; VANITALLIE, 2010).

As neurotrofinas, NGF e o BDNF, têm sido estudadas na indução de dor óssea causada por câncer. Usando diferentes modelos de dor óssea induzida por câncer por injeção de células de câncer de mama, foi observado que o NGF está envolvido no surgimento de danos causados por tumor, dor de câncer (sensibilização de nociceptores) e indução de neuroma (BLOOM et al., 2011; JIMENEZ-ANDRADE et al., 2011; MANTYH et al., 2010). Além disso, o BDNF está envolvido na dor óssea induzida por câncer por meio da modulação dos receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) para o glutamato, portanto, essa neurotrofina contribuiu para a sensibilização central e nocicepção em modelos de dor óssea induzida por câncer distintos induzidos pela injeção de células de câncer de mama (TOMOTSUKA et al., 2014; WANG et al., 2012).

Ainda, o fator de necrose tumoral- α (TNF α), uma citocina pró-inflamatória, está

envolvida na dor óssea induzida por câncer após a inoculação do câncer de mama, e os níveis dessa citocina estão aumentados em animais com câncer (LOZANO-ONDOUA; SYMONS-LIGUORI; VANDERAH, 2013). Os níveis de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (interleucina-6, proteína inflamatória de macrófagos-1 ou CCL2 e proteína inflamatória de macrófagos-1a ou CCL3) foram aumentados nas amostras de extrudado de medula óssea em animais dor óssea induzida por câncer (LOZANO-ONDOUA; SYMONS-LIGUORI; VANDERAH, 2013). Ademais, os níveis de interleucina-1 β (IL-1 β) foram aumentados na tíbia e medula espinhal em um modelo de CIBP após injeção de células de câncer de mama e um efeito antinociceptivo induzido por antagonista do receptor de IL-1 (BAAMONDE et al., 2007).

O sistema endocanabinoide presente no organismo de mamíferos engloba os receptores canabinoides tipo 1 (CB1R), os receptores canabinoide tipo 2 (CB2R), ligantes canabinoides endógenos (endocanabinoides) e enzimas metabolizantes. Todo este sistema, presente no sistema imune, no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico é expresso nas vias sensoriais dolorosas (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010; STAROWICZ; FINN, 2017). Os receptores canabinoides fazem parte da família dos receptores acoplados à proteína G e possuem uma porção N-terminal extracelular, uma porção C-terminal intracelular e sete domínios transmembrana. O mecanismo de transdução dos sinais dos receptores canabinoides envolve vias com a participação da proteína G_{i/o}, inibindo a adenilil ciclase e ativando quinases, e modulando canais iônicos, no caso de CB1R (CHAVES, 2008).

Pelo fato dos medicamentos para dor utilizados atualmente na clínica apresentarem efeitos adversos preocupantes, a busca pela utilização do sistema canabinoide vem crescendo cada vez mais (FRAGUAS-SÁNCHEZ; TORRES-SUÁREZ, 2018; STAROWICZ; FINN, 2017). Dessa forma, modelos animais já demonstraram o efeito antinociceptivo de agonistas de receptores canabinoides para o tratamento de diversos tipos de dores como a dor aguda, dor inflamatória, dor neuropática e a dor do câncer com metástase óssea (BILIR et al., 2018; GU et al., 2011; LOZANO-ONDOUA et al., 2010, 2013; STAROWICZ; FINN, 2017; UHELSKI et al., 2013). O fato pelo qual os receptores canabinoides estão relacionados com a modulação da dor é devido as suas distribuições anatômicas, onde estes estão distribuídos nas regiões envolvidas na transdução, transmissão, percepção e modulação da dor, tanto nas vias ascendentes quanto nas vias descendentes (STAROWICZ; FINN, 2017).

Dentro disso, já foi bem demonstrado que além de possuírem efeitos analgésicos, agonistas do CB2R utilizados em modelos de dor do câncer, também conseguem melhorar os parâmetros de degradação óssea decorrente da metástase de células tumorais (LOZANO-ONDOUA et al., 2010, 2013). Isso acontece pelo fato das células ósseas, osteoclastos e osteoblastos, expressarem o receptor CB2R. Para isso, os agonistas desse receptor atuam regulando a atividade dos osteoblastos, suprimindo a atividade dos osteoclastos, fazendo com que ocorra a síntese da matriz óssea, auxiliando na mineralização do osso, o que resulta na reconstrução óssea (LOZANO-ONDOUA et al., 2010). Entretanto, o fato de alguns agonistas canabinoides possuírem efeitos psicotrópicos, principalmente de agonistas CB1R, o que já foi demonstrado em modelos animais (STAROWICZ; FINN, 2017) e o fato de agonistas CB2R não terem apresentados bons resultados em pesquisas na fase clínica (DHOPEHWARKAR; MACKIE, 2014; STAROWICZ; FINN, 2017), o uso destas substâncias analgésicas se torna limitante. Assim atualmente é entendido que os canabinoides não serão fármacos utilizados de forma singular e apenas como adjuvantes na dor do câncer.

Em relação aos ASICs, estes canais são uma família de canais de cátions expressos principalmente em neurônios e são ativados por prótons. Tanto a distribuição destes canais ao longo do neuro-eixo da dor, quanto sua capacidade de detectar mudanças fisiopatologicamente relevantes no pH do tecido que estão associadas à sensação de dor e a analgesia produzida pelo bloqueio farmacológico desses canais, estão associados ao desenvolvimento de nocicepção (DUBE; ELAGOZ; MANGAT, 2009).

O TRPV1 é um canal que também está relacionado com o desenvolvimento de nocicepção, porém com mecanismo diferente dos receptores já citados. Este canal é expresso principalmente pelos neurônios do gânglio do trigêmeo (TG) e por neurônios de pequeno diâmetro dentro dos gânglios sensoriais, como o gânglio da raiz dorsal (DRG). Inicialmente, foi relatado que este canal respondia a diferentes estímulos, como o calor nocivo ($> 43^{\circ}\text{C}$) e a capsaicina, presente na pimenta, que funciona como um agonista químico. Ainda, foi demonstrado que o TRPV1 pode ser ativado por pH baixo ($\leq 5,9$) e vários outros estímulos, que quando associados, potencializam a ativação do canal (BENÍTEZ-ANGELES et al., 2020).

Um estudo realizado por Heo e colaboradores (2017), utilizando-se de um modelo de dor do câncer com células de fibrosarcoma, também mostrou que os canais

TRPV1 e ASIC são potenciais alvos para o tratamento da dor do câncer (HEO et al., 2017). Isso deve-se ao fato destes canais poderem ser ativados na mudança de pH do local para um pH mais ácido, através da acidificação proveniente da ação dos osteoclastos na reabsorção óssea (CAPPARIELLO et al., 2014).

Uma alternativa para a busca de novos tratamentos para a dor do câncer e diferentes mecanismos envolvidos nesta patologia é o estudo do TRPA1. A relação entre este receptor e o desenvolvimento da dor do câncer já vem sendo relatada há alguns anos, mas ainda poucos estudos foram publicados com essa interação. O primeiro estudo avaliando esta relação foi em um modelo de câncer oral (YE et al., 2011). Foi possível observar o desenvolvimento de nocicepção nos animais, a qual foi revertida pela administração de anti-NGF. Ainda, foi possível observar que o anti-NGF diminuiu a expressão de TRPA1 e TRPV1 do gânglio do trigêmeo (YE et al., 2011). Mais tarde, foi relatado que os tumores orais são capazes de liberar lipídios que ativam TRPA1 e TRPV1 nos neurônios sensoriais, contribuindo para o aparecimento de dor do câncer oral (RUPAREL et al., 2015). Estudos mais recentes também já mostraram este envolvimento, como em um modelo onde o bloqueio de vias de sinalização relacionadas à produção de TNF- α e interleucinas, associadas à ativação do TRPA1, foi capaz de diminuir a dor neuropática relacionada ao câncer ósseo em roedores. Ainda, outros estudos mais recentes já demonstraram a ação antinociceptiva de antagonistas TRPA1 para diminuição da dor do câncer (ANTONIAZZI et al., 2019; BRUSCO et al., 2020).

Embora já se saiba o envolvimento do TRPA1 com a dor do câncer, nenhum estudo descreveu a relação deste receptor com a dor do câncer de mama metastático e não se sabe ainda se este receptor pode ser expresso no tecido ósseo. Desse modo, para que sejam descobertos novos tratamentos para a dor do câncer com metástase é necessária a procura por mecanismos que estejam envolvidos nesta patologia. Entretanto, para que isso ocorra, é necessário desenvolver modelos animais que sejam fidedignos com os sintomas e progressão da doença observados na clínica para o câncer de mama com metástase óssea.

2.4 MODELOS UTILIZADOS PARA OBSERVAR NOVOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DOR DO CÂNCER DE MAMA COM METÁSTASE ÓSSEA

Atualmente existem diversos estudos demonstrando a viabilidade de modelos animais para a avaliação da dor do câncer ósseo e seus mecanismos. Antes de 1999 existiam duas formas para gerar modelos *in vivo* de destruição óssea induzida por tumores (MANTYH, 2013; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015). A primeira delas consistia na injeção de células tumorais no ventrículo esquerdo do coração em animais do tipo roedores. Após a injeção das células, estas se espalhavam para vários locais do corpo, incluindo a medula óssea. A proliferação das células tumorais na medula óssea resultava na formação de um tumor sólido dentro do espaço intramedular e na destruição do osso circundante (SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015). Este modelo reproduz a observação clínica dos sintomas de vários tipos de câncer, como o de mama, próstata e pulmão, pois apresentam maior propensão a realizar metástase nos ossos (LOZANO-ONDOUA et al., 2013; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015). Infelizmente, o uso deste modelo torna difícil estudar a dor óssea induzida por câncer, devido à alta variabilidade entre os animais quanto ao local e tamanho das metástases, sendo que a extensão do desenvolvimento do tumor em qualquer parte do animal, incluindo o osso, é totalmente descontrolada (MANTYH, 2013; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015).

A segunda forma envolve a injeção direta de células cancerosas no espaço intramedular da tíbia ou do fêmur de roedores. Quando comparado à injeção no ventrículo esquerdo, essa forma possuía uma vantagem, pois assim a metástase óssea era assegurada. Contudo, a superfície óssea úmida da cabeça da extremidade distal do fêmur impedia a selagem do local de injeção das células com agentes de vedação convencionais, e onde o orifício de injeção não era vedado, resultava em uma massa tumoral extra esquelética grande e altamente variável (SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015). Dessa maneira, o tumor escapava do osso e invadia os tecidos moles adjacentes, fazendo com que os resultados das pesquisas relacionadas com a dor óssea induzida por câncer fossem confundidos, pois essa massa que invadia os tecidos interferia na avaliação de comportamento relacionado com a dor e destruía os nervos dos animais, resultando em dor neuropática (SABINO et al., 2003; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015).

O primeiro modelo animal controlado de dor óssea induzida por câncer foi relatado em 1999 por Schwei e colaboradores. Neste modelo singênico, células de fibrossarcoma (NCTC 2472) foram implantadas diretamente no fêmur de

camundongos adultos da linhagem B6C3-Fe-a/a e C3H/HeJ. Após o implante das células, o local da injeção foi vedado com amálgama dentária e as células tumorais foram confinadas no espaço da medula até que houvesse a expansão do tumor e degradação óssea induzida pelo câncer. Dessa forma, inicialmente o câncer se proliferava no espaço intramedular do fêmur e não invadia os tecidos moles adjacentes. Com isso, foi possível observar o desenvolvimento da nocicepção sendo possível relacionar esse comportamento ao grau de destruição óssea (SCHWEI et al., 1999). Este modelo permite o desenvolvimento do tumor dentro do fêmur e a avaliação dos comportamentos relacionados a dor do câncer, limitando ao mesmo tempo uma invasão de células tumorais a outros tecidos. Além disso, a injeção intraóssea permite a avaliação simultânea de comportamentos relacionados à dor óssea, crescimento tumoral, alterações neuroquímicas locais e centrais e remodelação óssea (GOBLIRSCH; ZWOLAK; CLOHISY, 2005; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015).

Este modelo de artrotomia seguida de inoculação de células tumorais e inserção no local de injeção foi adaptada para um modelo utilizando-se ratos em 2002 por Medhurst e colaboradores. Neste modelo, as células de carcinoma de glândula mamária MRMT-1 foram implantadas na tíbia de ratos Sprague-Dawley fêmeas, e o local da injeção foi selado com amálgama dentária. Neste estudo os animais desenvolveram alodínia mecânica, a qual foi revertida pelo uso de morfina, mas não pela administração de um inibidor seletivo da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (MEDHURST et al., 2002). Após este trabalho o uso de artrotomia e injeção óssea direta seguida da aplicação de amálgama dentária no local da injeção geraram dezenas de modelos animais distintos para a avaliação da dor do câncer ósseo, variando a espécie de roedor, o local da implantação (fêmur, tíbia, patela, úmero, calcâneo), tipo de célula tumoral (fibrosarcoma, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de próstata) e a linhagem das células tumorais de origem (humano, rato ou camundongo) (SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015).

Como o câncer de mama é um dos principais tipos de tumor que gera metástase óssea e aflige muitos pacientes, o uso de modelos animais direcionados ao estudo desta patologia torna-se interessante e necessária.

2.4.1 Modelos animais de dor do câncer com utilização de células de câncer de mama

Já foi descrito que a injeção no fêmur de células MDA-MB-231, de adenocarcinoma de mama humano, em fêmeas Balb/c, causou alodínia mecânica (UNGARD; SEIDLITZ; SINGH, 2014). Em um outro estudo, também utilizando uma linhagem de células de câncer de mama (66.1 cells) foi feita a injeção das mesmas, em camundongos, no espaço intramedular do fêmur, aumentando significativamente os comportamentos relacionados a dor no dia 7 após a inoculação (MANTYH et al., 2010; SLOSKY et al., 2016; ZHAO et al., 2013). Seguindo esta mesma linha, células da linhagem MRMT-1 também foram inoculadas no fêmur de ratas Sprague-Dawley e levaram o desenvolvimento de alodínia mecânica (ZHU et al., 2018).

Além das linhagens já descritas (SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015; UNGARD; SEIDLITZ; SINGH, 2014; ZHU et al., 2018), outras linhagens de células de câncer de mama são utilizadas para o estudo de dor do câncer ósseo. As células Walker 256 são muito utilizadas por possuírem capacidade metastática elevada e são geralmente injetadas na tíbia dos animais. Após a inoculação destas células em ratos Sprague-Dawley, os animais podem desenvolver comportamentos relacionados a dor, como alodínia mecânica, hiperalgesia ao calor e dor evocada por movimento (DING et al., 2017; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015; WANG et al., 2019). Ainda, existem outras linhagens de câncer de mama utilizadas para inúmeros estudos, principalmente relacionados a dor do câncer (HAVELIN et al., 2017; REMENIUK et al., 2018).

Entretanto, como pode ser observado, a maioria dos estudos realizados para avaliar a dor do câncer, fazem uso de linhagens de células tumorais capazes de desenvolver metástase óssea quando injetadas diretamente no osso. Esses modelos apesar de serem muito utilizados desde a sua descoberta, não demonstram o que ocorre realmente na clínica. Com isso, seria interessante utilizarem-se modelos em que as células cancerígenas possam desenvolver metástase óssea naturalmente, sem que haja injeção direta no osso.

O primeiro modelo em que as células cancerígenas foram inoculadas em um local de desenvolvimento de tumor primário, neste caso na glândula mamária de camundongos BALB/c, para desenvolvimento de metástase óssea foi desenvolvido em 1999 (LELEKAKIS et al., 1999). Baseado nisso, um estudo realizado em 2013,

utilizou duas linhagens de células de câncer de mama (67NR e 4T1) com o intuito de avaliar a atividade pró-metastática das células T, e para isso as células 4T1 (células metastáticas) foram inoculadas na quarta glândula mamária de camundongos BALB/c fêmeas, e após o período de 16 dias, foi observado a presença de metástase óssea derivada desta linhagem celular (LELEKAKIS et al., 1999; MONTEIRO et al., 2013).

Além de mostrarem capacidade de metástase óssea, as células 4T1 já vem sendo utilizadas em estudos para a avaliação da ação citotóxica de quimioterápicos (WANG et al., 2015; YERLIKAYA et al., 2016). Em um estudo *in vitro*, as células 4T1 de camundongos BALB/c foram cultivadas em meio RPMI-1640 com soro fetal bovino para avaliarem o tratamento de câncer de mama envolvendo o antineoplásico bortezomib (YERLIKAYA et al., 2016). Em outro estudo, *in vivo*, utilizando-se de camundongos fêmeas BALB/c, as células 4T1 foram inoculadas nos animais através de injeção intratibial para o crescimento de tumores nos ossos e no pulmão, objetivando os efeitos do quimioterápico do letrozol nas metástases provenientes de câncer de mama (WANG et al., 2015). Além disso, outro quimioterápico utilizado para o tratamento do câncer de mama, o paclitaxel, já teve seus efeitos avaliados através do uso de células 4T1 em camundongos (ELOY et al., 2017).

Além disso, a injeção de células 4T1 no fêmur de camundongos machos e fêmeas induziu comportamento relacionado à dor, onde as fêmeas tiveram um início mais precoce da nocicepção, porém com ambos os gêneros desenvolvendo degradação óssea semelhante (FALK; DICKENSON, 2014). Em outro estudo, usando camundongos Balb/c fêmeas, houve o desenvolvimento de dor espontânea, alodínia mecânica e hiperalgesia ao calor após injeção de células 4T1 no fêmur (ZHAO et al., 2013). Outro estudo demonstrou que a inoculação tibial de células 4T1 em camundongos Balb/c fêmeas levou ao desenvolvimento de alodínia mecânica, hipersensibilidade ao frio, hiperalgesia ao calor e comportamentos nociceptivos espontâneos (ABDELAZIZ; STONE; KOMAROVA, 2014). Porém, até o momento da realização deste estudo, o modelo de inoculação de células 4T1 diretamente na glândula mamária de camundongos não havia sido utilizada para verificar a presença de nocicepção, ou ainda testar novos mecanismos que poderiam estar envolvidos na dor do câncer metastático no câncer de mama.

Considerando o que foi exposto, o presente estudo traz um diferencial, pois utiliza um modelo animal de câncer de mama metastático, avaliando a nocicepção, através da inoculação das células cancerígenas na glândula mamária dos animais.

Isso mostra o que ocorre clinicamente quando se fala em dor do câncer de mama por metástase em pacientes (SMYTH et al., 2016). Assim, primeiramente este modelo foi desenvolvido e validado para que posteriormente fosse avaliado a participação do TRPA1 nesta forma de nocicepção.

2.5 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1

2.5.1 Receptores de Potencial Transitório – TRP

Os receptores de potencial transitório (TRP) são sensores celulares polimodais envolvidos em uma grande variedade de processos celulares, e atualmente, mais de 50 membros da família dos TRPs já foram caracterizados (MONTELL, 2005). Nos mamíferos a família dos TRPs é representada por 28 diferentes proteínas agrupadas em 6 famílias, conforme a sua sequência de aminoácidos e sendo divididas em: TRPV (vanilóide), TRPA (anquirina), TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPML (mucolipina) e TRPP (policistina) (KANEKO; SZALLASI, 2014; MONTELL, 2005).

Os canais TRP são compostos estruturalmente de seis domínios transmembrana (S1-S6) sendo que suas regiões amino e carboxiterminais estão localizadas intracelularmente possuindo comprimentos variáveis. A porção carboxiterminal está presente nos diferentes canais, e pode conter uma sequência composta de 23 a 25 resíduos de aminoácidos e é utilizada como uma região para marcação e descoberta de novos receptores da família de TRP (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007). Contudo, diversas repetições de anquirina, uma proteína que promove a ligação do esqueleto proteico à bicamada lipídica, podem estar presentes na região amino-terminal. Estas repetições atuam fazendo a mediação de interações específicas entre as proteínas e os receptores TRP. Além disso, estas repetições estão envolvidas na formação de complexos macromoleculares entre a membrana plasmática e o citoesqueleto (VENKATACHALAM AND MONTELL, 2007).

Os canais TRP são amplamente expressos no corpo e atuam como sensores moleculares para estímulos térmicos e químicos. Vários canais TRP funcionam como termorreceptores (termo-TRP) em fibras sensoriais periféricas sendo ativados por uma faixa diferente de temperaturas, como o TRPV1 que é ativado por altas temperaturas (≥ 43 ° C) ou o TRPM8 um sensor para temperaturas baixas (≤ 25 ° C) (KANEKO; SZALLASI, 2014). Além disso, alguns desses receptores (TRPV1, TRPV4

e TRPA1) também podem ser ativados por subprodutos do estresse oxidativo, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BAI; LIPSKI, 2010; MATERAZZI et al., 2012; TODA et al., 2016).

Além disso, esses receptores são encontrados no sistema nervoso central e periférico, mas também em células não neuronais distintas (como células epiteliais e queratinócitos). Assim, esses canais estão implicados em vários processos fisiológicos (transdução nociceptiva, percepção do paladar e percepção da osmolaridade) e patológicos (obesidade, bexiga hiperativa e câncer). Além disso, diferentes canais do TRP têm sido estudados para o tratamento da dor inflamatória e neuropática, incluindo TRPV1, TRPV3, TRPA1, TRPM8, TRPM3 e TRPV4. Portanto, o uso de compostos direcionados aos canais TRPs sistêmicos deve ser cuidadosamente estudado antes do uso para prevenir a indução de efeitos adversos (KANEKO; SZALLASI, 2014; MORAN; SZALLASI, 2018).

Mutações nos receptores TRP são relacionadas ao desenvolvimento de diferentes doenças, mostrando a importância destes canais em processos fisiológicos (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007; NILIUS, 2007). É interessante ressaltar que várias proteínas TRP foram associadas à diferenciação, migração, apoptose, angiogênese e proliferação de células cancerosas. Além disso, distintos canais TRP estão envolvidos na mecanotransdução por meio da migração celular, e esses canais podem ser responsáveis pela metástase do câncer, incluindo TRPV4, TRPM7 e TRPM4. Assim, os TRPs podem ser usados como novos indicadores de diagnóstico/prognóstico para a progressão do tumor e alvos relevantes para o tratamento do câncer, mas ainda há necessidade de mais pesquisas neste campo (BUJAK et al., 2019; CHEN et al., 2014; FATTORI et al., 2016; LIBERATI et al., 2013; SANTONI et al., 2019; YANG et al., 2019).

Um estudo realizado por Kremeyer e colaboradores (2010) mostrou que uma mutação com ganho de função para o receptor TRPA1 poderia levar a uma síndrome familiar de dor episódica, demonstrando a importância deste receptor para a transdução de estímulos dolorosos (KREMEYER et al., 2010). Estudos já demonstraram a relação deste receptor com a dor presente em modelos de animais de dor do câncer e dor neuropática causada pela administração de quimioterápicos (FUSI et al., 2014; MATERAZZI et al., 2012; NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013).

2.5.2 Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1)

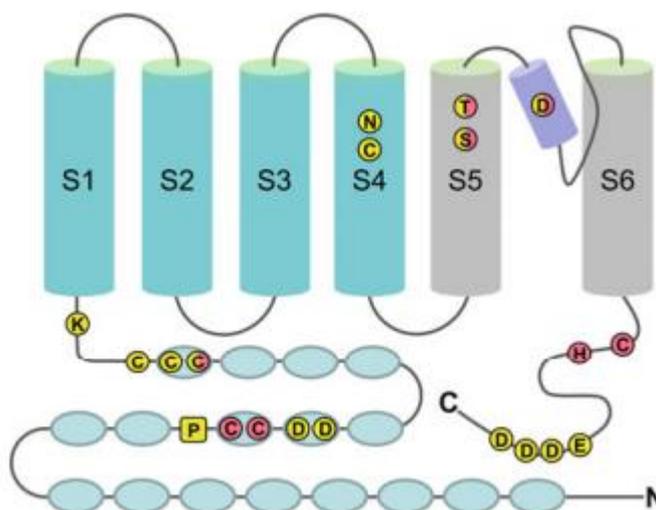
2.5.2.1 Aspectos gerais do canal TRPA1

O receptor TRPA1 (Figura 3) foi isolado pela primeira vez em culturas de fibroblastos, e é um canal não seletivo permeável ao cálcio (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; BARALDI et al., 2010). Este canal é o único representante da subfamília da anquirina em mamíferos. O receptor TRPA1 foi originalmente proposto para ser um sensor de frio nocivo (≤ 17 °C), mas essa denominação difere entre as espécies e, em algumas espécies, pode ser um sensor de calor nocivo. Ainda há necessidade de mais pesquisas para descobrir se o TRPA1 atua como um termorreceptor intrínseco em humanos. No entanto, a administração de antagonistas do TRPA1 não alterou a temperatura corporal em estudos pré-clínicos, e o TRPA1 não influenciou a preferência térmica em camundongos (FERNÁNDEZ-CARVAJAL et al., 2020; MORAN; SZALLASI, 2018). Assim, atualmente esse canal é considerado um alvo relevante para a hipersensibilidade ao frio em modelos animais de dor (FERNÁNDEZ-CARVAJAL et al., 2020; MORAN E SZALLASI, 2018).

O TRPA1 é ativado por diversos compostos naturais de ação irritante, como o cinamaldeído (encontrado na canela), isotiocianato de alila (AITC, presente na mostarda e wasabi), alicina (encontrada no alho), carvacrol (encontrado no orégano e tomilho), gingerol (de gengibre) e timol (encontrado no tomilho). Esse receptor também pode ser ativado por muitos irritantes ambientais, como o crotonaldeído (encontrado na fumaça do cigarro), nicotina, acroleína (um aldeído reativo encontrado na fumaça e na queima de gordura), cloro e formaldeído. Além desse receptor ser ativado por 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE, produzido após da peroxidação lipídica), hipoclorito (a reação da enzima mieloperoxidase causa aumento dos níveis desse composto), produtos reativos de oxigênio (peróxido de hidrogênio - H_2O_2), espécies reativas de nitrogênio (RNS), prostaglandinas ciclopentenonas e metilglioxal (formado após o metabolismo anormal da glicose) produzidos durante o estresse oxidativo e dano tecidual (FERNÁNDEZ-CARVAJAL et al., 2020; MORAN E SZALLASI, 2018). Dessa forma, muitos de seus agonistas estão relacionados a processos inflamatórios e dolorosos, tornando o TRPA1 um importante alvo de estudo para terapias anti-inflamatórias e analgésicas (DE ALMEIDA et al., 2021; MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019).

O canal TRPA1 é expresso tanto em neurônios sensíveis à dor quanto em outras células não neuronais, como células β pancreáticas, células de Schwann, astrócitos, células ciliadas do ouvido interno, células epiteliais no pulmão, intestino delgado, pâncreas e bexiga e células enterocromafins (DE LOGU et al., 2020b; FERNÁNDEZ-CARVAJAL et al., 2020). Bandell e colaboradores (2004) foram os primeiros a relatar que o TRPA1 quando ativado era capaz de causar uma sensação dolorosa (BANDELL et al., 2004). A partir disso, muitos estudos têm demonstrado a associação do TRPA1 com processos dolorosos relacionados às mais diversas patologias, como na dor do câncer e na dor neuropática periférica causada pela administração de quimioterápicos (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019).

Figura 3 – Estrutura molecular do receptor TRPA1.



Fonte: Adaptado de Zygmunt e Högestätt, 2014.

2.5.2.2 Participação do receptor TRPA1 na dor do câncer

A relação entre TRPA1 e o desenvolvimento de dor oncológica no início da doença foi demonstrada pela primeira vez em um modelo de câncer oral usando camundongos BALB/c (YE et al., 2011). As células HSC-3 foram inoculadas no assoalho da boca dos camundongos (modelo de câncer oral). Além disso, essas células também foram administradas na superfície plantar da pata traseira direita para avaliar o desenvolvimento da nocicepção (modelo de dor oncológica). Depois disso, os camundongos desenvolveram alodinia tátil, que foi revertida pela administração de anti-NGF. Além disso, o tratamento com anti-NGF foi capaz de melhorar o tempo de mastigação de animais com câncer oral. O tratamento com essa droga também levou

à diminuição da expressão de TRPA1 e TRPV1 nas células do TG, aliviando assim a nocicepção dos animais (YE et al., 2011).

De forma semelhante, foi demonstrado que os tumores orais são capazes de liberar lipídios que ativam TRPA1 e TRPV1 nos neurônios sensoriais, contribuindo assim para o aparecimento da dor do câncer oral (RUPAREL et al., 2015). Para tanto, foram utilizados ratos Sprague Dawley, que receberam injeção intraplantar de um extrato lipídico de células HSC2, HSC3 ou HSC4. Observou-se que esse extrato lipídico induziu alodinia térmica e mecânica em ratos, onde, neste caso, apenas a alodinia térmica (pelo teste de calor radiante) foi mediada pelos receptores TRPA1 e TRPV1 (RUPAREL et al., 2015).

Além da relação com câncer oral, em um estudo onde foram utilizados ratos Copenhagen, células tumorais anaplásticas-1 foram inoculadas no nervo ciático, e foi possível observar o aumento da expressão do TRPA1 (em neurônios DRG) e o desenvolvimento de hipersensibilidade ao frio e mecânica (MAQBOUL; ELSADEK, 2017). Em outro modelo, camundongos C57BL/6 foram injetados com células de melanoma (células B16-F10) na pata traseira e alodínia mecânica e ao frio e o comportamento de tigmotaxia (uma medida para dor espontânea que avalia o comportamento locomotor do animal) foram detectados 14 dias após a injeção das células tumorais. Também foi possível observar que a ativação do receptor TRPA1 estava relacionada ao processo de estresse oxidativo, sendo essencial para o desenvolvimento da nocicepção do câncer em camundongos (ANTONIAZZI et al., 2019).

Ainda, utilizando células Walker 256 inoculadas na tíbia de ratos Wistar, foi demonstrado que o bloqueio das vias de sinalização relacionadas ao TNF- α e a produção de IL-6, associadas à ativação do TRPA1, levam à diminuição da dor neuropática relacionada ao câncer ósseo em camundongos. A administração intraperitoneal de um inibidor da síntese de TNF- α (pentoxifilina) e de um inibidor do complexo IL-6R-gp130 (SC144), atenuou o desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica e térmica nos animais. Além disso, a administração intraperitoneal do antagonista TRPA1 (HC-030031) também melhorou esses parâmetros de nocicepção. Ainda, a pesquisa mostrou que a administração de inibidores (pentoxifilina e SC144) foi capaz de diminuir a expressão do receptor TRPA1 no tecido DRG (ZHAO et al., 2019).

Outro estudo recente mostrou que camundongos C57BL/6 tratados com

dacarbazina em combinação com células de melanoma (células B16-F10) inoculadas na pata traseira desenvolveram alodinia mecânica e ao frio, e estes parâmetros foram reduzidos pelo bloqueio de receptor TRPA1 utilizando antagonistas seletivos do canal ou animais com deleção gênica para o TRPA1. Este foi o primeiro estudo que avaliou a nocicepção induzida por quimioterapia em um modelo de dor associada a tumor (BRUSCO et al., 2020).

Além de todas essas pesquisas, mostrando o envolvimento do TRPA1 em diversos modelos de dor do câncer, também já foi descrito que o mRNA do TRPA1 tem aumento de expressão em vários tipos de tumores. Ao testar os esferóides de câncer de mama e pulmão que expressam TRPA1, foi detectado que este canal é relevante para a sobrevivência das células internas. Além disso, esse receptor medeia a resistência a quimioterapias que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e o antagonismo de TRPA1 reduz o crescimento do tumor do xenoenxerto e melhora a quimiossensibilidade. Juntos, esses resultados mostraram que o bloqueio do TRPA1 pode ser um receptor interessante para a terapia do câncer (TAKAHASHI et al., 2018).

Finalmente, o papel do TRPA1 em diferentes tipos de câncer foi explorado, mas ainda há necessidade de mais pesquisas neste campo para assumir que o antagonismo do TRPA1 poderia ser uma estratégia relevante para a terapia do câncer (BUJAK et al., 2019; CHEN et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2021; FATTORI et al., 2016; LIBERATI et al., 2013; SANTONI et al., 2019; YANG et al., 2019). É interessante ressaltar que não se sabe ainda se os agonistas e os antagonistas do canal TRPA1 participam do desenvolvimento do tumor ou tem a capacidade de bloquear o crescimento das células malignas no organismo.

Além disso, esses estudos não relatam nenhuma ativação ou presença desse receptor no tecido ósseo. Esta investigação é interessante uma vez que há produção dos compostos oxidantes no microambiente do tumor ósseo, e a presença destes neste ambiente (por exemplo, em neurônios sensoriais), poderia elucidar melhor o mecanismo de dor óssea. Outros TRPs já foram relacionados a este processo, como o TRPV1 e o TRPV4, os quais tiveram o aumento da sua expressão na tíbia de camundongos em um modelo de dor do câncer ósseo (HEO et al., 2017).

Com isso, é possível perceber o canal TRPA1 é um importante receptor relacionado às sensações dolorosas desenvolvidas pelo câncer e seus tratamentos. Assim, este canal é um alvo de grande relevância para o desenvolvimento de novas

terapias analgésicas que tenham menores efeitos adversos e tragam uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes com dor do câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a nocicepção em modelo de dor do câncer de mama metastático e avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 neste modelo em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o desenvolvimento de nocicepção do câncer em um modelo de dor do câncer com metástases em camundongos;
- Observar o desenvolvimento de metástase óssea em um modelo de dor do câncer com metástases em camundongos;
- Estudar o potencial analgésico de compostos disponíveis na clínica para o tratamento da dor em um modelo de dor do câncer com metástases em camundongos;
- Avaliar o potencial analgésico de antagonistas do receptor TRPA1 (HC-030031 e A-967079) em um modelo de dor do câncer de mama metastático;
- Observar o desenvolvimento da dor relacionada ao câncer após a administração intratecal de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1;
- Investigar o desenvolvimento de hiperalgesia química a partir da administração intraplantar de um agonista TRPA1 (AITC) após a indução de nocicepção em um modelo de câncer;
- Avaliar a possível participação do agonista endógeno do receptor TRPA1 (peróxido de hidrogênio) no nervo ciático, na pele da pata e no osso após a indução de nocicepção em um modelo de câncer;
- Avaliar a atividade das enzimas NADPH oxidase e superóxido dismutase no nervo ciático, na pele da pata e no osso após a indução de nocicepção em um modelo de câncer;

- Avaliar o potencial analgésico de um composto antioxidante (ácido α -lipoico) em um modelo de dor do câncer de mama metastático;
- Avaliar a viabilidade celular das células de câncer de mama inoculadas nos animais com o tratamento de um antagonista TRPA1 (HC030031), com um composto antioxidante (ácido α -lipoico) e um medicamento quimioterápico (paclitaxel);
- Avaliar o efeito antinociceptivo, em um tratamento repetido, do antagonista TRPA1 (HC-030031) em um modelo de do câncer de mama;
- Avaliar a expressão proteica do receptor TRPA1 no osso após a indução de nocicepção em um modelo de câncer através da técnica de Western Blot;
- Avaliar a expressão do TRPA1 em nível transcripcional em células de câncer de mama de roedores.

4 ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1 – Characterization of Cancer-Induced Nociception in a Murine Model of Breast Carcinoma – Artigo aceito e publicado na revista Cellular and Molecular Neurobiology em 2019.

Cellular and Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00666-8>

ORIGINAL RESEARCH



Characterization of Cancer-Induced Nociception in a Murine Model of Breast Carcinoma

Amanda Spring de Almeida¹ · Flávia Karine Rigo² · Samira Dal-Toé De Prá² · Alessandra Marcone Milioli² · Diéssica Padilha Dalenogare¹ · Gabriele Cheiran Pereira¹ · Camila dos Santos Ritter¹ · Diulle Spat Peres¹ · Caren Tatiane de David Antoniazzi¹ · Carolina Stein³ · Rafael Noal Moresco³ · Sara Marchesan Oliveira⁴ · Gabriela Trevisan^{1,2,5}

Received: 4 November 2018 / Accepted: 25 February 2019
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Severe and poorly treated pain often accompanies breast cancer. Thus, novel mechanisms involved in breast cancer-induced pain should be investigated. Then, it is necessary to characterize animal models that are reliable with the symptoms and progression of the disease as observed in humans. Explaining cancer-induced nociception in a murine model of breast carcinoma was the aim of this study. 4T1 (10⁴) lineage cells were inoculated in the right fourth mammary fat pad of female BALB/c mice; after this, mechanical and cold allodynia, or mouse grimace scale (MGS) were observed for 30 days. To determine the presence of bone metastasis, we performed the metastatic clonogenic test and measure calcium serum levels. At 20 days after tumor induction, the antinociceptive effect of analgesics used to relieve pain in cancer patients (acetaminophen, naproxen, codeine or morphine) or a cannabinoid agonist (WIN 55,212-2) was tested. Mice inoculated with 4T1 cells developed mechanical and cold allodynia and increased MGS. Bone metastasis was confirmed using the clonogenic assay, and hypercalcemia was observed 20 days after cells inoculation. All analgesic drugs reduced the mechanical and cold allodynia, while the MGS was decreased only by the administration of naproxen, codeine, or morphine. Also, WIN 55,212-2 improved all nociceptive measures. This pain model could be a reliable form to observe the mechanisms of breast cancer-induced pain or to observe the efficacy of novel analgesic compounds.

Keywords Allodynia · Opioids · NSAIDs · Cannabinoid · Bone metastasis · WIN 55,212-2

Introduction

Breast cancer is the type of bone metastasis that is the most common among women worldwide (Zhu et al. 2015; Shenoy et al. 2016; Braun et al. 2017; Sarabia-estrada et al. 2017). These metastases can develop in various bones of the body, as well as in the spine up to the foot bone (Carlesimo et al. 2009; Adler et al. 2018). According to estimates made by the International Association for the Study of Pain (IASP), the prevalence of pain in breast cancer patients ranges from 40 to 89% (Bokhari and Sawatzky 2009; Satija et al. 2014). The management of cancer-induced pain involves different medicines following the World Health Organization (WHO) analgesic scale. However, the continuous use of these drugs for the chronic cancer-induced pain treatment can lead to the appearance of several adverse effects that limit their use (Bokhari and Sawatzky 2009; Plante and Vanitallie 2010; Satija et al. 2014; Zhu et al. 2015). Furthermore, 45% of

✉ Gabriela Trevisan
gabriela.trevisan-santos@ufsm.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc), Criciúma, SC 88006-000, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Building 21, Room 5207, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Published online: 08 March 2019

Springer

cancer patients are accompanied by pain that cannot be adequately controlled (Zhu et al. 2015). Also, the analgesic effect of cannabinoid agonists has been described recently in models of cancer pain, but it is necessary more research to include these compounds in the clinical setting (Craft et al. 2017).

Thus, the search for new treatments and the development of drugs to treat breast cancer pain are urgently necessary. For this, it is essential to investigate the mechanisms involved in this symptom (Wright et al. 2016). However, for this to occur, it is required to characterize animal models reliable to the signs and progression of the disease, as clinically observed for breast cancer with bone metastasis. Thus, it is interesting to use models in which the cancer cells can develop bone metastasis naturally, without direct injection into the bone. Lelekakis et al. (1999) observed for the first time that 4T1 tumor cells cause bone metastasis when inoculated in the mice's mammary gland. Also there is the presence of hypercalcemia in this model, a well-known measure detected in human breast tumors (Lelekakis et al. 1999). Thus, this model is unique because the pattern of metastatic spread closely resembles that observed in human breast cancer.

Although Monteiro et al. (2013) showed the 4T1 cells natural bone metastasis capacity, to date, this murine model of metastatic breast carcinoma has not yet been used to verify the presence of nociception, or to test new mechanisms that could be involved in metastatic cancer pain (Monteiro et al. 2013). In this view, we aimed to validate a new model of pain associated with breast cancer with bone metastasis and test different analgesic drugs used in the clinical setting to treat the cancer pain. Moreover, we observed the antinociceptive effect of a cannabinoid agonist in this model of cancer pain in mice.

Materials and Methods

Animals

Female BALB/c mice (20–30 g) were used and kept at controlled temperature (22 ± 1 °C) in a light/dark cycle of 12 h (lights on 6:00 a.m. to 6 p.m.). It was provided the laboratory standard animal's food (Puro Lab 22 PB pelleted form, Puro trato, Rio Grande do Sul, Brazil) and tap water *ad libitum*, in ventilated cages (5 animals per cage) with wood shaving bedding and nesting material. A total of 154 animals were used in this study. The experiments reported in this study were performed according to the ethical guidelines to investigate pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The experiments were started after approval by the Institutional Committee of Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA, protocol #7536250417/2017),

and by the Institutional Committee of Animal Care and Use of the University of the Extreme South Catarinense (CEUA, protocol #042-2014-02).

Induction of Breast Cancer Pain

The breast cancer pain model with metastasis was obtained through the 4T1 cells injection (Lelekakis et al. 1999; Monteiro et al. 2013). The tumor 4T1 cells were kindly provided by Dr. Adriana Bonomo (Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil) (Monteiro et al. 2013). Using DMEM medium cells were cultured in monolayer supplemented with 5% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. For cancer induction, the cells were resuspended in phosphate buffer and 50 μ l of the cell suspension or vehicle (phosphate buffer) were injected into the right fourth mammary fat pad of female BALB/c mice (10^4 cells).

Designing the Model of Breast Cancer Pain

A baseline measurement of the animals' threshold to the mechanical stimulus (von Frey test), cold thermal stimulus (acetone test), or mouse grimace scale (MGS) were performed. After cells or vehicle injection, behavioral parameters such as the development of mechanical allodynia, cold allodynia, and spontaneous pain (MGS determination) on days 5, 10, 15, 20, 25, and 30 were observed. These parameters were initially evaluated to determinate the maximum nociceptive effect caused by 4T1 cells inoculation. Then, the antinociceptive effect of different compounds was tested. The same animal was used to perform the experimental measures (mechanical threshold, nociceptive time to acetone test, and MGS).

Nociceptive Tests

Mechanical Allodynia

The mechanical sensitivity of animals was evaluated using von Frey filaments of increasing intensity (0.07–2 g) as previously described (Trevisan et al. 2012). Briefly, the animals were set in the experimental site, consisting of elevated acrylic chambers with wire mesh floor, for 1 h. After this period, the right hind paw stimulation of each animal with von Frey filaments was performed by the up-and-down method. The first filament used promoted a pressure of 0.6 g, in case of the paw withdrawal, a filament with a lower pressure was applied. If no withdrawal occurred, a filament with a higher pressure was used. In total, six simulations were performed, using filaments of 0.07, 0.16, 0.40, 0.6, 1.0, 1.4, or 2.0 g. With the results obtained, the value corresponding to 50% of the threshold, in grams, that each animal supports (threshold 50%) was calculated. A decrease in this value was

considered as mechanical allodynia and a reversal in this fall as an antinociceptive (anti-allodynic) effect.

Acetone Test (Cold Allodynia)

Cold thermal allodynia was measured using the modified acetone drop method. The acetone drop (20 μ l) was placed on the plantar surface of the animal's paw skin. The behavioral responses to acetone drop were timed using a chronometer (Trevisan et al. 2013).

Spontaneous Nociception Determination Using MGS

To evaluate the mouse grimace scale, the animals were placed in transparent acrylic boxes, and they were filmed using a high-resolution digital camera positioned on the front and back of the box for 30 min. The animals were then evaluated before (baseline measurement), after the administration of cancer cells, or at 1 h after administration of the analgesic drugs. The images were analyzed through pre-defined scores of 0 to 2, depending on the intensity of the pain (0—without modifications, 1—moderate, and 2—evident). For this, it was observed the changes in the eyes and periorbital region, ears, nose, and vibrissae of the animal (Langford et al. 2010; Miller and Leach 2015).

Locomotor Function

The rotarod test was done as previously described (Trevisan et al. 2012; Wang et al. 2015). On the day of the experiment, the latency (in seconds) to the first fall and the number of falls were recorded for 4 min. In the open field test, the mice were introduced to individual activity chambers (50 \times 50 \times 25 cm), which they had not been previously exposed. Locomotor activity was considered as the number of rearing (vertical movements) and the number of crossings (horizontal movements), which were analyzed for 5 min (Trevisan et al. 2012).

Clonogenic Metastatic Assay and Calcium Serum Measurement

Clonogenic metastatic test supplemented with 6-thioguanine was performed with cells obtained from the iliac bone marrow of BALB/c mice orthotopically injected with 4T1 tumor cells or vehicle (PBS) 20 days after inoculation. The number of metastatic cells in the iliac bone marrow was determined as described before (Pulaski et al. 2000; DuPré et al. 2007; Monteiro et al. 2013).

Animals were deeply anesthetized, and whole blood was collected by transcardial puncture 20 days after the tumor cells or the vehicle injection. Within one hour after coagulating, the blood samples were centrifuged at 2500 \times g for

10 min to separate the serum. Until measurements, samples were stored at -80°C . The quantitative determination of total calcium content in serum was performed using the colorimetric end-point arsenazo III assay (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) in the automated system BS 380 (Mindray, Shenzhen, China).

Treatment Protocols

Evaluation of the Antinociceptive Effect of Analgesics Available in the Clinic and a Cannabinoid Agonist

The animals were inoculated with 4T1 cells in the fourth mammary gland, and 20 days (time that animals presented a maximum nociceptive response) after, the analgesic effect of acetaminophen, codeine, naproxen, or morphine was tested. Animals received intragastric administration of vehicle of acetaminophen (30 mg/kg, intragastric, i.g.), naproxen (10 mg/kg, i.g.), codeine (10 mg/kg, i.g.), morphine (10 mg/kg, i.g.), or their vehicle (1% DMSO, 10 ml/kg, i.g.). The choice of the treatment doses was based on previous research (Whiteside et al. 2004; Minville et al. 2011; Rigo et al. 2013; Raskovic et al. 2015). We also tested the antinociceptive effect of a cannabinoid agonist, WIN 55,212-2 (3 mg/kg, i.g.) in this model (Herzberg et al. 1997). After drugs or vehicle administration, the development of mechanical and cold allodynia was verified after 0.5, 1, 2, and 4 h. MGS determination of animals was assessed 1 h after treatment administration. Administration of treatments was done using an intragastric gavage.

Statistical Analysis

Mean \pm SEM was used to express all values and analyzed by Student's *t* test, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test when appropriate. GraphPad 5.0 software (San Diego, CA, USA) was used for all tests. The $P < 0.05$ values denote significant difference among groups.

Results

Breast Cancer Induced Mechanical and Cold Allodynia and Altered the MGS in Mice

Tumor cells inoculation caused mechanical allodynia from 10 up to 30 days after its injection (Fig. 1a). On days 15, 20, 25, and 30 after 4T1 cells inoculation, animals showed cold hypersensitivity. Significant increases in MGS were observed from 10 to 30 days when compared to control animals or basal values (Fig. 1c). Considering the animals

Fig. 1 4T1 cells inoculation in the mammary gland in mice induced mechanical and cold allodynia and increased MGS. The behavioral testing was performed for 30 days after tumor cells injection (10^4 4T1 cells), and baseline values were measured before tumor inoculation. Control group received PBS injection. **a** Change in mechanical threshold determined using von Frey filaments or **b** nociceptive time reaction to acetone test. **c** Nociception facial score observed after tumor inoculation using the facial grimace scale (MGS). Data are expressed as mean \pm SEM ($n=7$) in **a** and **b** graphs, or as median \pm interquartile in **C** graph. $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, when compared to control group or baseline values [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test (in **a**, **b**) or nonparametric Student's *t* test for each time point evaluated (in **c**)]

presented a maximum nociceptive response 20 days after 4T1 cells inoculation, we choose the day 20 to determine the presence of bone metastasis and to measure the analgesic effect of the drugs.

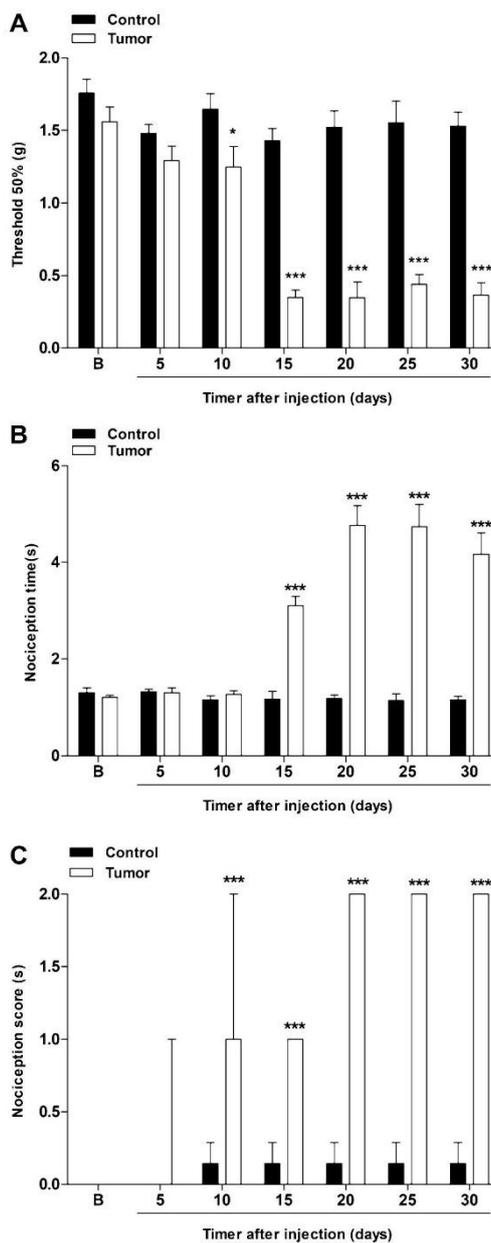
Regarding body weight gain from 5 up to 30 days after tumor cells injection, there was no difference between tumor and control group (data not shown). Also, the animals inoculated with tumor cells showed no change in spontaneous or forced locomotion measured by the open field and rotarod tests, respectively, when compared to the control group. These measurements were also taken 20 days after tumor cell injection (Table 1).

Development of Bone Metastasis in a Cancer-Induced Pain Model and Determination of Calcium Serum Levels

It was observed the presence of colonies of metastatic cells, indicating a process of metastasis in the mice bone. The number of metastatic cells in iliac bone marrow was determined as 18 ± 2 of 4T1 clones/ 10^7 cells in tumor group ($n=5$), and no metastatic clones were detected in control animals 20 days after injection of PBS. The development of bone metastasis after the injection of breast cancer tumor cells induced an increase in blood calcium levels (Table 2).

Antinociceptive Effect of Clinically Available Analgesics in Cancer-Induced Pain

The oral administration of analgesics available in the clinic to treat cancer pain, acetaminophen (30 mg/kg), naproxen (10 mg/kg), codeine (10 mg/kg) or morphine (10 mg/kg) induced an antinociceptive effect in this model of cancer pain (Figs. 2, 3). All drugs presented antiallodynic effect, concerning mechanical or cold allodynia; the antinociceptive effect was determined from 0.5 to 2 h after their administration. Acetaminophen caused a maximum inhibition (I_{max}) on the mechanical and cold allodynia of $50 \pm 6\%$ and $72 \pm 4\%$ at 1 h and 0.5 h after its administration, respectively (Fig. 2a, c). The I_{max} caused by naproxen on the mechanical and cold



hypersensitivity was $85 \pm 5\%$ and $95 \pm 2\%$ at 1 h and 0.5 h after its injection, respectively (Fig. 2b, d).

The codeine administration displayed I_{max} of $90 \pm 12\%$ to the mechanical allodynia after 0.5 h (Fig. 3a) and 100%

Table 1 Assessment of locomotor activity. The spontaneous locomotor activity (open field) was observed for 5 min and the forced locomotor activity (rotarod) observed for 4 min

Group	Open field		Rotarod	
	Crossings	Rearings	Number of falls	Latency for the 1st fall (s)
Control	159.9 ± 10	18.71 ± 2.7	1.71 ± 0.35	72.43 ± 20
Tumor	200 ± 24	30.14 ± 5	1.28 ± 0.52	35.86 ± 20

No significant differences were observed between the groups. The results were expressed as mean ± SEM ($n=7$). Student's t test

Table 2 Calcium serum levels after 20 days of 4T1 cells inoculation in the mammary fat pad of mice

Group	Calcium levels (mM)
Control	1.46 ± 0.12
Tumor	1.91 ± 0.08*

Data are presented as mean ± SEM. Student t test ($n=6$)

* $P < 0.05$ when compared to vehicle group

to the cold allodynia 1 h after its administration (Fig. 3c). The I_{max} caused by morphine on the mechanical and cold allodynia was 100% at 1 h after injection (Fig. 3b, d). Moreover, treatment with naproxen, codeine, and morphine decreased MGS in this model of cancer pain at 1 h after its administration (Figs. 2f, 3e, f). The inhibition percentage observed for the MGS was $50 \pm 10\%$, $62 \pm 16\%$ or $78 \pm 15\%$ for naproxen, codeine, or morphine, respectively. Animals treated with acetaminophen had no significant decrease in this pain-like behavior (Fig. 2e).

A cannabinoid agonist has antinociceptive effect in a breast cancer pain model

The oral administration of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 showed an antinociceptive effect in this model of cancer pain (Fig. 4). The cannabinoid agonist presented antiallodynic effect, concerning mechanical and cold allodynia, from 0.5 to 2 h after its administration and decreased pain-like behavior at 1 h after the treatment. The I_{max} to the mechanical threshold was 100%, after 0.5 h of WIN 55,212-2 administration (Fig. 4a) and the I_{max} to the cold allodynia was $65 \pm 8\%$, after 0.5 h (Fig. 4b). Moreover, the cannabinoid agonist decreased pain-like behavior in this new pain model with bone metastasis, showing an antinociceptive effect at 1 h after its administration. The I_{max} for MGS was $62 \pm 16\%$, after 1 h (Fig. 4c).

Discussion

Cancer is a disease that affects a large part of the world population (Desantis et al. 2014; Torre et al. 2015), and breast cancer is the leading cause of cancer-related mortality in women worldwide (Goddard et al. 2016; Cintolo-Gonzalez et al. 2017). However, the available opioid analgesics to pain control have adverse effects, such as dependence and constipation (Plante and Vanitallie 2010; Zhu et al. 2015). Thus, potential novel analgesics should be tested using animal models of cancer-induced pain (Mantyh 2013; Slosky et al. 2015; Hiasa et al. 2017). In this way, we investigate cancer-induced hypersensitivity in a murine model of breast carcinoma. Animals inoculated directly into the mammary gland showed bone metastasis, mechanical and cold allodynia, and alteration in the mouse grimace scale (as indicative of spontaneous nociception). The hypersensitivity and spontaneous nociception detected in this model were diminished by the acute administration of AINEs or opioids, and by a cannabinoid agonist. Therefore, this mouse model of breast cancer could be used to test different compounds for antinociceptive effect and to study the mechanisms involved in breast cancer-induced pain.

Cancer-induced pain is characterized by pathological symptoms such as mechanical and cold hypersensitivity (Peuckmann et al. 2009; Sarabia-estrada et al. 2017). Here, we detected that mice inoculated with tumor cells develop mechanical and cold allodynia, measured using von Frey test and acetone drop test, respectively. Mechanical and cold allodynia were also presented in other models of cancer-induced pain in mice and rats (Mantyh 2013; Slosky et al. 2015; Hiasa et al. 2017). In fact, after femoral implantation of 4T1 breast carcinoma cells, it was observed the occurrence of pain-related behaviors, cold, and mechanical allodynia (Falk et al. 2013; Zhao et al. 2013; Abdelaziz et al. 2015). Moreover, here we measured spontaneous pain caused by cancer cells inoculation using MGS, which is a relevant data because both mechanical and cold allodynia are measured using reflexive tests. MGS has been emerged as a useful resource to detected spontaneous nociception in models of pain, by measuring changes in the facial expression of mice (Matsumiya et al. 2012; Thomas et al. 2016). The MGS has already been used to assess nociception in different models of pain in mice, such as neuropathic pain (Akintola et al. 2017) and postoperative pain (Matsumiya et al. 2012; Leach et al. 2012).

In the model used in this study, the breast tumor volume usually starts to increase after 7–10 days of 4T1 inoculation; thus, primary tumor volume is often detected in studies that may observe the antitumor activity of treatments

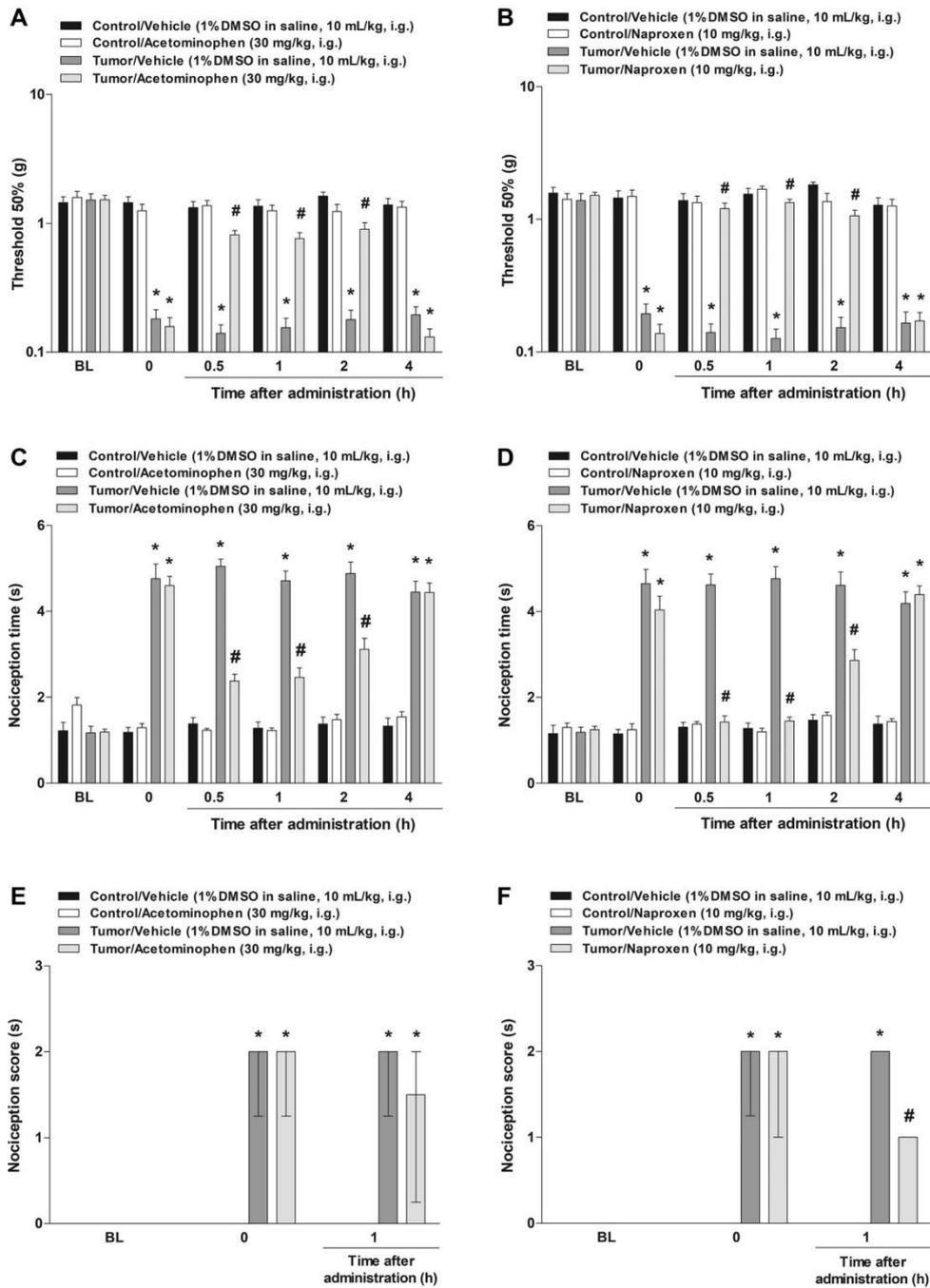


Fig. 2 Acetaminophen and naproxen administration reduced mechanical and cold allodynia, and naproxen diminished the mouse grimace scale (MSG) in a metastatic cancer pain model in mice. **a, b** Mechanical and **c, d** cold allodynia, or **e, f** facial grimace criteria alteration detected 20 days after tumor cells inoculation or vehicle (control group). Treatment with acetaminophen (30 mg/kg) and naproxen (10 mg/kg) was evaluated on a time curve of 0.5, 1, 2, and 4 h to mechanical threshold and cold allodynia and during 1 h to MGS at day 20. Data are expressed as mean + SEM ($n=7$) in **a, b** and **d, e** graphs, or as median + interquartile in **c, f** graphs. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, when compared to control group or baseline values and # $P < 0.05$ when compared to tumor/vehicle group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test (in **a–d**) or nonparametric Student's *t* test for each time point evaluated (in **e, f**)]

(Withana et al. 2012; Bouchlaka et al. 2012; Luo et al. 2015; Pereira et al. 2016; Yue et al. 2018). Here we used animals for the time course of nociception tests until 30 days of tumor injection, because after this period primary tumor volume may increase, impairing the detection of the nociception tests that used reflexive measures (such as von Frey and acetone test, data not shown). Therefore, it is interesting to detect the antinociceptive effect of treatments before tumor volume may reduce locomotor activity of animals. Here we observed that 20 days after 4T1 injection into the mammary fat pad there is no alteration on locomotor activity of mice.

Previously, Monteiro et al. (2013) showed that bone loss and osteoclastogenesis occurred before metastatic bone colonization when 4T1 cells were injected into the mammary gland (Monteiro et al. 2013). Thus, the progression of the disease is well comparable to the process which occurs in the human mammary cancer (Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2001; Monteiro et al. 2013; Takahashi et al. 2015). Thus, the adaptation of metastatic cells infiltration to the bone medium allows its growth and invasiveness (Bednarz-Knoll et al. 2011; Panis and Pavanelli 2015), resulting in bone loss and pain (Panis and Pavanelli 2015). In this model, the detection of mechanical and spontaneous pain at day 10 after tumor cell implantation precede the development of bone metastasis; this may be caused by initial bone loss and osteoclastogenesis that come first in this model and are mediated by pro-osteoclastogenic cytokines (Monteiro et al. 2013). Also, it was described that the levels of IL-17 and RANKL were already increased in iliac and tibia samples at day 11 after 4T1 inoculation (Monteiro et al. 2013). Some of these cytokines, such as IL-17 and RANKL, have already been described to mediate pain in arthritis and mouse models of cancer pain (Honore et al. 2000; Lipton and Goessl 2011; Panis and Pavanelli 2015; Takahashi et al. 2015; McCarty and DiNicolantonio 2016; Dai et al. 2018; Remeniuk et al. 2018). Also, a different study showed that 4T1 orthotopic model caused after two weeks of tumor inoculation into the mammary fat pad the presence of osteolytic lesion and

cortical bone loss in tibia samples, and these focal pre-metastatic lesions occurred before bone metastases (Cox et al. 2015).

Different models could be used to understand the mechanisms involved in bone metastatic cancer-induced pain, as the injection of tumor cells into bones, such as tibia, femur, or calcaneus (Schwei et al. 1999; Medhurst et al. 2002; Goblirsch et al. 2005; Mantyh et al. 2010; Zhao et al. 2013; Slosky et al. 2015, 2016; Hiasa et al. 2017). However, bone implantation of cells results in a significant number of tumor cells inoculated directly into bone, which is a different situation from that observed in breast cancer patients. In this view, tibial injection of 4T1 cells in mice induced nociception after three to five weeks of tumor inoculation in bone, showing that nociception using this model depends on tumor grown into bone and cancer-induced osteolysis (Abdelaziz et al. 2014).

The breast carcinoma model used in this study induces spontaneous bone metastasis after orthotopic primary tumor implantation, and this is a well-known feature of this model. Thus, this breast cancer model had been used to understand the mechanism of bone metastasis or to test novel chemotherapeutic drugs (Monteiro et al. 2013; Cox et al. 2015; Luo et al. 2015; Bottos et al. 2016; Mall et al. 2016; Pereira et al. 2016). After 2–3 weeks of tumor cells injection in the mammary pad, it is expected to observe the presence of bone metastasis, because 4T1 cells possess an invasive behavior (Lelekakis et al. 1999; Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2001; Monteiro et al. 2013; Cox et al. 2015; Bottos et al. 2016; Mall et al. 2016; Pereira et al. 2016). Considering this, we choose the 20th day after tumor cell injection to describe the presence of bone metastasis. Importantly, on this day the animals also presented maximum nociception. Using a clonogenic metastatic assay, we detected metastatic clones in the iliac bone marrow, these data are in accordance with the literature (Monteiro et al. 2013; Pereira et al. 2016) where the metastatic cells proliferation was observed in different regions of mice (DuPré et al. 2007; Abu et al. 2015) showing the metastatic potential of this cell line. Also, at day 20 after 4T1 injection, it is also described the presence of femur and tibia metastasis (Monteiro et al. 2013). Besides, as bone metastasis was detected in iliac bone after 16 days of 4T1 injection, and at day 20 femur and tibia metastasis can detect we used the day 20 to study the antinociceptive effect of treatments. Furthermore, it was observed increased plasma calcium levels in animals that presented bone metastasis. It has already been shown that breast cancer cells that were implanted in mice were related to the development of hypercalcemia (Lelekakis et al. 1999). This increases in calcium, which is consistent with what occurs with breast cancer patients (Yong et al. 2011).

As the metastatic bone cancer grows, it brings nociceptive and inflammatory responses due to nerve compression by the

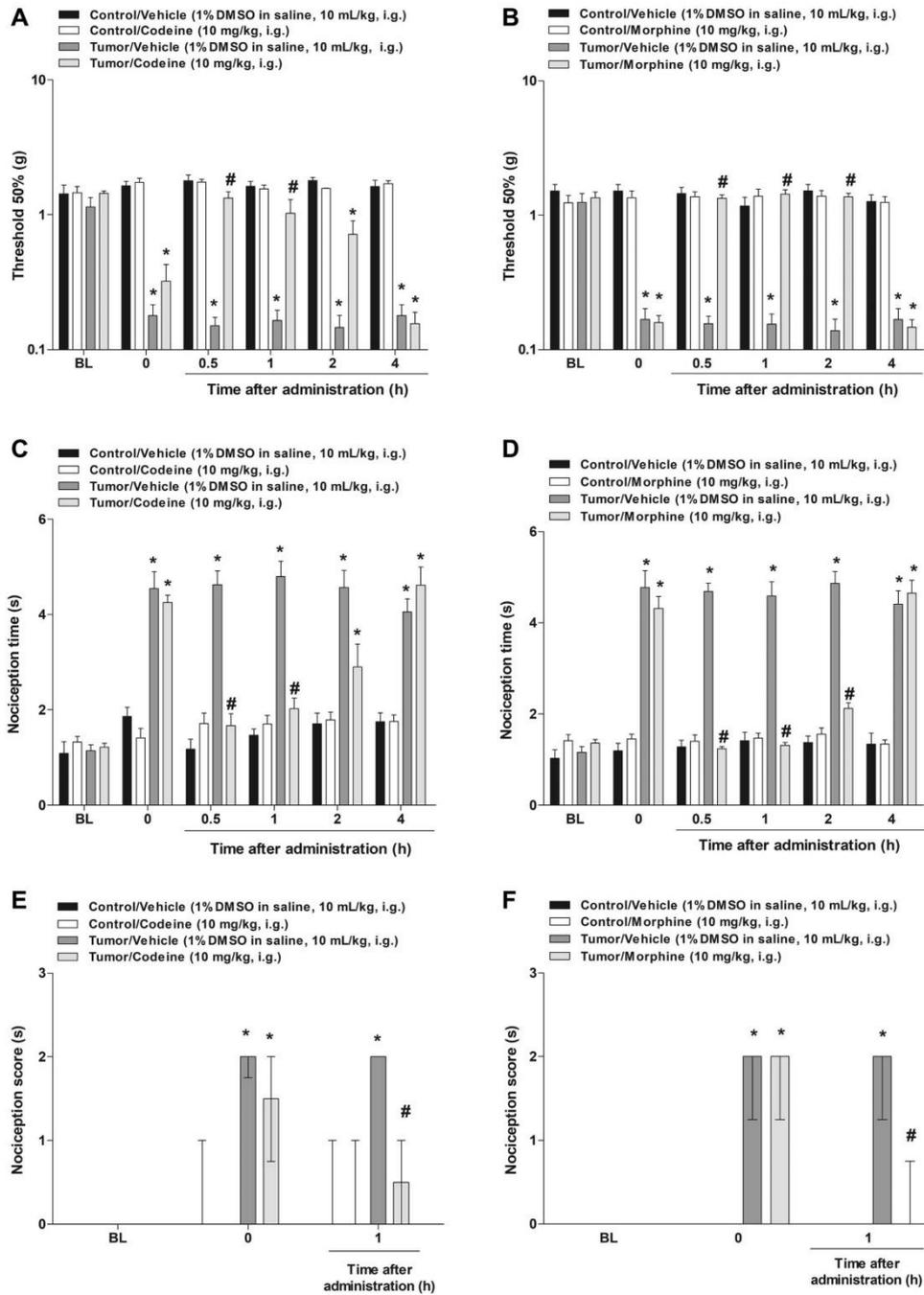


Fig. 3 Codeine and morphine attenuate evoked pain and pain-related behavior in a metastatic cancer pain model in mice. **a, b** Mechanical and **c, d** cold allodynia, or **e, f** facial grimace scale (MGS) alteration detected 20 days after tumor cells inoculation or vehicle (control). Antinociceptive effect of codeine (10 mg/kg) or morphine (10 mg/kg) was evaluated on a time curve of 0.5, 1, 2, and 4 h to mechanical and cold allodynia, or after 1 h to MGS. Data are expressed as mean + SEM ($n=7$) in **a, b** and **d, e** graphs, or as median + interquartile in **c, f** graphs. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, when compared to control group or baseline values and # $P < 0.05$ when compared to tumor/vehicle group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test (in **a-d**) or nonparametric Student's t test for each time point evaluated (in **e, f**)]

tumor, ischemia, and release of several mediators that can act on the afferent fibers. Thus, bone cells and cancer cells initiate a cascade of mechanisms, including activation and sensitization of nociceptors, which help in the pain process and central sensitization (Mantyh et al. 2002; Doré-Savard et al. 2010; Zhu et al. 2015). The World Health Organization (WHO) indicates the use of an analgesic scale describing step by step, through a hierarchy of drugs, which analgesic drugs should be used for each stage of cancer pain in general, associated with the use of an analgesic adjuvant (World Health Organization 1986; Currie et al. 2014; Ballantyne et al. 2016; Derry et al. 2017; Varrassi et al. 2018). Thus, we choose to test different analgesics on this model of cancer pain, using drugs present on the analgesic scale (NSAIDs and opioids drugs). All drugs tested had antinociceptive effect in a murine model of metastatic breast carcinoma, but acetaminophen did not reduce MGS alteration. As expected, morphine treatment showed the best antinociceptive profile when compared to acetaminophen, naproxen, or codeine. Morphine antinociceptive effect in cancer-induced nociception models is well described (Rigo et al. 2013; Xu et al. 2016), and this opioid agonist is frequently used in the clinic to treat cancer-mediated severe pain (Swarm et al. 2007). However, with the disease progression is common to observe patients with intractable pain or to fear the opioids adverse effects, such as opioid-induced hyperalgesia and constipation (Vanderah et al. 2000; Varrassi et al. 2018).

The different mechanisms involved in cancer pain are not adequately described, but the role of cannabinoid receptors

has been related to different cancer-pain models (Lozano et al. 2011; Lozano-Ondoua et al. 2013; Uhelski et al. 2013). Cannabinoid receptors are expressed in afferent neuron fibers, immune cells (as monocytes, T cells, B cells), and bone cells (osteoblast and osteoclasts) and when activated could cause the antinociceptive effect, attenuating bone cancer pain and diminish bone metastasis (Lozano-Ondoua et al. 2010; Uhelski et al. 2013). It has been reported that the attenuation of mechanical hyperalgesia by the WIN 55,212-2 agonist seems to be related to the reduction in spontaneous activity in C-fiber nociceptors that may decrease the conduction of stimuli to maintain the sensitization of nociceptive neurons of the dorsal horn, and a decrease in responses of C fibers evoked by mechanical stimuli (Uhelski et al. 2013). In this way, we also tested in this model of cancer pain a cannabinoid agonist (WIN 55,212-2) that already showed antinociceptive effect in a model of cancer pain caused by injection of 66.1 cells or CCL-11 sarcoma cells into the bone (Lozano-Ondoua et al. 2010, 2013). In the current study, the cannabinoid agonist showed positive results against mechanical and cold allodynia and on spontaneous pain in a murine model of breast carcinoma. As already demonstrated in a murine model of cancer pain, it is likely that CB receptor activation attenuated the responses of C-fiber nociceptors and reduced bone cancer pain by inhibiting the release of immune cell substances that excite and sensitize nociceptors (Uhelski et al. 2013).

In conclusion, the assessment of nociception in a murine model of metastatic breast carcinoma showed the presence of mechanical and cold hypersensitivity and alteration in the MGS measures that could be used to test the antinociceptive effect of tested compounds. Also, in this cancer-induced pain model, we detected the antinociceptive effect of clinically used analgesics, following the WHO analgesic scale. Besides, a cannabinoid agonist also reduced nociception in this murine model of metastatic breast carcinoma, showing the importance of cannabinoid receptors for cancer-mediated sensitization. Finally, this breast cancer model could be used in future studies to measure the antinociceptive and anti-metastatic effect of compounds or to study the mechanisms involved in these processes.

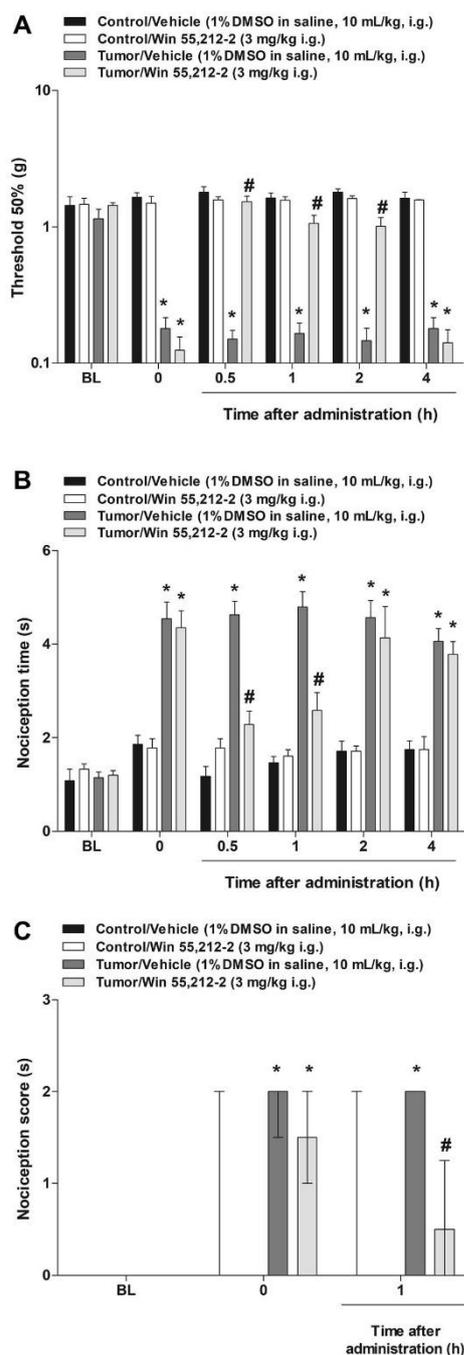


Fig. 4 Effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, in a metastatic cancer pain model in mice. **a** Mechanical and **b** cold allodynia, and **c** facial grimace scale (MGS) alteration detected 20 days after tumor cells inoculation or vehicle (control). Antinociceptive effect of WIN 55,212-2 (30 mg/kg) was evaluated on a time curve of 0.5, 1, 2, and 4 h to mechanical and cold allodynia, or after 1 h to MGS. Data are expressed as mean + SEM ($n=7$) in **a**, **b** graphs, or as median + interquartile in **c** graph. * $P<0.05$, *** $P<0.001$, when compared to control group or baseline values and # $P<0.05$ when compared to tumor/vehicle group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test (in **a**, **b**) or nonparametric Student's *t* test for each time point evaluated (in **c**)

Acknowledgements Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are also acknowledged. Amanda Spring de Almeida is recipient of a PhD fellowship from CAPES. Gabriela Trevisan is recipient of a fellowship from CNPq [process #306576/2017-1].

Author contributions All the authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved this final version. (1) Substantial contributions to conception and design, data acquisition, analysis, and interpretation: Amanda Spring de Almeida, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Alessandra Marcone Milioli, Diéssica Padilha Dalenogare, Gabriele Cheiran Pereira, Camila dos Santos Ritter, Diulle Spat Peres, Caren Tatiane de David Antoniazzi, Carolina Stein, Rafael Noal Moresco, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan. (2) Drafting and critically revising the article important intellectual content: Amanda Spring de Almeida, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Alessandra Marcone Milioli, Diéssica Padilha Dalenogare, Gabriele Cheiran Pereira, Camila dos Santos Ritter, Diulle Spat Peres, Caren Tatiane de David Antoniazzi, Carolina Stein, Rafael Noal Moresco, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan. (3) Final article approval: Amanda Spring de Almeida, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Alessandra Marcone Milioli, Diéssica Padilha Dalenogare, Gabriele Cheiran Pereira, Camila dos Santos Ritter, Diulle Spat Peres, Caren Tatiane de David Antoniazzi, Carolina Stein, Rafael Noal Moresco, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan. (4) Acquisition of funding and general supervision of the research group: Rafael Noal Moresco, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan.

Funding National Research Council of Brazil (CNPq; #422376/2016-7) supported this work.

Compliance with Ethical Standards

The experiments of this manuscript comply with the current laws of the country in which they were performed.

Conflict of interest The authors declare no potential conflicts of interest.

Ethical Approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

References

Abdelaziz DM, Stone LS, Komarova SV (2014) Osteolysis and pain due to experimental bone metastases are improved by treatment

- with rapamycin. *Breast Cancer Res Treat* 143:227–237. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2799-0>
- Abdelaziz DM, Stone LS, Komarova SV (2015) Localized experimental bone metastasis drives osteolysis and sensory hypersensitivity at distant non-tumor-bearing sites. *Breast Cancer Res Treat* 153:9–20. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3517-x>
- Abu N, Mohamed NE, Yeap SK et al (2015) In vivo antitumor and antimetastatic effects of flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice. *Drug Des Devel Ther*. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S67976>
- Adler D, Kriegsmann M, Sinn P et al (2018) Metastatic breast cancer in the spine: molecular predictors for choosing adequate treatment strategies. *Orthopade* 47:594–603. <https://doi.org/10.1007/s00132-018-3540-9>
- Akintola T, Raver C, Studlack P et al (2017) The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiol Pain* 2:13–17. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2017.10.001>
- Ballantyne JC, Kalso E, Stannard C (2016) WHO analgesic ladder: a good concept gone astray. *BMJ*. <https://doi.org/10.1136/bmj.i20>
- Bednarsz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K (2011) Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 13(6):228
- Bokhari F, Sawatzky JAV (2009) Chronic neuropathic pain in women after breast cancer treatment. *Pain Manag Nurs* 10:197–205. <https://doi.org/10.1016/j.pmn.2008.04.002>
- Bottos A, Gotthardt D, Gill JW et al (2016) Decreased NK-cell tumour immunosurveillance consequent to JAK inhibition enhances metastasis in breast cancer models. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/ncomms12258>
- Bouchlaka MN, Sckisel GD, Wilkins D et al (2012) Mechanical disruption of tumors by iron particles and magnetic field application results in increased anti-tumor immune responses. *PLoS ONE* 7:e48049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048049>
- Braun JACD, Blackford AL, Mazzola E et al (2017) Breast cancer risk models: a comprehensive overview of existing models, validation, and clinical applications. *Breast Cancer Res Treat*. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4247-z>
- Carlesimo B, Tempesta M, Fioramonti P et al (2009) Breast cancer metastasis in distal phalanx of the big toe. Case report. *G Chir* 30:487–489
- Cintolo-Gonzalez JA, Braun D, Blackford AL et al (2017) Breast cancer risk models: a comprehensive overview of existing models, validation, and clinical applications. *Breast Cancer Res Treat* 164(2):263–284
- Cox TR, Rumney RMH, Schoof EM et al (2015) The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 522:106–110. <https://doi.org/10.1038/nature14492>
- Craft RM, Haas AE, Wiley JL et al (2017) Gonadal hormone modulation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced antinociception and metabolism in female versus male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.09.006>
- Currie GL, Sena ES, Fallon MT et al (2014) Using animal models to understand cancer pain in humans. *Curr Pain Headache Rep* 18:423
- Dai X-J, Tao J-H, Fang X et al (2018) Changes of Treg/Th17 ratio in spleen of acute gouty arthritis rat induced by MSU crystals. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0839-y>
- Derry S, Wiffen PJ, Häuser W et al (2017) Oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs for fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 9:CD011790
- Desantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A (2014) Breast Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 64:52–62. <https://doi.org/10.3322/caac.21203>
- Doré-Savard L, Otis V, Belleville K et al (2010) Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS ONE* 5:e13774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013774>
- DuPré SA, Redelman D, Hunter KW (2007) The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x>
- Falk S, Uldall M, Appel C et al (2013) Influence of sex differences on the progression of cancer-induced bone pain. *Anticancer Res* 33:1963–1969
- Goblirsch MJ, Zwolak P, Clohisy DR (2005) Advances in understanding bone cancer pain. *J Cell Biochem* 96:682–688
- Goddard ET, Fischer J, Schedin P (2016) A portal vein injection model to study liver metastasis of breast cancer. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/54903>
- Herzberg U, Eliav E, Bennett GJ, Kopin IJ (1997) The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 221(2–3):157–160
- Hiasa M, Okui T, Allette YM et al (2017) Bone pain induced by multiple myeloma is reduced by targeting V-ATPase and ASIC3. *Cancer Res* 77:1283–1295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3545>
- Honore P, Luger NM, Sabino MAC et al (2000) Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/74999>
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML et al (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7:447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
- Leach MC, Klaus K, Miller AL et al (2012) The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the mouse grimace scale. *PLoS ONE* 7:e35656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035656>
- Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ et al (1999) A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis*. <https://doi.org/10.1023/A:1006689719505>
- Lipton A, Goessl C (2011) Clinical development of anti-RANKL therapies for treatment and prevention of bone metastasis. *Bone* 48:96–99
- Lozano A, Wright C, Vardanyan A et al (2011) A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Sci* 86:646–653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.02.014.A>
- Lozano-Ondoua AN, Wright C, Vardanyan A et al (2010) A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.02.014>
- Lozano-Ondoua AN, Hanlon KE, Symons-Liguori AM et al (2013) Disease modification of breast cancer-induced bone remodeling by cannabinoid 2 receptor agonists. *J Bone Miner Res* 28:92–107. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1732>
- Luo K-W, Yue GG-L, Ko C-H et al (2015) The combined use of *Camellia sinensis* and metronomic zoledronate in 4T1 mouse carcinoma against tumor growth and metastasis. *Oncol Rep* 34:477–487. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4001>
- Mall C, Sckisel GD, Proia DA et al (2016) Repeated PD-1/PD-L1 monoclonal antibody administration induces fatal xenogeneic hypersensitivity reactions in a murine model of breast cancer. *Oncoimmunology* 5:1–12. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1075114>
- Mantyh P (2013) Bone cancer pain: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Pain* 154:S54–S62. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.044>
- Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP (2002) Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2:201–209. <https://doi.org/10.1038/nrc747>

- Mantyh WG, Jimenez-Andrade JM, Stake JJ et al (2010) Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.056>
- Matsumiya LC, Sorge RE, Sotocinal SG et al (2012) Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51:42–49
- McCarty M, DiNicolantonio J (2016) Suppression of NADPH oxidase activity may slow the expansion of osteolytic bone metastases. *Healthcare*. <https://doi.org/10.3390/healthcare4030060>
- Medhurst SJ, Walker K, Bowes M et al (2002) A rat model of bone cancer pain. *Pain*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00437-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00437-7)
- Miller AL, Leach MC (2015) The mouse grimace scale: a clinically useful tool? *PLoS One* 10:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136000>
- Minville V, Fourcade O, Mazoit JX et al (2011) Ondansetron does not block paracetamol-induced analgesia in a mouse model of fracture pain. *Br J Anaesth*. <https://doi.org/10.1093/bja/aeq277>
- Monteiro AC, Leal AC, Gonçalves-Silva T et al (2013) T cells induce pre-metastatic osteolytic disease and help bone metastases establishment in a mouse model of metastatic breast cancer. *PLoS ONE* 8:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068171>
- Panis C, Pavanelli WR (2015) Cytokines as mediators of pain-related process in breast cancer. *Mediators Inflamm*. <https://doi.org/10.1155/2015/129034>
- Pereira JX, Azeredo MCB, Martins FS et al (2016) The deficiency of galectin-3 in stromal cells leads to enhanced tumor growth and bone marrow metastasis. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2679-1>
- Peuckmann V, Ekholm O, Rasmussen NK et al (2009) Chronic pain and other sequelae in long-term breast cancer survivors: nationwide survey in Denmark. *Eur J Pain* 13:478–485. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.05.015>
- Plante GE, Vanitallie TB (2010) Opioids for cancer pain: the challenge of optimizing treatment. *Metabolism* 59:S47–S52
- Pulaski B, Ostrand-Rosenberg S (2001) Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>
- Pulaski BA, Clements VK, Pipeling MR, Ostrand-Rosenberg S (2000) Immunotherapy with vaccines combining MHC class II/CD80+ tumor cells with interleukin-12 reduces established metastatic disease and stimulates immune effectors and monokine induced by interferon γ . *Cancer Immunol Immunother*. <https://doi.org/10.1007/s002620050024>
- Raskovic A, Milanovic I, Pavlovic N et al (2015) Analgesic effects of rosemary essential oil and its interactions with codeine and paracetamol in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19(1):165–172
- Remeniuk B, King T, Sukhtankar D et al (2018) Disease modifying actions of interleukin-6 blockade in a rat model of bone cancer pain. *Pain*. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001139>
- Rigo FK, Dalmolin GD, Trevisan G et al (2013) Effect of ω -conotoxin MVIIA and Ph α 1 β on paclitaxel-induced acute and chronic pain. *Pharmacol Biochem Behav*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.014>
- Sarabia-estrada AR, Ruiz-valls A, Guerrero-H et al (2017) Metastatic human breast cancer to the spine produces mechanical hyperalgesia and gait deficits in rodents. *Spine J*. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2017.04.009>
- Satiya A, Ahmed SM, Gupta R et al (2014) Breast cancer pain management—a review of current & novel therapies. *Indian J Med Res* 139(2):216
- Schwei MJ, Honore P, Rogers SD et al (1999) Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 19:10886–10897. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3300-10.2010>
- Shenoy PA, Kuo A, Vetter I, Smith MT (2016) The walker 256 breast cancer cell-induced bone pain model in rats. *Front Pharmacol* 7:1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00286>
- Slosky LM, Largent-Milnes TM, Vanderah TW (2015) Use of animal models in understanding cancer-induced bone pain. *Cancer Growth Metastasis*. <https://doi.org/10.4137/CGM.S21215>
- Slosky LM, BassiriRad NM, Symons AM et al (2016) The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ drives breast tumor cell glutamate release and cancer-induced bone pain. *Pain* 157:2605–2616. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000681>
- Swarm RA, Abernethy AP, Anghelescu DL et al (2007) Adult cancer pain: clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw* 5(8), 726–751
- Takahashi K, Nagai N, Ogura K et al (2015) Mammary tissue microenvironment determines T cell-dependent breast cancer-associated inflammation. *Cancer Sci*. <https://doi.org/10.1111/cas.12685>
- Thomas A, Miller A, Roughan J et al (2016) Efficacy of intrathecal morphine in a model of surgical pain in rats. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163909>
- Torre LA, Bray F, Siegel RL et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108
- Trevisan G, Rossato MF, Walker CIB et al (2012) Identification of the plant steroid alfa-spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J Pharmacol Exp Ther* 343:258–269. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.195909>
- Trevisan G, Materazzi S, Fusi C et al (2013) Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res* 73:3120–3131. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4370>
- Uhelski ML, Cain DM, Harding-Rose C et al (2013) The non-selective cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 attenuates responses of C-fiber nociceptors in a murine model of cancer pain. *Neuroscience* 247:84–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience>
- Vanderah TW, Gardell LR, Burgess SE et al (2000) Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 20:7074–7079
- Varrassi G, Fusco M, Skaper SD et al (2018) A pharmacological rationale to reduce the incidence of opioid induced tolerance and hyperalgesia: a review. *Pain Ther*. <https://doi.org/10.1007/s4012-018-0094-9>
- Wang TX, Yin D, Guo W et al (2015) Antinociceptive and hypnotic activities of pregabalin in a neuropathic pain-like model in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.007>
- Whiteside GT, Harrison J, Boulet J et al (2004) Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. *Br J Pharmacol*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705568>
- Withana NP, Blum G, Sameni M et al (2012) Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer. *Cancer Res* 72:1199–1209. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2759>
- World Health Organization (1986) Cancer pain relief. World Health Organization, Geneva
- Wright LE, Ottewell PD, Rucci N et al (2016) Murine models of breast cancer bone metastasis. *Bonekey Rep*. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.31>
- Xu Y, Liu J, He M et al (2016) Mechanisms of PDGF siRNA-mediated inhibition of bone cancer pain in the spinal cord. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep27512>
- Yong M, Jensen A, Jacobsen JB et al (2011) Survival in breast cancer patients with bone metastases and skeletal-related events: a population-based cohort study in Denmark (1999–2007). *Breast Cancer Res Treat*. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1475-5>

Yue GG-L, Lee JK-M, Chan BC-L et al (2018) An innovative anti-cancer Chinese herbal formula exhibited multi-targeted efficacies in metastatic breast cancer mouse model. *Chin Med* 13:64. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0222-9>

Zhao J, Zhang H, Liu SB et al (2013) Spinal interleukin-33 and its receptor ST2 contribute to bone cancer-induced pain in mice. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.026>

Zhu X, Ge C, Yu Y, Wang P (2015) Advances in cancer pain from bone metastasis. *Drug Des Dev Ther* 2015;9:4239–4245

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.2 ARTIGO 2 – Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma – Artigo aceito e publicado na revista *Pharmacological Research* em 2020.

Pharmacological Research 152 (2020) 104576



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs



Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma



Amanda Spring de Almeida^a, Flávia Karine Rigo^b, Samira Dal-Toé De Prá^b,
Alessandra Marcone Milioli^b, Gabriele Cheiran Pereira^a, Débora Denardin Lückemeyer^c,
Caren Tatiane Antoniazzi^a, Sabrina Qader Kudsi^a, Daniel Mendes Pereira Ardisson Araújo^d,
Sara Marchesan Oliveira^d, Juliano Ferreira^c, Gabriela Trevisan^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc), 88006-000 Criciúma, SC, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
HC-030031 (PubChem CID: 1150897)
A-967079 (PubChem CID: 98082461)
Allyl Isothiocyanate (PubChem CID: 128851)
α-Lipoic Acid (PubChem CID: 6112)

Keywords:
Hydrogen peroxide
α-Lipoic acid
NADPH oxidase
HC-030031
Allodynia
Paclitaxel

ABSTRACT

Breast carcinoma causes severe pain, which decreases the quality of life of patients. Current treatments produce adverse effects and have limited efficacy. Transient potential receptor ankyrin 1 (TRPA1) is related to the onset of cancer and neuropathic pain. The aim of this study was to evaluate the involvement of TRPA1 in a model of breast carcinoma. We injected 4T1 cells in the fourth caudal mammary fat pad of female BALB/c mice, and after 20 days we observed mechanical and cold allodynia and spontaneous nociception behavior (mouse grimace scale detection, MGS). TRPA1 selective antagonist (HC-030031 or A-967079) administration or intrathecal administration of TRPA1 antisense (AS) oligonucleotide was performed. The activity of NADPH oxidase, superoxide dismutase (SOD) and hydrogen peroxide (H₂O₂) levels were evaluated. The chemical hyperalgesia produced by a TRPA1 agonist (allyl isothiocyanate, AITC) was also detected. The administration of TRPA1 antagonists, TRPA1 AS, or antioxidant, transiently attenuated MGS, or mechanical and cold allodynia. Intraplantar injection of AITC also caused nociception. NADPH oxidase or SOD activity and H₂O₂ levels were increased in the sciatic nerve and hind paw skin samples. The 4T1 cells did not express TRPA1, and the use of HC-030031 or α-lipoic acid did not reduce the cytotoxic effect of a chemotherapeutic drug (paclitaxel). Thus, TRPA1 could be investigated as a target for breast carcinoma pain treatment.

1. Introduction

Despite the current advances in therapy and efforts to reduce incidence and mortality, breast carcinoma is still a significant public health concern worldwide [1–3]. Pain is one of the most feared and troublesome symptoms among breast carcinoma patients [4,5]. Although cancer pain can occur at any time during the disease, it frequently increases with cancer progression, and prevalence of pain ranges from 75 % to 90 % in patients with metastatic or advanced-stage cancer [4]. The search for more effective treatments for breast

carcinoma, as well as for the treatment of pain due to the disease, emphasizes the importance of the morbidity of this pathology [6,7].

Despite the amount of information available on the treatment of cancer pain, a considerable proportion of cancer patients receive insufficient treatment [8]. Thus, unrelieved pain continues to be an essential concern [9]. At this time, opioids are the most effective analgesics available for the treatment of moderate to severe cancer pain. However, continuous opioid use can lead to several adverse effects, such as constipation and hyperalgesia [10,11]. Given that the analgesics used to treat cancer pain are ineffective and cause critical adverse

Abbreviations: ASICs, acid-sensing ion channels; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1; TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1; MGS, mouse grimace scale; PBS, phosphate buffer saline; AITC, allyl isothiocyanate; HRPO, Horseradish peroxidase; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; H₂O₂, hydrogen peroxide; SOD, superoxide dismutase; SRA, Sequence Read Archive; CDS, coding DNA sequence; AS, antisense; α-LA, α-lipoic acid; PAC, paclitaxel; i.pl, intraplantar; i.t., intrathecal; i.g., intragastric

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, building 21, room 5207, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: gabriela.trevisan-santos@ufsm.br (G. Trevisan).

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104576>

Received 10 July 2019; Received in revised form 25 November 2019; Accepted 26 November 2019

Available online 29 November 2019

1043-6618/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

effects, studies have been carried out to find innovative treatments [12].

The mechanisms associated with cancer pain are still uncertain, but the activation of several ion channels, including acid-sensing ion channels (ASICs) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), and TRP ankyrin 1 (TRPA1), have been described as involved in cancer pain induction [13]. It has also been reported that activation or sensitization of nociceptors by protons or oxidant compounds leads to hypersensitivity in cancer pain [14,15]. The TRPA1 is a non-selective cation channel co-expressed with TRPV1 in peptidergic sensory fibers [16,17]. This receptor can be activated by natural irritants (including allyl isothiocyanate found in mustard oil) and oxidant compounds produced in the site of tissue injury (4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide). Also, it can also be activated/sensitized by protons and inflammatory substances [18,19,70]. The role of TRPA1 has been investigated in neuropathic pain induced by several chemotherapeutic drugs, where it seems to be activated by oxidant compounds [20,21]. TRPA1 also appears to be essential to the maintenance of neuropathic pain induced by trauma or chemotherapeutic drugs [20–24]. Our research group recently showed that TRPA1 antagonism, or genetic deletion of the receptor, reduced the nociception observed in a model of metastatic melanoma in mice [13]. However, the involvement of TRPA1 in a model of breast carcinoma-induced nociception was not evaluated. It has also been reported that administration of 4T1 breast cancer cells to the mouse mammary gland leads to the development of bone metastasis, leading to mechanical and cold allodynia [25,26]. Thus, the current study was aimed at assessing the participation of the TRPA1 receptor in a model of breast carcinoma in mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female adult BALB/c mice (20–30 g) were used. They were kept at a controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) in a light/dark cycle of 12 h (h) (lights on 6:00 AM to 6 PM). Standard laboratory animal food (Puro Lab 22 PB pelleted form, Puro Trato, Rio Grande do Sul, Brazil) and water were provided freely. They were kept in individually ventilated cages (5 animals per cage) with wood shaving bedding and nesting material. This strain of mice was chosen because the 4T1 lineage tumor cells developed only in BALB/c mice. The animals were taken to the experiment room for adaptation for at least 1 h before each experiment. Each animal was used in just one test. The experiments were started after approval by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal de Santa Maria (protocol number 7536250417/2017) and by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocol number 042-2014-02). All experimental protocols followed the Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines [27]. The number of animals was the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of treatments and was calculated using the GPower program.

2.2. Drugs and reagents

Unless otherwise specified, all reagents were from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3. Induction of breast carcinoma pain

Experiments were conducted with 4T1 cells (ATCC® CRL2539™). The murine model of breast carcinoma was obtained through the inoculation of 4T1 cells in the right caudal fourth mammary fat pad [25,26,28]. Cells were cultured in monolayer using DMEM medium supplemented with 5 % fetal bovine serum and 1 % penicillin/streptomycin. For cancer induction, the cells were resuspended in phosphate

buffer (10^4 cells/ml), and then 50 μl of the cell suspension or vehicle (phosphate buffer) were injected into the right caudal mammary gland of the mouse. The tumor 4T1 cells were kindly provided by Dr. Adriana Bonomo (Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil) [25].

2.4. Nociceptive tests

2.4.1. Mechanical allodynia

To study mechanical sensitivity stimuli, tests were performed using von Frey filaments of increasing intensity (0.07–2 g) as previously described [29]. Briefly, the animals were set in the experimental site, consisting of elevated chambers with metal screen floor, for 1 h. After this period, the right hind paw stimulation of each animal with von Frey filaments was performed by the up-and-down method. The first filament promoted a pressure of 0.6 g. In case of withdrawal of the paw, a filament with a lower pressure was applied. If no withdrawal occurred, a filament with a higher pressure was used. In total, six stimulations were performed, using filaments of 0.07; 0.16; 0.40; 0.6; 1.0; 1.4 or 2.0. With the results obtained, the value corresponding to 50 % of the threshold, in grams, that each animal supports (threshold 50 %) was calculated. A reduction in this value was considered mechanical allodynia and reversal as an antinociceptive (anti-allodynic) effect.

2.4.2. Acetone test (cold allodynia)

Cold thermal allodynia was measured using the modified acetone drop method. After the animals were set, a drop of acetone (20 μL) was placed on the skin surface of the animal's paw. Then, behavioral responses to acetone drop were timed, as previously described [21].

2.4.3. Mouse grimace scale (MGS)

The MGS is a useful measure for assessing spontaneous pain in animals [30]. To evaluate the mouse grimace scale, the animals were placed in transparent acrylic boxes, and were filmed using a high-resolution digital camera positioned on the front and back of the box for 30 min (min). The animals were then evaluated before (baseline measurement) and 1 h after administration of treatment. Afterward, with the aid of a program (Rodent Face Finder®), different images were selected in which the face appears in an ideal position to evaluate the facial expression. In this way, the images were analyzed through predefined scores of 0–2, depending on the intensity of the pain (0 - without modification, 1 - moderate, and 2 - evident). We observed changes in the eyes and the periorbital region, ears, nose, and vibrissae of the animals [31].

2.5. Treatment protocols

2.5.1. TRPA1 selective antagonists

In the first part of the experiments, we evaluated the TRPA1 involvement in a cancer pain model using TRPA1 selective antagonists. Intragastric (i.g.) HC-030031 (300 mg $\text{kg}^{-1}/10\text{ mL}$), A-967079 (100 mg $\text{kg}^{-1}/10\text{ mL}$, i.g.), or their vehicle (DMSO 1 % in NaCl 0.9 %), were administered by intragastric gavage at day 20 after 4T1 cell or vehicle (PBS) inoculation. Mice were tested before (baseline), 20 days after cell or vehicle inoculation (time 0), or 1, 2, and 3 h after treatments. The dose of TRPA1 antagonists was selected based on previous studies [13,32].

2.5.2. TRPA1 antisense oligonucleotide

In the second set of experiments, TRPA1 involvement in a cancer pain model was evaluated using the TRPA1 antisense oligonucleotide administered via intrathecal injection (5 μL of volume). The animals received TRPA1 antisense oligonucleotide (AS; 5' TCTATGGGGTTATG TTGG 3'; 30 $\mu\text{g}/10\text{ mL}$) or its control (TRPA1 mismatch oligonucleotide - MM; 5' ACTACTACACTAGACTAC 3'; 30 $\mu\text{g}/10\text{ mL}$), three times a day for 3 consecutive days (days 17, 18, and 19, after cell inoculation). Mice were tested before (baseline) and 20 days after cell or vehicle

inoculation. The doses of antisense used are already standardized and capable of reducing mRNA for this receptor in mouse dorsal root ganglion (DRG) [33]. The antisense oligonucleotide was purchased from Síntese Biotecnologia in Brazil.

2.5.3. Assessment of the antinociceptive potential of an antioxidant compound

In a different protocol, α -lipoic acid (100 mg kg⁻¹/10 mL, i.g.), or its vehicle (DMSO 1 % in NaCl 0.9 %), was administered. Mice were tested before (baseline), 20 days after cell or vehicle inoculation (time 0), or 1, 2, and 3 h after treatment. The dose of α -lipoic acid was selected based on previous studies [13].

2.6. Evaluation of the development of chemical hyperalgesia induced by AITC

The mice received AITC (1 nmol/paw, 20 μ L) intraplantar (i.pl.) injection in the right hind paw. Spontaneous nociception (lick paw) induced by administration of AITC was recorded for 5 min as previously described [34]. We also evaluated the antinociceptive effect of HC-030031 i.g. administration in the chemical hyperalgesia induced by AITC. For this, HC-030031 (300 mg kg⁻¹) was injected 1 h before the intraplantar AITC injection.

2.7. Evaluation of the local effect of TRPA1 antagonist and an antioxidant compound

The antinociceptive effect of intraplantar injection of HC-030031 or α -lipoic acid was performed as previously described [21]. Twenty days after cell or vehicle inoculation (time 0) mice received intraplantar (i.pl.) injection of HC-030031 (100 μ g/paw), α -lipoic acid (10 μ g/paw) or vehicle (1 % DMSO in 0.9 NaCl) on the right (ipsilateral) or left (contralateral) hind paw 0.5 h after treatment, mechanical or cold allodynia was detected on the right hind paw.

2.8. Biochemical assays

2.8.1. Hydrogen peroxide (H₂O₂) production assay

The possible increase in the concentration of hydrogen peroxide was measured in the sciatic nerve and hind paw skin samples 20 days after injection of 4T1 cells. For this, samples were obtained from mice after euthanasia, via chemical method using thiopental 50 mg kg⁻¹/10 mL. The tissue samples were homogenized at 4 °C for 30 s, each with 3 mL of phosphate buffer (50 mM - pH 7.4) containing 5 mM sodium azide. The homogenate was centrifuged at 10,000 x g at 4 °C for 20 min. The H₂O₂ content was determined by the red phenol method using horseradish peroxidase (HRPO). 1.5 mL of the assay, 0.5 mL of the supernatant homogenate, and 0.5 mL phenol red (200 μ g/mL) and HRPO (100 μ g/mL) were added and incubated at 25 °C for 10 min. After incubation, 100 μ L of 1 M NaOH was added and the absorbance was determined spectrophotometrically at 610 nm. The results were expressed as millimole equivalents of H₂O₂ per mg of protein, based on a standard HRPO-mediated oxidation curve of phenol red by H₂O₂. The reaction was read in a microkinetic reader (Fisher Biotech BT, 2000), and protein content was measured using the Bradford method (1987) [13,35].

2.8.2. Evaluation of NADPH oxidase activity

NADPH oxidase activity was assessed in sciatic nerve and hind paw skin samples 20 days after inoculation of the cancer cells or in the control group using a commercially available assay kit (CY0100, cytochrome c reductase, NADPH Assay Kit, Sigma-Aldrich, Milan, Italy). The samples were homogenized in phosphate buffer (50 mM - pH 7.4) and centrifuged for 10 min at 3000 x g at 4 °C, and the supernatant was centrifuged for 40 min at 10,000 x g at 4 °C. The final supernatant was used to determine NADPH activity. Values of NADPH oxidase activity were described as U/mL/mg of protein [13].

2.8.3. Evaluation of superoxide dismutase (SOD) activity

For the evaluation of SOD activity, sciatic nerve and hind paw skin samples were observed 20 days after inoculation of cancer cells, or from the control group. They were homogenized in Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4, 100 mM sucrose, 10 mM EDTA and 46 mM KCl), and centrifuged at 2000 x g at 4 °C for 3 min. The sample (20 μ L) was then mixed with adrenaline (20 μ L, 60 mM) and glycine buffer (1000 mL, 50 mM, pH 11), incubated at 33 °C, and changes in absorbance were observed at 480 nm and monitored for 5 min. Values of SOD activity were described as U/mL/mg of protein [13].

2.9. Reverse transcription-quantitative real time PCR (RT-qPCR)

Total RNA from 4T1 cells or mouse dorsal root ganglion (DRG) mRNA measurement was isolated with Trizol (Life Technologies), based on the manufacturer's protocol and quantified using a Nanodrop ND-1000. cDNA was synthesized from 300 ng of RNA treated with DNase (RNase-free, Invitrogen) using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantification of specific products was done using Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and double-stranded products were amplified using specific primers for TRPA1 (forward 5'-GCAGGTGGAACCTTCATACCAACT-3', reverse 5'-CACITTTGGTAAGTACCAGAGTGG-3') in StepOne™ equipment (Applied Biosystems) with the following protocol: 10 min 95 °C, (15 s 95 °C, 1 min 60 °C)x40 cycles. A final step was included to obtain the dissociation curve (15 s 95 °C, 1 min 60 °C, 15 s 95 °C). Threshold cycles (Ct) calculated by StepOne Software v2.3 were normalized to the expression of the gene and calculated by normalization with the Hprt (forward 5'-GCAGACTTTGCTTTCCTGG-3', reverse 5'-TACTGGCCACATCAACAGGA-3') and β actin (forward 5'-CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG-3', reverse 5'-TGCTGGAAGGTGGACAGT GAGG-3'). Relative amounts were calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method [71]. Primer specificity in all samples was confirmed by single peak performances of PCR products in melt curve analysis.

2.10. Sequence read archive (SRA) experiment analysis

In order to search TRPA1 transcripts in deep-sequencing 4T1 cells grown *in vitro*, we took advantage of three Sequence Read Archives (SRAs) available at the NCBI platform. Bioproject PRJEB5797 contains the transcriptomes of 4T1 cells. Briefly, total RNAs from 4T1 cells were extracted in triplicate, and barcoded mRNA-seq cDNA libraries were prepared in triplicate and deep-sequenced using the Illumina HiSeq 2000 platform. The transcriptome reads were downloaded using the SRA Toolkit and individually mapped against the entire coding DNA sequence (CDS) of *trpa1* (NM_001348288) and as internal control *gapdh* (NM_001289726) of mice. We planned the reads using the program Geneious R9.0 [36] and a pairwise identity of 99 %.

2.11. Cell viability measurement by 3(4-5-dimethyl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) salt reduction assay

Experiments were conducted in 4T1 cells (ATCC® CRL2539™). The possible cytotoxic effect of HC-030031, α -lipoic acid, and paclitaxel was evaluated through cell viability assay by MTT. Briefly, the 4T1 cells were seeded into 96-well plates (density of 5 x 10⁴/mL) at a volume of 200 μ L/well and cultured for 24 h to allow them to adhere to the plates. After, the cells receiving vehicle, vehicle plus DMSO 0.05 %, HC-030031 (100, 30, 10, 3 or 1 μ M), α -lipoic acid (100, 30, 10, 3 or 1 μ M), or paclitaxel (100, 30, 10, 3 or 1 μ M) were incubated for 24 h. MTT (20 μ L, 5 mg/mL) was added to each well on the day of the test, and culture was sustained for 4 h at 37 °C incubator with 5 % CO₂. The supernatant was then discarded, and the residue was washed with PBS. Then, 150 μ L DMSO was added, and the cells were incubated for 10 min to dissolve the formazan crystals. The plate was then read on a microplate reader (SpectraMAX i3, Molecular Devices Sunnyvale, CA) at

492 nm. The experiments were repeated in triplicate. The results were expressed as the viability percentage when compared to control [37,38]. After this, the HC-030031 (100 μM) or α -lipoic acid (100 μM) were associated with paclitaxel (100 μM), to observe if the HC-030031 or α -lipoic acid interfered with the paclitaxel chemotherapeutic action.

2.12. Statistical analysis

All values were expressed as mean \pm S.E.M and analyzed by Student's *t*-test, One-way or Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test when appropriate. All experiments were carried out using GraphPad 5.0 Software (San Diego, CA, USA). The $P < 0.05$ values denote significant differences among groups. The operator of the experiment and the data analysis were blinded. Data and statistical analysis are in accordance with recommendations on experimental design and analysis in pharmacology.

3. Results

3.1. Antinociceptive effect of TRPA1 antagonists in a murine model of breast carcinoma

The intragastric administration of TRPA1 receptor antagonists, HC-030031 (300 mg kg^{-1}) or A-967079 (100 mg kg^{-1}), showed an anti-allodynic effect in a model of breast carcinoma in mice. HC-030031 and A-967079 compounds presented mechanical and cold anti-allodynic effects at 1 and 2 h after its administration (Fig. 1A–D). Moreover, treatment with TRPA1 receptor antagonists decreased MGS in this model of cancer pain at 1 h after its administration (Fig. 1E and F).

3.2. Antinociceptive effect of a TRPA1 receptor antisense oligonucleotide injection in a murine model of breast carcinoma

TRPA1 AS oligonucleotide intrathecal administration induced an anti-allodynic effect for mechanical and cold allodynia, and also reduced MGS score (Fig. 2). TRPA1 MM oligonucleotide administration did not alter mechanical threshold, nociceptive response caused by acetone test, or MGS (Fig. 2).

3.3. The injection of 4T1 cells in the mammary gland in mice induced the production of TRPA1 agonists in sciatic nerve and paw skin

Tumor cell inoculation increased the H_2O_2 concentration (Fig. 3A and B), NADPH oxidase (Fig. 3D and E), and SOD activity (Fig. 3G and H) in both sciatic nerve and hind paw skin, and increased NADPH oxidase (Fig. 3F) when compared to the control group.

3.4. The antioxidant α -lipoic acid caused an antinociceptive effect in a model of breast carcinoma in mice

The intragastric administration of an antioxidant, α -lipoic acid (100 mg kg^{-1}), induced an anti-allodynic effect in a model of breast carcinoma in mice (Fig. 4A and B). α -lipoic acid presented a reduction in mechanical threshold 1 h after its administration, and this decrease was sustained for nociception time until 2 h after the antioxidant administration (Fig. 4A and B). Also, the antioxidant administration in animals that received only vehicle (PBS) paw injection did not alter mechanical threshold nor cold nociception measurements (Fig. 4). Moreover, treatment with α -lipoic acid decreased MGS in this model of cancer pain at 1 h after its administration (Fig. 4C).

3.5. Intraplantar injection of HC-030031 or α -lipoic acid induced anti-allodynic effect and TRPA1 agonist (AITC) i.pl. injection caused chemical hyperalgesia in a murine model of breast carcinoma

The intraplantar injection of a TRPA1 antagonist or an antioxidant

compound induced an antinociceptive effect in a model of breast carcinoma in mice (Fig. 5A and B). The antinociceptive effect of these compounds were local given that when HC-030031 or α -lipoic acid were injected in the contralateral paw, there was no antinociceptive activity in the measured hind paw (right side).

Moreover, intraplantar administration of the TRPA1 agonist (AITC, 1 nmol/paw) causes chemical hyperalgesia in a metastatic cancer pain model in mice (Fig. 5A). In mice treated 1 h before with the TRPA1 antagonist HC-030031 (300 mg kg^{-1}), the spontaneous nociception behavior induced by chemical hyperalgesia was reduced (Fig. 5C).

3.6. HC-030031 and α -lipoic acid did not reduce the paclitaxel cytotoxic effect on 4T1 cells in vitro

The toxicity development of HC-030031 and α -lipoic acid was assessed *in vitro* using the 4T1 cell line through MTT assay, which revealed that HC-030031 and α -lipoic acid did not alter cell viability, regardless of the concentrations tested in comparison with the control group (Fig. 6A and B). On the contrary, 4T1 incubation with paclitaxel (PAC) showed a reduction in cell viability (30 and 100 μM), after 24 h of incubation when compared to control samples (Fig. 6C).

In the second set of experiments, the association of HC-030031 and α -lipoic acid with paclitaxel to cell viability was evaluated, to observe whether HC-030031 and α -lipoic acid interfered with the PAC chemotherapeutic effect. MTT assay showed that HC-030031 at the highest concentrations (100 μM), when associated with PAC highest concentration (100 μM); able to decrease cell viability, as described above) did not interfere with the chemotherapeutic action related to cell viability, but α -lipoic acid reduced PAC induced toxicity (Fig. 6D).

3.7. Reverse transcription PCR (RT-qPCR) and Sequence Read Archive (SRA) experiments showed no TRPA1 expression in the 4T1 cells

The 4T1 cells were examined for TRPA1 mRNA levels, to confirm the absence of TRPA1 receptors. There was no amplification for the 4T1 cell samples assessed by qRT-PCR, confirming the lack of TRPA1 expression in these cells, but we observed the TRPA1 mRNA presence in DRG samples (Fig. 6E). The qRT-PCR results were established through a second approach using the 4T1 cell RNA deep-sequencing in triplicate. We found no reads mapped against the *trpa1* CDS for three independent transcriptome experiments. As an internal control, we used the *gapdh* gene, which presented more than 10,000 reads with 100 nt in size. A1 is not expressed in 4T1 cells grown *in vitro*.

4. Discussion

Breast carcinoma is a type of tumor that is highly capable of developing chronic pain [39]. Cancer pain is usually difficult to manage in the clinical setting, and several studies have been carried out to explore new mechanisms involved in this type of hypersensitivity, considering that unalleviated cancer pain expressively decreases the quality of life of patients [40]. Opioids are still the leading therapy used to reduce moderate to severe cancer pain [1,10]. Unfortunately, these medicines induce several adverse effects [41,42]. The TRPA1 channel has been reported to be involved in neuropathic pain induction and maintenance, especially neuropathic pain caused by chemotherapy, such as oxaliplatin, paclitaxel and bortezomib [20,21,23]. Consequently, if TRPA1 activation is also involved in cancer pain, treatment with TRPA1 antagonists could be used to manage cancer pain and chemotherapeutic-induced neuropathic pain, which are usually present in cancer patients [8,43]. In a recent study, we reported that TRPA1 is also involved in cancer pain in a model of metastatic melanoma in mice [13]. Our study was based on previous studies [25,26], which showed that, a few days after inoculation with 4T1 strain breast cancer cells in the mouse mammary gland, bone metastases develop. In addition, it has previously been shown [26] that the model of 4T1 cell inoculation in

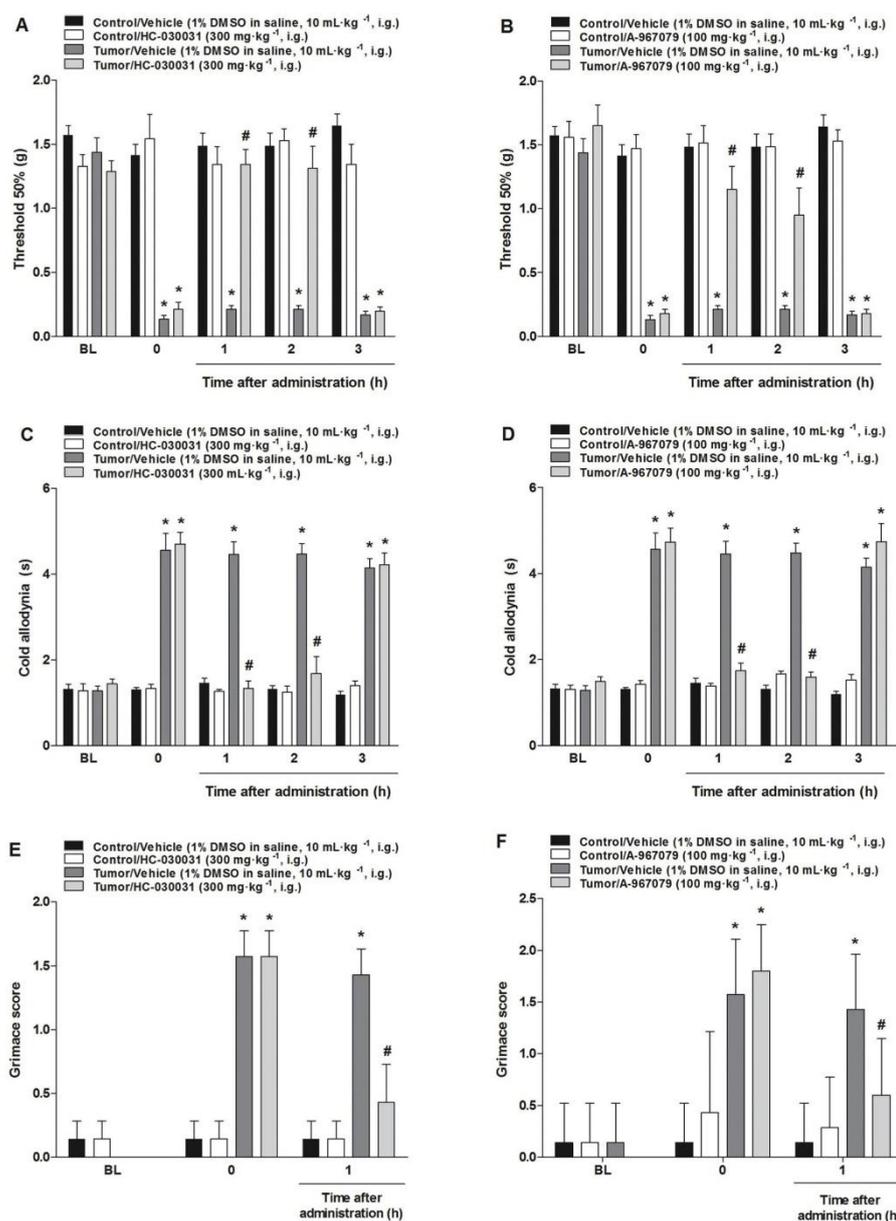


Fig. 1. TRPA1 selective antagonist intragastric administration reduced mechanical and cold allodynia or diminished the mouse grimace scale (MGS) in a murine model of breast carcinoma. (A, B) Mechanical and (C, D) cold allodynia, or (E, F) MGS alteration detected 20 days after tumor cells inoculation or vehicle (control group). Intragastric treatment with HC-030031 (300 mg kg⁻¹) or A-967079 (100 mg kg⁻¹) was evaluated on a time curve of 1, 2 and 3 h to the mechanical threshold and cold allodynia and during 1 h to MGS at day 20. Data are expressed as mean + S.E.M. (n = 7). **P* < 0.05, when compared to the control group or baseline values and #*P* < 0.05 when compared to tumor/vehicle group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test).

the mouse mammary gland, besides presenting bone metastases, causes the development of nociception observed as mechanical and cold allodynia. In this study we only measured the mechanical and cold allodynia in the right hind paw, but before when we characterize the model [26] we also detected the development of mechanical and cold

allodynia in the left hind paw (data not show). In this model we observe that the onset of nociception occurs days after tumor cell inoculation, which is consistent with the onset of bone metastasis [25,26]. Metastatic cells travel to the bone, which is a favorable site for the development of metastases through the bloodstream, thereby inducing the

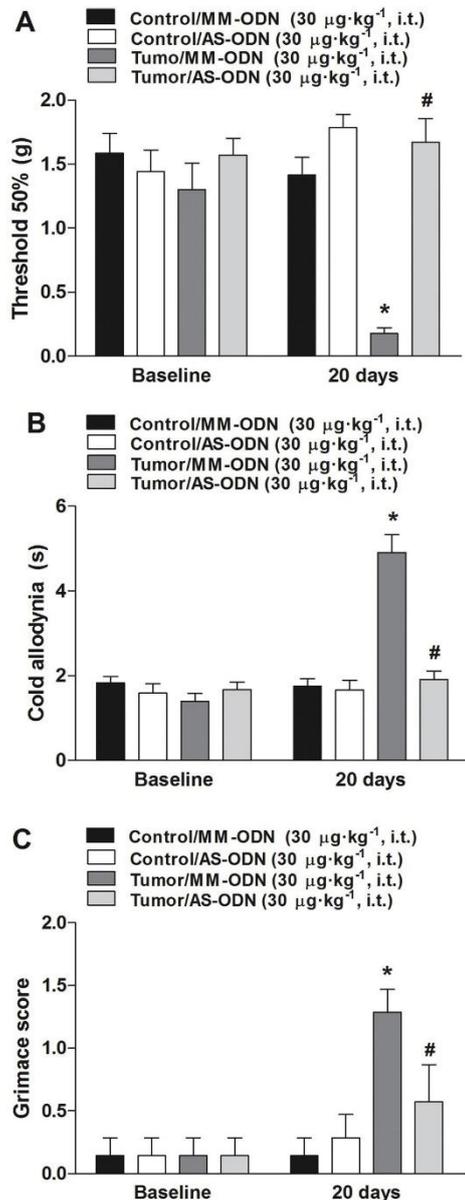


Fig. 2. TRPA1 antisense (AS) intrathecal oligonucleotide administration reduced nociception observed in a murine model of breast carcinoma. The AS antinociceptive effect was evaluated on (A) mechanical or (B) cold thermal stimulus and in (C) mouse grimace scales (MGS). The administration of mismatch (MM) oligonucleotide did not induce the antinociceptive effect. The nociceptive tests were performed 20 days after 4T1 cell inoculation. Baseline measures are graphically represented, and time 0 represents measures performed 20 days after tumor cell inoculation or PBS in mice. Data are expressed as mean + S.E.M. (n = 8). * $P < 0.05$, when compared to PBS + MM-treated group; # $P < 0.05$, when compared to tumor + MM-treated group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test).

production of inflammatory substances, which can activate receptors, thus leading to the onset of nociception. In addition, the tumor may compress or grow within a sensory nerve, leading to neuropathic pain [44,45]. It is important to note that the 4T1 cells used in the breast carcinoma model have already demonstrated high metastasis potential to bone and other tissues [25,26,46,47]. Thus, we could also relate the development of nociception with bone metastasis process caused by 4T1 cells inoculated in the mammary gland of mice.

We therefore explored the TRPA1 role in nociception observed in a murine model of breast carcinoma, using pharmacological and genetic tools. Our data showed that TRPA1 is involved in mechanical and cold hypersensitivity, and facial grimace criteria induced by tumor injection in mice. These findings were confirmed using TRPA1 antagonist (HC-030031 and A-967079) intragastric administration or by TRPA1 antisense oligonucleotide intrathecal injection. An increase in the production of H_2O_2 (a TRPA1 agonist), which could maintain TRPA1 activation/sensitization, was also found in this model. An antioxidant compound (α -lipoic acid) showed antinociceptive effect and reduced MGS in the current model, reinforcing the involvement of reactive substances in the maintenance of TRPA1 activation. Finally, all these findings indicate that TRPA1 participates in the development of breast cancer pain.

In the present study, we observed the presence of mechanical and cold allodynia 20 days after tumor cell injection, as well as an increase in MGS. These are interesting results, considering that spontaneous pain is often present in cancer patients [48], and spontaneous pain-related behaviors need to be better evaluated in preclinical pain studies [49]. The model used here could therefore be considered for the investigation of reflexive (using the von Frey test and acetone test) and non-reflexive (MGS) nociception measures in mice [26]. Moreover, we detected that i.g. administration of TRPA1 antagonists (HC-030031 and A-967079) reduced mechanical and cold hypersensitivity and reduced MGS in the mice. These antagonists were injected in commonly used doses to test the TRPA1 role in pain models in mice [20,21,32]. It has recently been described that TRPA1 plays an important role in the presence of pain in a metastatic melanoma model [13]. The TRPA1 participation in models of chemotherapeutic-induced neuropathic pain was also previously observed, which is a typical type of pain detected in patients with cancer [20,21,23,24]. Moreover, TRPA1 has been investigated to induce trigeminal and peripheral neuropathic pain after nerve injury [6,7,22,32], inflammatory pain [6,7,21], and migraine [50]. Thus, TRPA1 antagonists are described as potential analgesics to control chronic pain [50].

The results obtained using TRPA1 antagonists were confirmed using the TRPA1 antisense (AS) oligonucleotide intrathecal injection. TRPA1 AS injection abolished cancer pain-induced nociception and spontaneous pain-related behavior. These data are in line with those for the model of cancer pain caused by the intraplantar injection of melanoma cells [13]. Considering the data obtained by TRPA1 antagonist administration and TRPA1 antisense oligonucleotide injection, it seems that TRPA1 activation is relevant to nociception in this metastatic cancer pain model. The development of tolerance is an important adverse effect of opioid agonists. It would be interesting to evaluate this effect for TRPA1 antagonists in a model of cancer pain, given that opioids are the standard therapy for treating cancer pain. Previously, Wei et al. [69] showed that the tolerance induced by morphine administration was attenuated by a TRPA1 antagonist. Future studies should be conducted to determine whether repeated administration of TRPA1 antagonists develop tolerance, and a further study if TRPA1 blockage could hamper opioid-induced tolerance in a model of cancer pain.

TRPA1 is a known sensor for reactive compounds, such as acrolein [19], H_2O_2 [70] and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) [18]. Thus, the TRPA1 channel could be activated or sensitized in this cancer pain model by an endogenous agonist, such as H_2O_2 . It is well known that H_2O_2 is able to gate the TRPA1 channel [51], and its production has

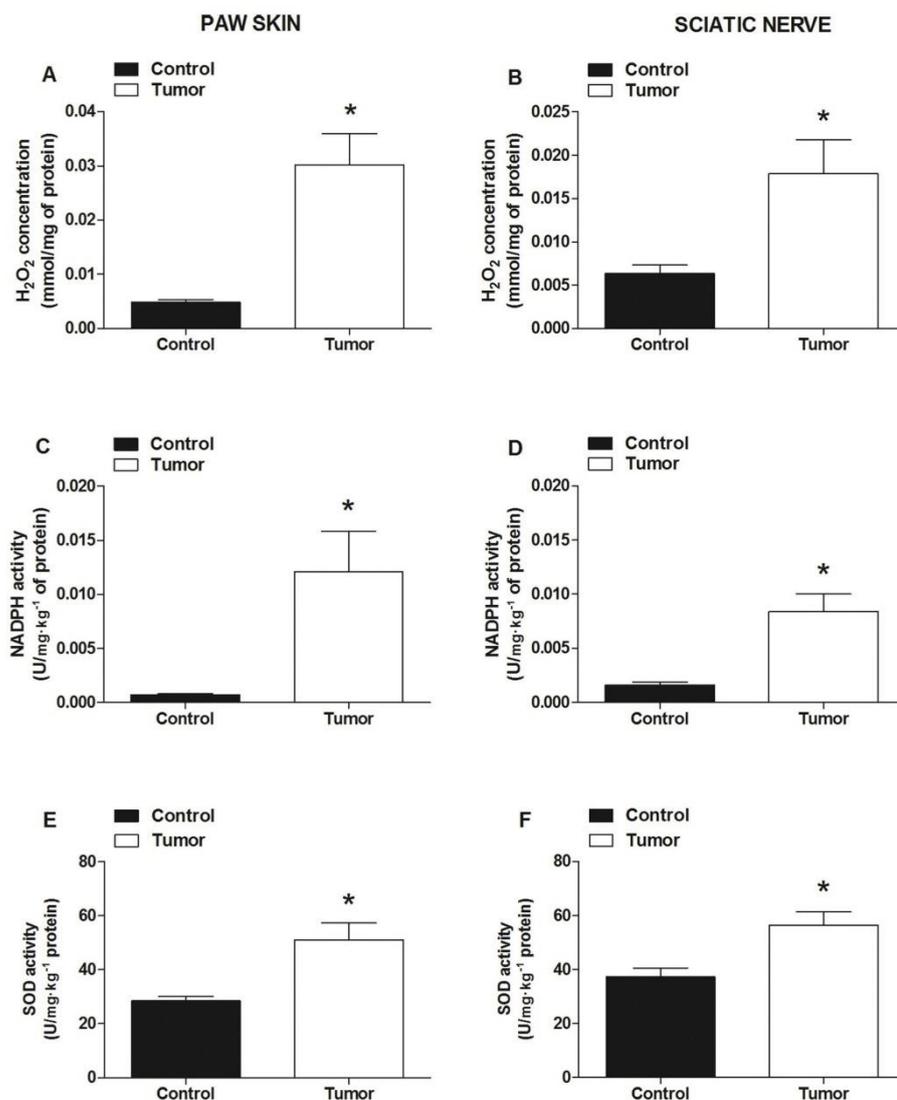


Fig. 3. Administration of 4T1 tumor cells induced an increase in oxidative compound production and enzymatic activity in a murine model of breast carcinoma. The oxidative status of cancer pain development was assessed through (A and B) H₂O₂ concentration, (C and D) NADPH oxidase and SOD (E and F) activity, in mouse sciatic nerve or skin paw tissues. The measurements were performed 20 days after 4T1 cell injection. Control group mice were injected with vehicle (PBS). Data are expressed as mean ± S.E.M. (n = 7). *P < 0.05, when compared to control (PBS) group (Student's *t*-test).

been associated with TRPA1 activation in neuropathic and inflammatory models of pain [22,32,52]. H₂O₂ levels were increased in mice 20 days after tumor inoculation, and NADPH oxidase and SOD activities were also augmented, a factor that could cause H₂O₂ increased production. It has been reported that reactive oxygen species could be involved in cancer pain development, but a potential receptor that could be gated by reactive compounds involved in cancer pain has not yet been reported [15]. It has been reported that administration of Walker 256 cells (rat mammary gland carcinoma cells) into the intratibial space in rats increases the levels of reactive oxygen species, such as H₂O₂, suggesting that ROS plays a role in cancer metastatic pain

development [53]. The levels of 4-HNE have not been evaluated in a cancer pain model, but this mediator is relevant for the maintenance of TRPA1 activation in several models of pain [54]. Further supporting our findings, increasing levels of NADPH oxidase have already been shown in a murine breast tumor model [55]. Also, after the injection of B16-F10 cells into the hind paw [13], there was an increase in H₂O₂ production and NADPH oxidase activity in the paw skin.

The participation of reactive substances in this model was also detected using α -lipoic acid i.g. administration, which showed an antinociceptive effect and decreased spontaneous pain-like behavior in this metastatic cancer pain model. It was previously demonstrated that α -

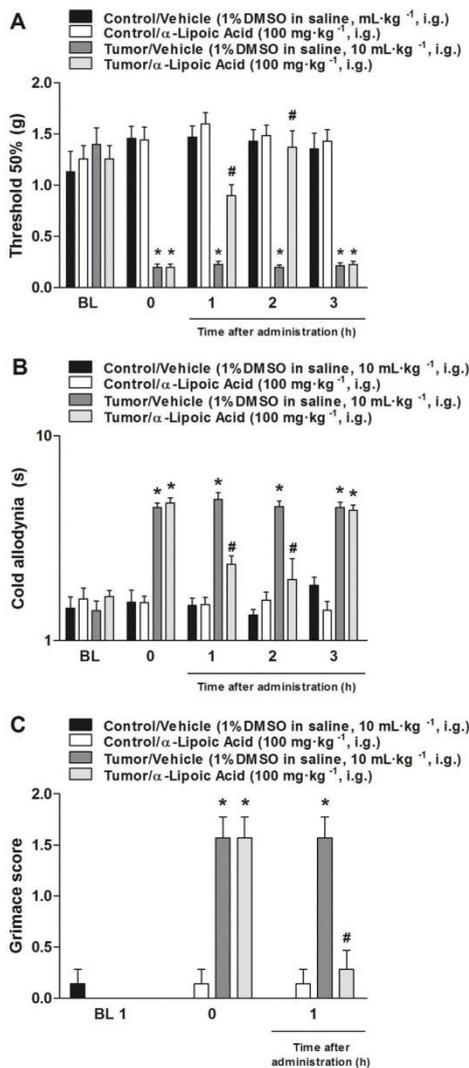


Fig. 4. Antioxidant α -lipoic acid administration reduced mechanical and cold allodynia; this treatment also decreased the mouse grimace scale (MGS) in a murine model of breast carcinoma. The α -lipoic acid (100 mg kg⁻¹) effect was measured on (A) mechanical threshold, (B) cold allodynia, evaluated from 1 to 3 h after intragastric (i.g.) administration, and (C) for 1 h to MGS. The nociceptive tests were performed 20 days after 4T1 cell injection. Baseline measures are graphically represented, and time 0 represents measures performed 20 days after tumor cell inoculation or PBS injection in mice. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 7). **P* < 0.05, when compared to the vehicle+PBS-treated group; #*P* < 0.05, when compared to the tumor + PBS-treated group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test).

lipoic acid acute injection induced an antinociceptive effect in models of chemotherapeutic-induced neuropathic pain and neuropathic pain induced by nerve injury [21,22,32], revealing the role of reactive compounds in neuropathic pain. It has also been reported that treatment with HC-030031 and α -lipoic acid with local application decreased the nociception parameters in a persistent sensory neuropathy

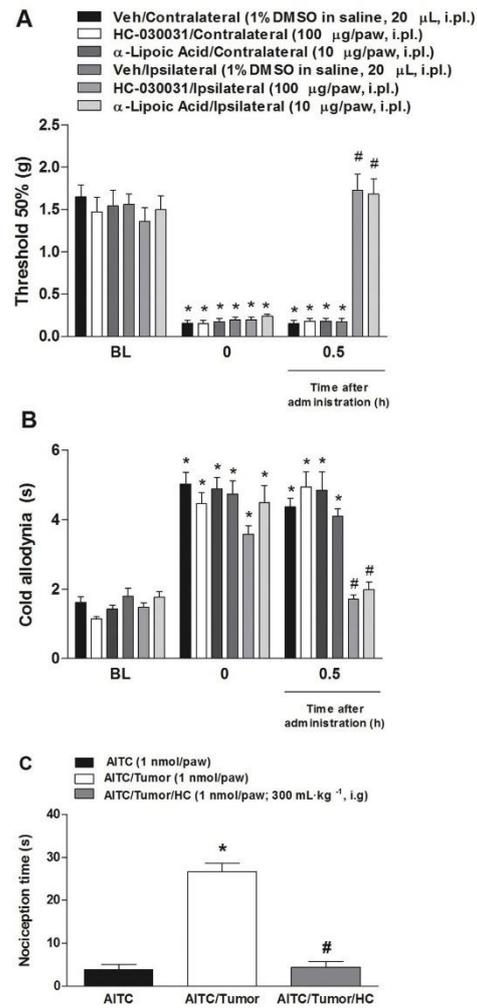


Fig. 5. Local administration of α -lipoic acid and local administration of HC-030031 transiently reverse mechanical and cold hypersensitivity, and TRPA1 agonist administration (AITC) caused chemical hyperalgesia in a model of breast carcinoma in mice. HC-030031 (100 μ g/paw) or α -Lipoic acid (10 μ g/paw) reduce the (A) mechanical and (B) cold allodynia induced by injection of 4T1 cells after 20 days in the paw ipsilateral (ipsi) to the injection. Values are mean \pm S.E.M. of (n = 7). **P* < 0.05. (C) The AITC (1 nmol) was administered in the hind paw of mice and the nociception time was 5 min. Treatment with HC-030031 (300 mg kg⁻¹, i.g.) was 1 h before AITC injection. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 7). **P* < 0.001, when compared to AITC+tumor group; #*P* < 0.001, when compared to AITC + tumor+HC group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test in graph A and B; One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test in graph C).

induced by a chemotherapy model in mice [21]. Here, we observed that local treatment with the TRPA1 antagonist and the antioxidant produces analgesia in a breast cancer pain model. The α -lipoic acid analgesic effect was previously described in patients, showing that this antioxidant has therapeutic capabilities for the treatment of pain-related disorders [56,57].

In a final set of experiments, we checked whether a TRPA1

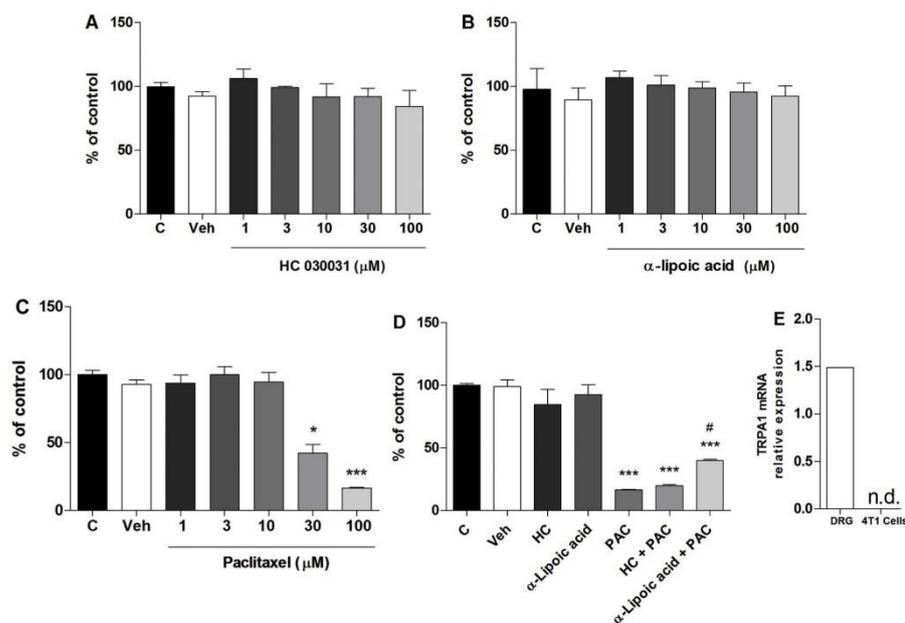


Fig. 6. 4T1 cell viability assessed *in vitro* by MTT assay and Reverse transcription PCR (RT-qPCR) for TRPA1 mRNA in DRG and 4T1 cells. (A) HC-030031 (1–100 μM), (B) α-lipoic acid (1–100 μM), (C) paclitaxel (PAC, 1–100 μM). (D) HC-030031 (100 μM), α-lipoic acid (100 μM) associated with PAC (100 μM). (E) Control samples denote only DMEM culture medium. Control plus DMSO samples indicate DMEM culture medium plus DMSO 1%. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, when compared to control samples (One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). # $P < 0.05$ when compared PAC to α-lipoic acid + PAC (One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test in graph A, B, C and D; Student's *t*-test in graph E).

antagonist or an antioxidant could reduce paclitaxel toxicity in 4T1 cells using the MTT assay. It was not tested before and is an interesting issue regarding paclitaxel is usually used to treat breast cancer [58,59]. It was found that HC-030031 did not alter paclitaxel chemotherapeutic effect, but α-lipoic acid altered its activity. Cell viability experiments testing drugs used in cancer treatment associated with other compounds have already been used in other studies [60,61]. These tests assist in research that seeks the possible synergism between substances already used and also to assess whether one substance interferes with the effect of another [60,61]. Some studies show the action of substances with analgesic effects without interfering in the chemotherapeutic action when using the cell viability test [62–64]. Duloxetine has been reported to improve painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice without interfering with the effect of oxaliplatin and paclitaxel [64]. In addition, another study demonstrated that the use of fingolimod, used for the multiple sclerosis treatment, when used for the treatment of paclitaxel-induced peripheral neuropathy, has analgesic effect without altering the chemotherapeutic action in rats [62]. Still, it has been reported that cannabidiol also decreases the pain caused by paclitaxel in mice without modifying the action of this chemotherapeutic agent [63]. However, in our study, the association between α-lipoic acid and paclitaxel altered the chemotherapy action on the cell viability of breast cancer cells. This may be related to the fact that some antioxidant agents inhibit the formation of tumor cell free radicals and also inhibit the apoptosis of these cells, thus decreasing the sensitivity to chemotherapy [65]. However, it has been reported that the α-lipoic acid action *in vivo*, in rats, does not alter the action of paclitaxel [66]. Neither HC-030031 nor α-lipoic acid incubation alone altered cell viability. Moreover, 4T1 cells did not express the TRPA1 receptor, similar to that observed for B16-F10 cells [13].

Breast carcinoma affects women worldwide and is responsible for the onset of pain that can be persistent and intense, decreasing the

patient's quality of life. Currently, the best analgesic treatment is the use of opioids. However, these drugs cause numerous adverse effects [1,10,12,67]. Therefore, new strategies for the management of breast cancer pain should be sought out. We observed a high contribution of TRPA1 in the development of breast cancer pain, both in mechanical and cold allodynia and in spontaneous pain, which are the most problematic conditions of cancer pain [68]. The blockade of TRPA1 by its antagonists shows the importance of new therapeutic strategies for the improvement of breast cancer pain.

Financial support

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process #422376/2016-7).

Compliance with ethical standards

The experiments of this manuscript comply with the current laws of the country in which they were performed.

Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Author contributions

All the authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved the final version. (1) Substantial contributions to conception and design, data acquisition, analysis, and interpretation: Amanda Spring de Almeida, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá,

Alessandra Marcone Milioli, Gabriele Cheiran Pereira, Caren Tatiane Antoniazzi, Débora Denardin Lückemeyer, Sabrina Qader Kudsi, Daniel Mendes Pereira Ardisson Araújo, Sara Marchesan Oliveira, Juliano Ferreira, Gabriela Trevisan. (2) Drafting and critically revising the article for important intellectual content: Amanda Spring de Almeida, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Alessandra Marcone Milioli, Gabriele Cheiran Pereira, Caren Tatiane Antoniazzi, Débora Denardin Lückemeyer, Daniel Mendes Pereira Ardisson Araújo, Sara Marchesan Oliveira, Juliano Ferreira, Gabriela Trevisan. (3) Final article approval: Amanda Spring de Almeida, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Alessandra Marcone Milioli, Gabriele Cheiran Pereira, Caren Tatiane Antoniazzi, Débora Denardin Lückemeyer, Sabrina Qader Kudsi, Daniel Mendes Pereira Ardisson Araújo, Sara Marchesan Oliveira, Juliano Ferreira, Gabriela Trevisan. (4) Acquisition of funding and general supervision of the research group: Daniel Mendes Pereira Ardisson Araújo, Sara Marchesan Oliveira, Juliano Ferreira, Gabriela Trevisan.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are acknowledged. Amanda Spring de Almeida is the recipient of a Ph.D. fellowship from CAPES [process #1687637]. Gabriela Trevisan is the recipient of an award from CNPq [process #306576/2017-1].

References

- [1] X. Zhu, C. Ge, Y. Yu, P. Wang, Advances in cancer pain from bone metastasis, *Drug Des.* (2015) 4239–4245.
- [2] P.A. Shenoy, A. Kuo, J. Vetter, M.T. Smith, The walker 256 breast cancer cell-induced bone pain model in rats, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 1–13.
- [3] A.R. Sarabia-estrada, A. Ruiz-valls, H. Guerrero, A.M. Ampuero, I. Jimenez-estrada, S. De Silva, et al., Metastatic human breast cancer to the spine produces mechanical hyperalgesia and gait deficits in rodents, *Spine J.* 17 (2017) 1325–1334.
- [4] M.H.J. Van den Beuken-van Everdingen, J.M. de Rijke, A.G. Kessels, H.C. Schouten, M. van Kleef, J. Patijn, Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years, *Ann. Oncol.* (2007).
- [5] J.A. Paice, B. Ferrell, The management of cancer, *Pain* 61 (2011) 157–182.
- [6] S. Pereira, F. Fontes, T. Sonin, T. Dias, M. Fragojo, J. Castro-lobos, et al., Neuropathic Pain After Breast Cancer Treatment: Characterization and Risk Factors, *J. Pain Symptom Manage.* 54 (2017) 877–888.
- [7] I.C.P. Pereira, S.J.F. Mendes, D.M.S. Pereira, T.F. Muniz, V.L. Colares, A.R.A. Monteiro, M.M.R.S. Martins, M.A.G. Grisotto, V. Monteiro-Neto, S.G. Monteiro, J.B. Calixto, S.D. Brain, E.S. Fernandes, Transient receptor potential ankyrin 1 channel expression on peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritic patients and correlation with pain and disability, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 53.
- [8] R.K. Portenoy, P. Care, B. Israel, Pain 3 treatment of cancer pain, *Lancet* 377 (2011) 2236–2247.
- [9] A. Romem, S.E. Tom, M. Beauchene, L. Babington, S.M. Scharf, A. Romem, Pain management at the end of life: a comparative study of cancer, dementia, and chronic obstructive pulmonary disease patients, *Palliat. Med.* 29 (2015) 464–469.
- [10] G.E. Plante, T.B. Vanitallie, Opioids for cancer pain: the challenge of optimizing treatment, *Metabolism* 59 (Suppl 1) (2010) S47–S52.
- [11] E. Olofson, A pragmatic utility function to describe the risk-benefit composite of opioid and non-opioid analgesic medication, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2018) 1–22.
- [12] K.D. Candido, T.M. Kusper, N.N. Knezevic, *New Cancer Pain Treatment Options*, (2017).
- [13] C.T.D.D. Antoniazzi, R. Nassini, F.K. Rigo, A.M. Milioli, F. Bellinaso, C. Camponogara, et al., Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain, *Int. J. Cancer* 1 (144) (2019) 355–365.
- [14] L.M. Slosky, N.M. BassiriRad, A.M. Symons, M. Thompson, T. Doyle, B.L. Forte, et al., The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ drives breast tumor cell glutamate release and cancer-induced bone pain, *Pain* 157 (2016) 2605–2616.
- [15] S.Z. Zhou, Y. Lan, Z. Feng, J. Hao, L. Li, H. Lv, et al., Analgesic effect of methane rich saline in a rat model of chronic inflammatory pain, *Neurochem. Res.* 0 (2018) 0.
- [16] J.D. Levine, N. Alessandri-haber, TRP channels: targets for the relief of pain, *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* 1772 (2007) 989–1003.
- [17] P. Geppetti, R. Nassini, S. Materazzi, S. Benemei, The Concept of Neurogenic Inflammation, (2008), pp. 2–6.
- [18] M. Trevisani, J. Siemens, S. Materazzi, D.M. Bautista, R. Nassini, B. Campi, N. Imamachi, E. Andre, R. Patacchini, G.S. Cottrell, R. Gatti, A.I. Basbaum, N.W. Bunnett, D. Julius, P. Geppetti, 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 13519–13524.
- [19] D.M. Bautista, M. Pellegrino, M. Tsunozaki, TRPA1: a gatekeeper for inflammation, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 181–200.
- [20] R. Nassini, M. Gees, S. Harrison, G. De Siena, S. Materazzi, N. Moretto, et al., Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation, *Pain* 152 (2011) 1621–1631.
- [21] G. Trevisan, S. Materazzi, C. Fusi, A. Altomare, G. Aldini, M. Lodovici, et al., Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade, *Cancer Res.* 73 (2013) 3120–3132.
- [22] F. de Logu, R. Nassini, S. Materazzi, M.C. Gonçalves, D. Nosi, D. Rossi, et al., Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice, *Nat. Commun.* (2017) 1–16.
- [23] S. Materazzi, C. Fusi, S. Benemei, P. Pedretti, R. Patacchini, B. Nilius, TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism, *Pflügers Archiv-Eur. J. Physiol.* (2012) 561–569.
- [24] C. Fusi, S. Materazzi, S. Benemei, E. Coppi, G. Trevisan, I.M. Marone, et al., Steroidal and non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–14.
- [25] A.C. Monteiro, A.C. Leal, T. Gonçalves-Silva, A.C.T. Mercadante, F. Kestelman, S.B. Chaves, et al., T cells induce pre-metastatic osteolytic disease and help bone metastases establishment in a mouse model of metastatic breast cancer, *PLoS One* 8 (2013) 1–13.
- [26] A.S. de Almeida, F.K. Rigo, S.D.T. De Prá, A.M. Milioli, D.P. Dalenogare, G.C. Pereira, et al., Characterization of cancer-induced nociception in a murine model of breast carcinoma, *Cell. Mol. Neurobiol.* 0 (2019) 0.
- [27] J.C. McGrath, E. Lilley, Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP, Br. J. Pharmacol.* (2015) 3189–3193.
- [28] M. Lelekakis, J.M. Moseley, T.J. Martin, D. Hards, E. Williams, P. Ho, et al., A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone, *Clin. Exp. Metastasis* 17 (1999) 163–170.
- [29] G. Trevisan, M.F. Rossato, C.I.B. Walker, J.Z. Klafke, F. Rosa, S.M. Oliveira, et al., Identification of the plant steroid-Spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (2012) 258–269.
- [30] D.J. Langford, A.L. Bailey, M.L. Chanda, S.E. Clarke, T.E. Drummond, S. Echols, et al., Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse, *Nat. Methods* 7 (2010) 447–449.
- [31] L.C. Matsumiya, R.E. Sorge, S.G. Sotocinal, J.M. Tabaka, J.S. Wieskopf, A. Zaloum, et al., Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51 (2012) 42–49.
- [32] G. Trevisan, Á.S. Benemei, Á.S. Materazzi, Á.F. De Logu, G. De Siena, C. Fusi, et al., TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress, *Brain* (2016) 1–17.
- [33] I. Brusco, S.L. Puma, K.B. Chiepe, E.S. Brum, C.T.D. Antoniazzi, A.S. de Almeida, C. Camponogara, C.R. Silva, F. de Logu, V.M. de Andrade, J. Ferreira, P. Geppetti, R. Nassini, S.M. Oliveira, G. Trevisan, Dacarbazine alone or associated with melanoma-bearing cancer pain model induces painful hypersensitivity by TRPA1 activation in mice, *Int. J. Cancer* 00 (2019) 00–00.
- [34] G. Trevisan, C. Hoffmeister, M.F. Rossato, S.M. Oliveira, M.A. Silva, C.R. Silva, et al., TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout, *Free Radic. Biol. Med.* 72 (2014) 200–209.
- [35] G. Trevisan, S. Materazzi, C. Fusi, A. Altomare, G. Aldini, M. Lodovici, et al., Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade, *Cancer Res.* 73 (2013) 3120–3131.
- [36] M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, et al., Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data, *Bioinformatics* 28 (2012) 1647–1649.
- [37] K. Kumari, S. Keshari, D. Sengupta, S.C. Sabat, S.K. Mishra, Transcriptome analysis of genes associated with breast cancer cell motility in response to Artemisinin treatment, *BMC Cancer* (2017) 1–13.
- [38] W. Zheng, S. Han, S. Jiang, L. Pang, X. Li, X. Liu, et al., Multiple effects of Xihuang pill aqueous extract on the Hs578T triple-negative breast cancer cell line, *Biomed. Rep.* (2016) 559–566.
- [39] L. Biehler-gomez, G. Giordano, C. Cattaneo, *Journal of Forensic and Legal Medicine* the appearance of breast cancer metastases on dry bone: implications for forensic anthropology, *J. Forensic Leg. Med.* 61 (2019) 5–12.
- [40] I. Ahmad, M.M. Ahmed, M.F. Ahsraf, A. Naem, M. Ahmed, M.S. Farooqi, Pain Management in Metastatic Bone Disease: A Literature Review, (2018), p. 10.
- [41] A. Satija, S.M. Ahmed, R. Gupta, A. Ahmed, S.P.S. Rana, S.P. Singh, et al., Breast cancer pain management - a review of current & novel therapies, *Indian J. Med. Res.* 139 (2014) 216–225.
- [42] G. Varrassi, M. Fusco, S.D. Skaper, D. Battelli, P. Zis, S. Coaccioli, et al., A pharmacological rationale to reduce the incidence of opioid induced tolerance and hyperalgesia: a review, *Pain Ther.* 7 (2018) 59–75.
- [43] D. Buehlmann, J. Grandjean, J. Xandry, M. Rudin, M. Rudin, Longitudinal resting-state fMRI in a mouse model of metastatic bone cancer reveals distinct functional reorganizations along a developing chronic pain state, *Pain* 159 (2018) 719–727.
- [44] S. Falk, A.H. Dickenson, Pain and nociception: mechanisms of cancer-induced bone pain, *J. Clin. Oncol.* 32 (16) (2014) 1647–1654.
- [45] P.W. Mantyh, Mechanisms that drive bone pain across the lifespan, *Br. J. Clin.*

- Pharmacol. 85 (6) (2018) 1103–1113.
- [46] C.J. Aslakson, F.R. Miller, Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor, *Cancer Res.* 52 (1992) 1399–1405.
- [47] J. Park, R.W. Wysocki, Z. Amoozgar, L. Maiorino, M.R. Fein, J. Jorns, A.F. Schott, Y. Kinugasa-Katayama, Y. Lee, N.H. Won, E.S. Nakasone, S.A. Hearn, V. Kuttner, J. Qiu, A.S. Almeida, N. Perurena, K. Kessenbrock, M.S. Goldberg, M. Egeblad, Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps, *Sci. Transl. Med.* 8 (361) (2017) 361ra138.
- [48] G.L. Currie, A. Delaney, M.I. Bennett, A.H. Dickenson, K.J. Egan, H.M. Vesterinen, et al., Animal models of bone cancer pain: systematic review and meta-analyses, *Pain* 154 (2013) 917–926.
- [49] J.S. Mogil, Are we getting anywhere in human pain genetics? *Pain* 146 (2009) 231–232.
- [50] S. Benemei, C. Fusi, G. Trevisan, P. Geppetti, The TRPA1 Channel in Migraine Mechanism and Treatment, (2014).
- [51] D.A. Andersson, C. Gentry, S. Moss, S. Bevan, Europe PMC funders group transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress, *J. Neurosci.* 28 (2009) 2485–2494.
- [52] D. Sugiyama, S. Kang, N. Arpey, Y.M. Usachev, T.J. Brennan, J. Roy, et al., *HHS Public Access.* 127, (2018), pp. 695–708.
- [53] W. Yao, H. Zhao, R. Shi, X. Li, Y. Li, C. Ke, J. Liu, Recombinant protein transduction domain-Cu/Zn superoxide dismutase alleviates bone cancer pain via peroxiredoxin 4 modulation and antioxidation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) 1–6.
- [54] F. de Logu, S. Li Puma, L. Landini, F. Portelli, A. Innocent, D.S.M. de Araújo, M.N. Janal, R. Patacchini, N.W. Bunnett, P. Geppetti, R. Nassini, Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice, *J. Clin. Invest.* 129 (2019) 5424–5441.
- [55] Z.N. Rabbani, I. Spasojevic, X. Zhang, B.J. Moeller, J. Vasquez-vivar, M.W. Dewhirst, et al., *NIH Public Access.* 47, (2010), pp. 992–1004.
- [56] M. Koufaki, Therapeutic Applications of Lipoic Acid: A Patent Review (2011–2014), (2014), pp. 993–1005.
- [57] M. Maschio, A. Zarabla, A. Maialelli, F. Marchesi, D. Giannarelli, S. Gumenyuk, et al., Prevention of Bortezomib-Related Peripheral Neuropathy with Docosahexaenoic Acid and α -Lipoic Acid in Patients with Multiple Myeloma: Preliminary Data, (2018).
- [58] N.L.M. Quintão, J.R. Santin, L.C. Stoeberl, T.P. Corrêa, J. Melato, R. Costa, Pharmacological treatment of chemotherapy-induced neuropathic pain: PPAR γ agonists as a promisin tool, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 907.
- [59] C. Panis, R. Binato, S. Correa, V.J. Victorino, V. Dias-Alves, A.C. Herrera, R. Cecchini, A.N. Simão, D.S. Barbosa, L. Pizzatti, E. Abdelhay, Short infusion of paclitaxel imbalances plasmatic lipid metabolism and correlates with cardiac markers of acute damage in patients with breast cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2017).
- [60] S. Zeinoddini, M. Nabiuni, H. Jalali, The synergistic cytotoxic effects of doxorubicin and *Viola odorata* extract on human breast cancer cell line T47-D, *J. Cancer Res. Ther.* 15 (2018) 1073–1079.
- [61] J.O. Tun, L.A. Salvador-Reyes, M.C. Velarde, N. Saito, K. Suwanborirux, G.P. Concepcion, Synergistic cytotoxicity of renieramycin M and doxorubicin in MCF-7 breast cancer cells, *Mar. Drugs* 17 (2019) 536.
- [62] K. Janes, J.W. Little, C. Li, L. Bryant, C. Chen, Z. Chen, K. Krzysztow, T. Doyle, A. Snider, E. Esposito, S. Cuzzocrea, E. Bieberich, L. Obeid, I. Petrache, G. Nicol, W.L. Neumann, D. Salvemini, The development and maintenance of paclitaxel-induced neuropathic pain requires activation of the sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 21082–21097.
- [63] S.J. Ward, S.D. McAllister, R. Kawamura, R. Murase, H. Neelakantan, E.A. Walker, Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT $_1A$ receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 636–645.
- [64] J. Meng, Q. Zhang, C. Yang, L. Xiao, Z. Xue, J. Zhu, Duloxetine, a balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, improves painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy by inhibiting activation of p38 MAPK and NF- κ B, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 365.
- [65] R.I. Salganik, The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population, *J. Am. Coll. Nutr.* 20 (2001) 464S–472S.
- [66] H. Sun, X. Guo, Z. Wang, P. Wang, Z. Zhang, J. Dong, R. Zhuang, Y. Zhou, G. Ma, W. Cai, Alphaipoic acid prevents oxidative stress and peripheral neuropathy in nab-paclitaxel-treated rats through the Nrf2 signalling pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019) 3142732.
- [67] Y. Xu, J. Liu, M. He, R. Liu, V. Belegu, P. Dai, et al., Mechanisms of PDGF siRNA-mediated inhibition of bone cancer pain in the spinal cord, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27512.
- [68] M.H. van den Beuken-van, J.M. de Rijke, A.G. Kessels, H.C. Schouten, M. van Kleef, J. Patijn, High prevalence of pain in patients with cancer in a large population-based study in The Netherlands, *Pain* 132 (2007) 312–320.
- [69] H. Wei, H.Y. Wu, H. Fan, T.F. Li, A.N. Ma, X.Y. Li, Y.X. Wang, A. Pertovaara, Potential role of spinal TRPA1 channels in antinociceptive tolerance to spinally administered morphine, *Pharmacol. Rep.* 68 (2016) 472–475.
- [70] D.A. Andersson, C. Gentry, S. Moss, S. Bevan, Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress, *J. Neurosci.* 28 (2008) 2485–2494.
- [71] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)), *Methods* 25 (2001) 402–408.

4.3 ARTIGO 3 – Role of TRPA1 expressed in bone tissue and the antinociceptive effect of the TRPA1 antagonist repeated administration in a breast cancer pain model – Artigo aceito e publicado na revista Life Sciences em 2021.

Life Sciences 276 (2021) 119469



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie



Role of TRPA1 expressed in bone tissue and the antinociceptive effect of the TRPA1 antagonist repeated administration in a breast cancer pain model

Amanda Spring de Almeida^a, Gabriele Cheiran Pereira^a, Evelyne da Silva Brum^b,
Cássia Regina Silva^c, Caren Tatiane de David Antoniazzi^a, Daniel Ardisson-Araújo^b,
Sara Marchesan Oliveira^b, Gabriela Trevisan^{a,3}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bone pain
Hydrogen peroxide
TRPV1
TRPV4
NADPH oxidase
Superoxide dismutase

ABSTRACT

Aims: Breast cancer-induced chronic pain is usually treated with opioids, but these compounds cause various adverse effects. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is involved in cancer pain; also, endogenous TRPA1 agonists are associated with cancer pain development. The aim of this study was to observe the antinociceptive effect of a repeated-dose TRPA1 antagonist administration and the production of endogenous TRPA1 agonists and TRPA1 expression in bone tissue in a model of breast cancer pain in mice. Second, we used a sequence reading archive (SRA) strategy to observe the presence of this channel in the mouse bone and in mouse bone cell lines.

Main methods: We used BALB/c mice for experiments. The animals were subjected to the tumor cell inoculation (4 T1 strain). HC-030031 (a TRPA1 antagonist) treatment was done from day 11 to day 20 after tumor inoculation. TRPA1 expression and biochemical tests of oxidative stress were performed in the bone of mice (femur). SRA strategy was used to detect the TRPA1 presence.

Key findings: Repeated treatment with the TRPA1 antagonist produced an antinociceptive effect. There was an increase in hydrogen peroxide levels, NADPH oxidase and superoxide dismutase activities, but the expression of TRPA1 in the bone tissue was not altered. SRA did not show TRPA1 residual transcription in the osteoblast and osteoclast cell lines, as well as for mice cranial tissue and in mouse osteoclast precursors.

Significance: The TRPA1 receptor is a potential target for the development of new painkillers for the treatment of bone cancer pain.

1. Introduction

Advanced breast cancer is commonly associated with chronic pain due to bone metastasis [1–3]. Besides, opioids are commonly used drugs in treating bone pain, but these compounds cause adverse effects, such as tolerance, which develops due to repeated-dose treatment, limiting their use. This adverse effect is frequent in patients who take long-term use of opioids, so they need to increase the drug dose, increasing the incidence of other side effects [4]. In a previous study, we demonstrated the role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in a model of breast cancer-induced nociception in mice accompanied by bone metastasis development [5]. However, it is unknown whether repeated-

dose administration of a TRPA1 antagonist can cause an antinociceptive effect in a cancer pain model.

Moreover, different studies showed an increase in the production of TRPA1 endogenous agonists (hydrogen peroxide, H₂O₂), NADPH oxidase and superoxide dismutase (SOD) activities in cancer pain models. Increased levels of H₂O₂ and NADPH oxidase activity were observed in the paw skin of mice inoculated with melanoma cells (B16F10) [6]. In addition, in the paw skin and in the sciatic nerve of mice inoculated with breast cancer cells (4 T1 cells), an increase in the levels of H₂O₂, and NADPH oxidase and SOD activity was observed [5]. Thus, TRPA1 activation by endogenous agonists is related to the development of cancer nociception [5,6]. Nevertheless, it was not investigated if there is an

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, building 21, room 5207, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: gabriela.trevisan-santos@ufsm.br (G. Trevisan).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119469>

Received 21 December 2020; Received in revised form 21 March 2021; Accepted 26 March 2021

Available online 31 March 2021

0024-3205/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

increase of TRPA1 agonists into the bone in a breast cancer model with metastasis or a model of cancer-induced bone pain (CIBP).

Different TRPs channels seemed to be involved in bone processes. It was already described the possible relationship of TRPV4 in osteoclast formation promoted by acidosis [7]. Besides, TRPV1 is involved in the proliferation and differentiation of osteoblasts [8]. Previously, the participation of TRPV1 in CIBP was described in different studies [9–11]. Recently, it was demonstrated that TRPA1 antagonism reduced the nociception in a model of CIBP in rats [12]. However, until now, no study describes if TRPA1 can be expressed in bone tissue.

Thus, the objective of the current study was to investigate the antinociceptive effect of a TRPA1 antagonist after its repeated administration and the production of TRPA1 endogenous agonists and TRPA1 immunoreactivity in the bone of mice submitted to a breast cancer pain model. Second, we used a sequence read archive (SRA) strategy to observe the TRPA1 presence in the bone of mice and mice bone cell lines.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female adult BALB/c mice (20–30 g) were used. They were kept at a controlled temperature (22 ± 1 °C) in a light/dark cycle of 12 h (h) (lights on 6:00 AM to 6 PM). Standard laboratory animal food (Puro Lab 22 PB pelleted form, Puro Trato, Rio Grande do Sul, Brazil) and water were provided freely. They have been kept in individually ventilated cages (5 animals per cage) with wood shaving bedding and nesting material. This strain of mice was chosen because the 4 T1 lineage tumor cells developed only in BALB/c mice. The animals were taken to the experiment room for adaptation for at least 1 h before each experiment. Each animal was used in just one test. The experiments were started after approval by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal de Santa Maria (protocol number 7536250417/2017) and by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocol number 042-2014-02). All experimental protocols followed the Animal Research: Reporting in vivo Experiments (ARRIVE) guidelines [13]. The number of animals was the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of treatments and was calculated using the GPower program.

2.2. Breast cancer pain model

A baseline measurement of the animals' threshold to the mechanical stimulus (von Frey test) and thermal stimulus to cold (acetone test) was performed first. After that, the animals were inoculated with 4 T1 cells (10^5 cells/site) in the fourth mammary gland, and the development of breast cancer pain with bone metastasis occurred according to a previous study [14–16]. 4 T1 cells were cultured in monolayer using DMEM medium supplemented with 5% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. For cancer induction, the cells were resuspended in phosphate buffer, and then 50 μ l of the cell suspension or vehicle (phosphate buffer) were injected into the right caudal mammary gland of the mouse (50 μ l). The 4 T1 cells were kindly provided by Dr. Adriana Bonomo (Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil) [15].

2.3. Treatment protocol

To evaluate whether the effect of the TRPA1 antagonist, HC-030031, is capable of lasting more than two hours, as previously reported [5], a repeated dose treatment was carried out for ten days. First, baseline measurements for mechanical and cold allodynia were taken. After the animals were inoculated with 4 T1 cells in the fourth mammary gland [16], and on the 11th day after the tumor cells inoculation, the treatment with the TRPA1 antagonist (HC-030031, 100 mg/kg intragastric, i. g.) started for the next ten consecutive days, once a day (treatment was

carried out from day 11 to day 20 after tumor cell inoculation). The dose of 100 mg/kg was used before and induced an antinociceptive effect; thus, we selected this dose to be used in this study [17]. The animals started to be treated on the eleventh day after tumor induction, because we have previously demonstrated that nociception develops after the tenth day of inoculation [16].

Thus, nociceptive tests were performed on the day of the nociceptive peak (20 days), based on a protocol previously described [16,18] (Fig. 1). The tests for treatment nine (day 19 after tumor inoculation) were performed 24 h after treatment, on day 20 (last day of treatment). Then, 20 days after tumor inoculation animals were kept at the site of the nociceptive test evaluation one hour before nociception measurement. After that, the nociceptive measures related to the treatment of day 19 were measured. Then, the animals received the last dose of treatment, and 1 h later, the nociceptive measures were evaluated again (Fig. 1).

The animals were divided into the following groups: without tumor - treated with vehicle (1% DMSO in saline, 10 ml/kg, intragastric, i.g.); without tumor - administered with HC-030031 (100 mg/kg, i.g.); tumor - treated with vehicle (1% DMSO in saline, 10 ml/kg, i.g.); tumor - administered with HC-030031 (100 mg/kg, i.g.).

2.4. Nociceptive tests

2.4.1. Mechanical threshold

To detect the mechanical sensitivity, tests were performed using von Frey filaments of increasing intensity (0.07–2 g) as previously described [5,21]. Briefly, the animals were set in the experimental site, consisting of high chambers with a meshed metal floor, for 1 h. After this period, the stimulation with von Frey filaments of each animal's right hind paw was performed following the up-and-down method. The first filament promoted a pressure of 0.6 g. In case of withdrawal of the paw, a filament with a lower pressure was applied. If no withdrawal occurred, a filament with a higher pressure was used. In total, six stimulations were performed, using filaments of 0.07; 0.16; 0.4; 0.6; 1.0; 1.4 or 2.0 g. With the results obtained, the value corresponding to 50% of the threshold, in grams, that each animal supports (threshold 50%) was calculated. A reduction in this value was considered mechanical allodynia and reversal as an antinociceptive (anti-allodynic) effect.

2.4.2. Cold sensitivity

Cold thermal sensitivity was measured using the modified acetone drop method. After the animals were set, a drop of acetone (20 μ l) was placed on the animal's paw's skin surface. Then, behavioral responses to acetone drop were timed, as previously described [5,22].

2.5. Biochemical assays

2.5.1. Hydrogen peroxide (H_2O_2) production assay

The concentration of H_2O_2 was measured in the bone (femur) samples 20 days after injection of 4 T1 cells or control animals. For this, samples were obtained from mice after euthanasia via chemical method using thiopental 50 mg/kg/10 ml. The tissue samples were homogenized on ice with 300 μ l of Tris/HCl buffer (50 mM - pH 7.4) and centrifuged (1.000 \times g) at 4 °C for 10 min. Sodium azide (25 mM) was added to the supernatant and centrifuged again at 12.000 \times g at 4 °C for 20 min. The H_2O_2 content was determined by the red phenol method using horseradish peroxidase (HRPO). Thus, 50 μ l of the supernatant homogenate, 25 μ l of phenol red (100 μ g/ml), 5 μ l of HRPO type II (EC: 1.11.1.7) (50 μ g/ml) were added and incubated in the dark at 25 °C for 10 min. After incubation, 10 μ l of 1 M NaOH was added, and the absorbance was determined spectrophotometrically at 610 nm. The results were expressed as micromole of H_2O_2 per mg of protein, based on a standard HRPO mediated oxidation curve of phenol red by H_2O_2 . The reaction was read in a microkinetic reader (Fisher Biotech BT, 2000), and protein content was measured using the Bradford method (1987)

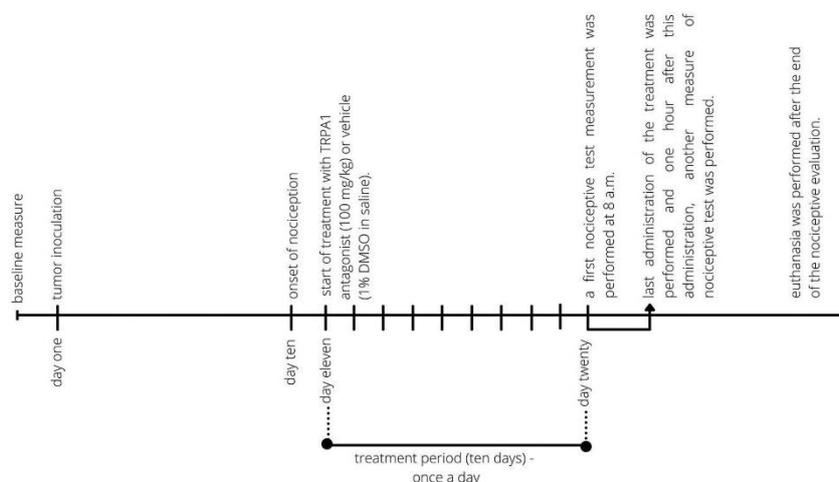


Fig. 1. Graphic demonstration of the treatment protocol with repeated doses of TRPA antagonist (HC-030031) for 10 days.

[22–25].

2.5.2. Evaluation of NADPH oxidase activity

NADPH oxidase activity was assessed in bone (femur) samples 20 days after inoculation of the cancer cells or in the control group using a commercially available assay kit (CY0100, cytochrome c reductase, NADPH Assay Kit, Sigma-Aldrich, Milan, Italy). The samples were homogenized in Tris/HCl buffer (50 mM - pH 7.4) and centrifuged for 10 min at $1.000 \times g$ at $4^\circ C$. The supernatant was used to determine NADPH activity. Values of NADPH oxidase activity were described as U/ml/mg of protein [5,6].

2.5.3. Evaluation of superoxide dismutase (SOD) activity

For the evaluation of SOD activity, bone samples were collected and analyzed 20 days after inoculation of cancer cells or from the control group. They were homogenized in Tris-HCl buffer (50 mM - pH 7.4) and centrifuged at $1.000 \times g$ at $4^\circ C$ for 10 min. Different volumes of the samples (5, 10, and 15 μl) were then mixed with adrenaline (30 μl , 60 mM - pH 2.0) and sodium carbonate buffer (255, 260 e 265 μl ; 50 mM - pH 10.2), incubated at $30^\circ C$, and changes in absorbance were observed at 480 nm and monitored for 5 min. Values of SOD activity were described as U/ml/mg of protein [24–26].

2.6. Western blot

The Western blot analysis was carried out as previously described [27] with minor modifications, samples were taken 20 days after injection of 4 T1 cells or control animals. The right femur was removed and homogenized on ice in tissue protein extraction reagent (T-PER) (Thermo Scientific) supplemented with Halt™ protease and phosphatase inhibitors Cocktail (100 \times) (Thermo Scientific). Homogenized samples were then centrifuged at $10.000 \times g$ at $4^\circ C$ for 5 min, and the supernatant was kept for further manipulation. A sample aliquot (20 μg protein) of the supernatant was diluted in Laemmli buffer and distilled water and subjected to a temperature of $90^\circ C$ for 5 min. The protein was then subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF). After blocking the membrane with 2.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris (TBS) for 1 h, it was exposed to primary rabbit antibody for 12 h at $4^\circ C$ for the detection of TRPA1, 1:200 (NOVUS Biologicals, Littleton, CO, USA). At the end of this period, the membranes were washed three

times in Tris containing 0.01% (v/v) Tween 20 (TBS-T) and incubated again with a secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody 1:3000 for 3 h. The membranes were visualized by chemiluminescence ECL (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and the density of the specific bands were observed using an image processing program (ImageJ 1.32 J, Wayne Rasband, USA) and standardized against a control (mouse primary monoclonal antibody to β -actin 1:5000; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

2.7. Sequence read archive (SRA) experiment analysis

To search for transcripts we used sequence reading files (SRAs) available on the NCBI platform. The transcripts of TRPA1, TRPV1, and TRPV4 specifically in bone cell lines cultured in vitro (MC3T3; RAW 264.7) and fresh tissues from mice were investigated. The bioprojects used were PRJNA421705 for MC3T3 cells, PRJNA565987 for RAW 264.7, PRJNA601128 for cranial tissues from BALB/C and C57BL/6 mice, and PRJNA428369 for osteoclast precursors at baseline and after RANKL stimulation. Besides, to search for TRPA1, TRPV1, and TRPV4 transcripts in mice, we used SRAs available on the NCBI platform. Briefly, total RNAs from these cells were extracted in triplicate, and barcoded mRNA-seq cDNA libraries were prepared in triplicate and deep-sequenced using the Illumina platforms. The transcriptome reads were downloaded using the SRA Toolkit and individually mapped against the entire coding DNA sequence (CDS) of *trpa1*, *trpv1* e *trpv4* (NM_001348288). We mapped the reads using the program Geneious R9.0 [28] and a pairwise identity of 99%.

2.8. Statistical analysis

The data are expressed as mean + standard error of mean and were statistically analyzed using Student's *t*-test, two-way analysis of variance (ANOVA), and repeated measure ANOVA, followed by Bonferroni post hoc test when appropriate. P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered to be significant. GraphPad 5.0 software (San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Antinociceptive effect of repeated treatment with the TRPA1 antagonist

The repeated administration of TRPA1 antagonist for 10 days, HC-030031 (100 mg/kg, i.g.), showed an anti-allodynic effect in a model of breast carcinoma in mice. HC-030031 caused mechanical and cold anti-allodynic effects on day 20 before the 10th dose administration and 1 h after the 10th dose injection of the antagonist (Fig. 2A–B). The maximum inhibition (Imax) for the mechanical threshold for the treatment was $80 \pm 18\%$ and for cold allodynia was $65 \pm 10\%$, respectively, concerning the first evaluation that was done 24 h after the 9 injected dose. The Imax for the mechanical threshold for the treatment was $60 \pm 9\%$ and for cold allodynia was $69 \pm 5\%$, concerning the second evaluation (1 h after the last administration of HC-030031 on the 20 days after tumor inoculation). The tumor growth in the animals' breasts was verified during this period, showing that the antagonist did not alter this process (data not shown).

3.2. The injection of 4 T1 cells in the mice's mammary gland induced the

TRPA1 agonist production in the bone.

H_2O_2 concentration (Fig. 3A), NADPH oxidase (Fig. 3B), and SOD activity (Fig. 3C) were increased in the bone samples 20 days after the inoculation of breast cancer cells. There was a 57% increase in H_2O_2 concentration, 82% in NADPH oxidase activity, and 74% in SOD activity in the tumor group compared to the control group.

3.3. The TRPA1 expression in bone was not increased after the inoculation of 4 T1 tumor cells

The 4 T1 cells inoculation did not induce alteration in TRPA1 immunoreactivity in bone tissue evaluated 20 days after tumor inoculation (Fig. 4).

3.4. Absence of TRPA1 expression at the transcriptional level in rodent bone cells

Through the SRA experiments, a cell line that originates mouse osteoblasts in vitro (MC3T3) presented residual transcription of TRPV4 when compared to a housekeeping gene control (i.e., *gapdh*, data not shown), and no reads were found for both TRPA1 and TRPV1. The same result was also found in a murine cell line that originates in vitro osteoclasts (RAW 264.7). In a similar trend as observed for transcriptional analysis of TRPA1, TRPV1, and TRPV4 in cranial tissue in BALB/c and C57BL/6 revealed that mice lack transcription of TRPA1 and TRPV1 in this tissue but presented transcripts for TRPV4. Even osteoclast and osteoblasts (from C57BL/6) precursors at baseline and induced with RANKL presented no TRPA1 transcription (Table 1).

4. Discussion

Breast cancer is often related to the development of bone metastasis that generates severe pain. Cancer pain is usually treated with opioids that induce tolerance, which develops due to repeated dose treatment, and other adverse effects [29]. Previously, it was described in a breast cancer model in mice the development of bone metastasis and pain-related behaviors [5,16]. Thus, in the current study, we showed that the repeated administration of the TRPA1 antagonist had an antinociceptive effect that lasted 24 h after the 9 day of injection on day 20 after tumor inoculation. Also, the inoculation of the breast cancer cells causes the TRPA1 agonist production (H_2O_2) and increases the enzyme activity responsible for generating these by-products (NADPH oxidase and SOD). However, TRPA1 immunoreactivity was not altered in the bone tissue in this model. Also, we observed, via SRA experiments, the

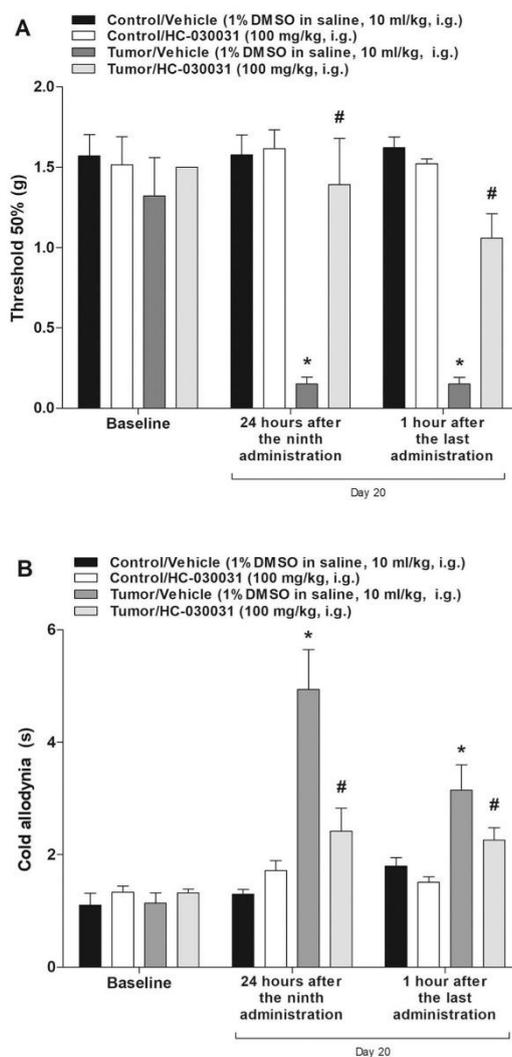


Fig. 2. TRPA1 selective antagonist intragastric repeated administration reduced mechanical and cold allodynia in a murine model of breast carcinoma. The mechanical threshold and cold allodynia were evaluated on the last day of treatment with repeated doses intragastric with HC-030031 (100 mg/kg) or vehicle (at 20 days of tumor inoculation). One measure was observed 24 h after the 9 day of treatment on day 20 after tumor inoculation. Another measure was observed 1 h after the last dose administered on day 20 after tumor inoculation. Data are expressed as mean + S.E.M. (n = 10). *P < 0.05, when compared to the control group or baseline values and #P < 0.05 when compared to tumor/vehicle group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test and repeated measure ANOVA).

expression of TRPA1 and TRPV1 receptor at the transcriptional level is not present in mouse bone cells line. Besides, in SRAs experiments, we show no transcriptional expression for TRPA1 and TRPV1 in osteoclasts and osteoblasts in mice, but there is for TRPV4. Even in cranial tissue of C57BL/6 mice, there is no expression of TRPA1, which is not observed in BALB/c mice, but, for both, there is a transcriptional level of the TRPV4

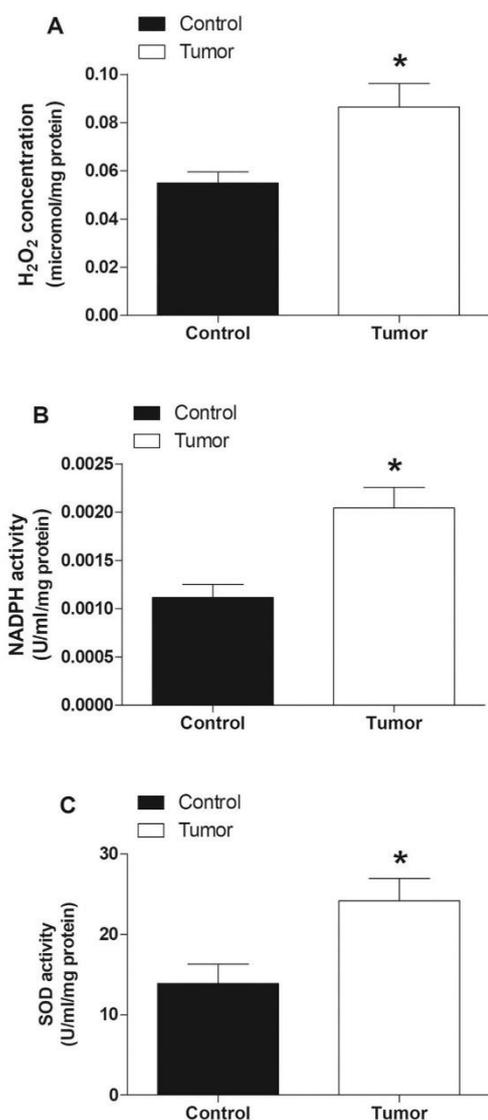


Fig. 3. Administration of 4 T1 tumor cells induced an increase in oxidative compounds production and enzymatic activity in the bone in a murine model of breast carcinoma. The oxidative status of cancer pain development was assessed through (A) H_2O_2 concentration, (B) NADPH oxidase, and (C) SOD activity in mouse bone (femur). The measurements were performed 20 days after 4 T1 cell injection. Control group mice were injected with vehicle (PBS). Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 5$). * $P < 0.05$, when compared to control (PBS) group (Student's *t*-test).

channel.

In the treatment of cancer pain, the most commonly used analgesics are opioids, which are used for long periods and in repeated doses, but these drugs have many adverse effects [4]. Thus, we observed whether the TRPA1 antagonism, for a prolonged period, could develop an antinociceptive effect for a longer time, since, regarding cancer pain, HC-

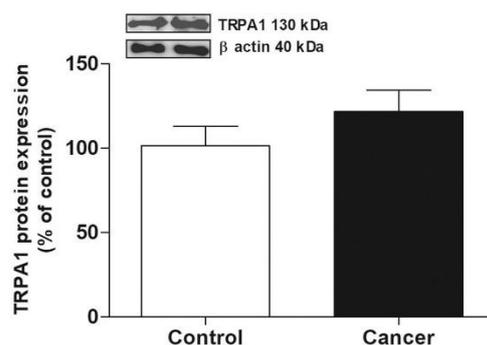


Fig. 4. TRPA1 expression in the bone in a breast cancer pain model. The measurements were performed 20 days after 4 T1 cell injection. Data are expressed as % of control ($n = 8$). $P > 0.05$. Non-parametric Student's *t*-test.

Table 1
Transcriptional expression of TRPs cell lines of bone cells for in vitro culture, mouse bone cells, and mouse cranial tissue.

Cell/receptors	TRPA1	TRPV1	TRPV4
MC3T3	No	No	Yes
RAW 264.7	No	No	Yes
Mice osteoclasts C57BL/6	No	No	Yes
Mice osteoblasts C57BL/6	No	No	Yes
BALB/c cranial tissue	No	No	Yes
C57BL/6 cranial tissue	No	No	Yes

030031 has been shown to have an antinociceptive effect in up to a maximum of two hours after acute intragastric administration [5]. This is an essential step since the opioids used in these patients produce adverse effects [29]; therefore, it is necessary to search for other drugs with long-lasting analgesic effects. Besides, in this study, we observed that the treatment with repeated doses of HC-030031 did maintain its antinociceptive effect, thus showing a therapeutic potential for patients with CIBP. In addition to this finding, it has been shown previously that TRPA1 blockade was able to attenuate the tolerance induced by repeated administration of morphine in rats [30]. With this evidence, TRPA1 antagonism is an essential target for prolonged analgesic treatment in patients with CIBP.

In other studies that report cancer pain in models of tumor cell inoculation or with chemotherapy treatment involving TRPA1, it was described that the activation of this receptor might be caused by the production of the oxidizing compounds that act as TRPA1 agonists [5,6,23]. However, these studies do not report any activation of this receptor on bone tissue. This investigation is interesting since there is a production of these oxidizing compounds in the bone tumor microenvironment, and if the receptor was present in this environment (e.g., in sensory neurons), the mechanism of bone pain could be better elucidated. Thus, we evaluated the oxidative stress generated in the bone through the H_2O_2 concentration and the NADPH oxidase and SOD enzyme activities, which were increased. The increase in H_2O_2 levels and NADPH oxidase, and SOD activities has already been demonstrated in the hind paw tissue and the sciatic nerve, in this same model, in another study [5]. Additionally, an enhancement in SOD activity was only demonstrated in rat bones (tibia and femur), in ovariectomy, and type 1 diabetes mellitus model [31,32].

Studies have already demonstrated the relationship between TRPs and cancer pain development, such as TRPV1, TRPV4, and TRPA1 [11,16,33,34]. Among these findings related to cancer pain, it was reported that the TRPV1 activation by a substance derived from the tumor tissue induced bone cancer development [9]. Besides, the regulation of

the TRPV1 pathway is related to the inhibition of peripheral and central sensitization in a CIBP model [35]. Besides, increased TRPV1 and TRPV4 expression in tibia tissue were also demonstrated in a CIBP in mice [10]. Regarding TRPA1, it has already been established that the appearance of neuropathic pain during the development of bone cancer in rats in an arthrotomy model may be involving this receptor [12]. Also, nociception can also occur in a tumor cell inoculation model in the mammary gland of mice with bone metastasis depending on TRPA1 activation [5].

However, few studies showed the expression of these TRPs in bone tissue. Regarding TRPV1, its expression in the mouse femur has been demonstrated [36,37], and it was also considered a bone nociceptor, as it is present in L3 and L4 DRGs in rats [38]. Concerning TRPV4, its expression was demonstrated in a bone cell line (mesenchymal cells) [39], and about TRPA1, we showed in this study that there is no evidence of its expression in bone tissue cells. It is interesting to note that in almost all cell lines of bone cells for in vitro culture, as for osteoclasts and osteoblasts and cranial tissue, there is no transcriptional expression for TRPA1 and TRPV1, but there is for TRPV4 channel. TRPV4 is involved with cancer-induced neuropathy [33] and bone cancer pain [10]. Moreover, it has been shown that this receptor is expressed in mesenchymal stem cells, which can originate bone cells [39]. Thus, in addition to having already been reported that this receptor is a potential target for cancer treatment [40], we can suggest that it is an important target to understand bone cancer pain and the mechanisms involved behind this symptom.

Few studies show the direct relationship of the TRPA1 channel with cancer pain, as did Almeida and collaborators (2020). Therefore, we continue to seek to elucidate the role of TRPA1 in cancer pain, including the process of bone metastasis. So, in this work, in addition to showing the antinociceptive effects of a repeated HC-030031 treatment in mice, we seek to unravel the involvement of the receptor in the bone tumor development process. We brought results that show the increase of TRPA1 agonists in the bone, however, this receptor does not appear to be expressed in the researched bone cells. Thus, our work contributes to this process of elucidating the participation of the TRPA1 receptor in breast cancer-induced bone cancer pain, showing that we still need more studies to soon deal with this symptom that affects so many individuals.

5. Conclusions

The repeated treatment with the TRPA1 antagonist demonstrates that this is a potential therapeutic target for the long-term treatment of pain in patients who develop cancer with bone metastasis. Besides, we have demonstrated an increase in the production of TRPA1 receptor agonists in the mice's bone. Considering we have not seen any alteration in TRPA1 expression in the bone of animals that developed the breast cancer pain model, and we have also not found TRPA1 expression at the transcriptional level, in rodent bone cells, probably what induces bone nociception is the activation of TRPA1 by endogenous agonists in sensory neurons present in this microenvironment.

Financial support

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process #422376/2016-7).

CRediT authorship contribution statement

Amanda Spring de Almeida Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Investigation, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Gabriele Cheiran Pereira**: Formal analysis, Methodology, Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Evelyn S. Brum**: Formal analysis, Methodology, Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Cássia Regina Silva**: Formal analysis, Methodology, Investigation, Validation,

Writing - review & editing. **Caren Tatiane de David Antoniazzi**: Investigation, Writing - review & editing. **Daniel Ardisson-Araújo**: Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Sara Marchesan Oliveira**: Resources, Writing - review & editing. **Gabriela Trevisan**: Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are acknowledged. Amanda Spring de Almeida is the recipient of a Ph.D. fellowship from CAPES [process #1687637]. Gabriela Trevisan is the recipient of an award from CNPq [process #303531/2020-7].

References

- [1] P. Mantyh, Bone cancer pain: causes, consequences, and therapeutic opportunities, *Pain* 154 (2013) S54–S62, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.044>.
- [2] R.A. Swam, J.A. Paice, D.L. Anghelescu, M. Are, J.Y. Bruce, S. Buga, M. Chwistek, C. Cleland, D. Craig, E. Gafford, H. Greenlee, E. Hansen, A.H. Kamal, M. M. Kandar, S. LeGrand, S. Mackey, M. Rachel McDowell, N. Moryl, L.M. Nabell, S. Nesbit, N. O'Connor, M.W. Rabow, E. Rickerson, R. Shatsky, J. Sindt, S.G. Urba, J.M. Youngwerth, L.J. Hammond, L.A. Gurski, Adult cancer pain, version 3.2019, *JNCN J. Natl. Compr. Cancer Netw* 17 (2019) 977–1007, <https://doi.org/10.6004/jncn.2019.0038>.
- [3] R. Zajączkowska, M. Kocot Kepska, W. Leppert, J. Wordliczek, Bone pain in cancer patients: mechanisms and current treatment, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019), <https://doi.org/10.3390/ijms20236047>.
- [4] A. Sattja, S.M. Ahmed, R. Gupta, A. Ahmed, S.P.S. Rana, S.P. Singh, S. Mishra, S. Bhatnagar, Breast cancer pain management - a review of current & novel therapies, *Indian J. Med. Res.* (2014).
- [5] A.S. de Almeida, F.K. Rigo, S.D.T. De Prá, A.M. Milioli, G.C. Pereira, D.D. Lieckemeyer, C.T. Antoniazzi, S.Q. Kudsí, D.M.P.A. Araújo, S.M. Oliveira, J. Ferreira, G. Trevisan, Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma, *Pharmacol. Res.* 152 (2020), doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104576>.
- [6] C.T.D.D. Antoniazzi, R. Nassini, F.K. Rigo, A.M. Milioli, F. Bellinasso, C. Camponogara, C.R. Silva, A.S. de Almeida, M.F. Rossato, F. De Logu, S. M. Oliveira, T.M. Cunha, P. Geppetti, J. Ferreira, G. Trevisan, Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain, *Int. J. Cancer* 144 (2019) 355–365, <https://doi.org/10.1002/ijc.31911>.
- [7] K. Kato, I. Morita, Promotion of osteoclast differentiation and activation in spite of impeded osteoblast-lineage differentiation under acidosis: effects of acidosis on bone metabolism, *BioSci. Trends* 7 (2013) 33–41, <https://doi.org/10.5582/bst.2013.v7.1.33>.
- [8] R. Mikami, K. Mizutani, A. Aoki, Y. Tamura, K. Aoki, Y. Izumi, Low level ultrahigh-frequency and ultrashort-pulse blue laser irradiation enhances osteoblast extracellular calcification by upregulating proliferation and differentiation via transient receptor potential vanilloid 1, *Lasers Surg. Med.* 50 (2018) 340–352, <https://doi.org/10.1002/lsm.22775>.
- [9] Y. Wan, New mechanism of bone cancer pain: tumor tissue derived endogenous formaldehyde induced bone cancer pain via TRPV1 activation, *Adv. Exp. Med. Biol.* 904 (2016) 41–58, doi:https://doi.org/10.1007/978-94-017-7537-3_4.
- [10] M.H. Heo, J.Y. Kim, I. Hwang, E. Ha, K.U. Park, Analgesic effect of quetiapine in a mouse model of cancer induced bone pain, *Korean J. Intern. Med.* 32 (2017) 1069–1074, <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.377>.
- [11] H. Wakabayashi, S. Wakisaka, T. Hiraga, K. Hata, R. Nishimura, M. Tomimaga, T. Yoneda, Decreased sensory nerve excitation and bone pain associated with mouse Lewis lung cancer in TRPV1-deficient mice, *J. Bone Miner. Metab.* 36 (2018) 274–285, <https://doi.org/10.1007/s00774-017-0842-7>.
- [12] D. Zhao, D.F. Han, S.S. Wang, B. Lv, X. Wang, C. Ma, Roles of tumor necrosis factor- α and interleukin 6 in regulating bone cancer pain via TRPA1 signal pathway and beneficial effects of inhibition of neuro-inflammation and TRPA1, *Mol. Pain* 15 (2019), <https://doi.org/10.1177/1744806919857981>.
- [13] J.C. McGrath, E. Lilley, Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP*, (2015) 3189–3193, doi:<https://doi.org/10.1111/bjp.12955>.
- [14] M. Lelekakis, J.M. Moseley, T.J. Martin, D. Hards, E. Williams, P. Ho, D. Lowen, J. Javni, F.R. Miller, J. Slaviv, R.L. Anderson, A Novel Orthotopic Model of Breast Cancer Metastasis to Bone, 1999.
- [15] A.C. Monteiro, A.C. Leal, T. Gonçalves-Silva, A.C.T. Mercadante, F. Kestelman, S. B. Chaves, R.B. Azevedo, J.P. Monteiro, A. Bonomo, T cells induce pre-metastatic

- osteolytic disease and help bone metastases establishment in a mouse model of metastatic breast cancer, *PLoS One* 8 (2013) 1–13, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068171>.
- [16] A.S. de Almeida, F.K. Rigo, S.D.T. De Prá, A.M. Milioli, D.P. Dalenogare, G. C. Pereira, Characterization of cancer-induced nociception in a murine model of breast carcinoma, *Cell. Mol. Neurobiol.* (2019), <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00666-8>.
- [17] S.R. Eid, E.D. Crown, E.L. Moore, H.A. Liang, K.C. Choong, S. Dima, D.A. Henze, S. A. Kane, M.O. Urban, HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity, *Mol. Pain* 4 (2008) 1–10, <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-48>.
- [18] A.N. Lozano-Ondoua, A.M. Symons-Liguori, T.W. Vanderah, Cancer-induced bone pain: mechanisms and models, *Neurosci. Lett.* 557 (2013) 52–59, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.08.003>.
- [21] G. Trevisan, M.F. Rossato, C.L.B. Walker, J.Z. Klafke, F. Rosa, S.M. Oliveira, R. Tonello, G.P. Guerra, A.A. Boligon, R.B. Zanon, M.L. Athayde, J. Ferreira, Identification of the plant steroid spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2012), <https://doi.org/10.1124/jpet.112.195909>.
- [22] G. Trevisan, S. Materazzi, C. Fusi, A. Altomare, G. Aldini, M. Lodovici, R. Patacchini, P. Geppetti, R. Nassini, Novel Therapeutic Strategy to Prevent Chemotherapy- Induced Persistent Sensory Neuropathy by TRPA1 Blockade, vol. 73 (2013) 3120–3132. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4370>.
- [23] I. Brusco, S. Li Puma, K.B. Chiepe, E. da Silva Brum, C.T. de David Antoniazzi, A. S. de Almeida, C. Camponogara, C.R. Silva, F. De Logu, V.M. de Andrade, J. Ferreira, P. Geppetti, R. Nassini, S.M. Oliveira, G. Trevisan, Dacarbazine alone or associated with melanoma-bearing cancer pain model induces painful hypersensitivity by TRPA1 activation in mice, *Int. J. Cancer* 146 (2020) 2797–2809, <https://doi.org/10.1002/ijc.32648>.
- [24] C. Camponogara, E.S. Bruni, N.S. Pegoraro, I. Brusco, F.G. Rocha, M. M. Brandenburg, D.A. Cabrini, E. André, G. Trevisan, S.M. Oliveira, Neuronal and non neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-induced skin inflammation in mice, *Life Sci.* 262 (2020), 118557, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118557>.
- [25] G.C. Pereira, E. Piton, B.M. dos Santos, R.M. da Silva, A.S. de Almeida, D. P. Dalenogare, N.S. Schiefelbein, M.F.P. Fialho, R.N. Moresco, G.T. dos Santos, S. Marchesan, G.V. Bochi, Apocynin as an antidepressant agent: in vivo behavior and oxidative parameters modulation, *Behav. Brain Res.* 388 (2020), 112643, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112643>.
- [26] M.W.S. Oliveira, J.B. Minotto, M.R. de Oliveira, A. Zanotto-Filho, G.A. Behr, R.F. Rocha, J.C.F. Moreira, F. Klamt, Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species, *Pharmacol. Reports.* 62 (2010) 185–193. doi:[https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70256-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70256-5).
- [27] M.A. Casu, A. Sanna, G.P. Spada, M. Falzoi, R. Mongeau, L. Pani, Effects of acute and chronic valproate treatments on p-CREB levels in the rat amygdala and nucleus accumbens, *Brain Res.* 1141 (2007) 15–24, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.004>.
- [28] M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones Havas, M. Chemg, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes, A. Drummond, Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data, *Bioinformatics* 28 (2012) 1647–1649, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- [29] E. Bruera, J.A. Paice, Cancer pain management: safe and effective use of opioids, *Ann. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* (2015) e593–e599. doi:https://doi.org/10.14694/edbook_am.2015.35.e593.
- [30] H. Wei, H.Y. Wu, H. Fan, T.F. Li, A.N. Ma, X.Y. Li, Y.X. Wang, A. Pertovaara, Potential role of spinal TRPA1 channels in antinociceptive tolerance to spinally administered morphine, *Pharmacol. Reports.* 68 (2016) 472–475. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.11.008>.
- [31] Y. Yang, X. Zheng, B. Li, S. Jiang, L. Jiang, Increased activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451 (2014) 86–92, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.069>.
- [32] M. Rivoira, V. Rodriguez, G. Picotto, R. Battagino, N. Tolosa de Talamoni, Naringin prevents bone loss in a rat model of type 1 diabetes mellitus, *Arch. Biochem. Biophys.* 637 (2018) 56–63, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.12.001>.
- [33] A. Maqbloul, B. Elsadek, Expression profiles of TRPV1, TRPV4, TLR4 and ERK1/2 in the dorsal root ganglionic neurons of a cancer-induced neuropathy rat model, *PeerJ.* 2018 (2018), <https://doi.org/10.7717/peerj.4622>.
- [34] C.L. So, M.J.G. Milevskiy, G.R. Monteith, Transient receptor potential cation channel subfamily V and breast cancer, *Lab. Investig.* 100 (2020) 199–206, <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0348-0>.
- [35] Z. Li, J. Zhang, X. Ren, Q. Liu, X. Yang, The mechanism of quercetin in regulating osteoclast activation and the PAR2/TRPV1 signaling pathway in the treatment of bone cancer pain, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 11 (2018) 5149–5156. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31949595%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6963045>.
- [36] M. Hanaka, K. Iba, T. Dohke, K. Kanaya, S. Okazaki, T. Yamashita, Antagonists to TRPV1, ASICs and P2X have a potential role to prevent the triggering of regional bone metabolic disorder and pain-like behavior in tail-suspended mice, *Bone* 110 (2018) 284–294, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.006>.
- [37] K. Kanaya, K. Iba, T. Dohke, S. Okazaki, T. Yamashita, TRPV1, ASICs and P2X2/3 expressed in bone cells simultaneously regulate bone metabolic markers in ovariectomized mice, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 16 (2016) 145–151.
- [38] S. Nencini, M. Ringuet, D.H. Kim, Y.J. Chen, C. Greenhill, J.J. Ivancic, Mechanisms of nerve growth factor signaling in bone nociceptors and in an animal model of inflammatory bone pain, *Mol. Pain* 13 (2017) 1–19, <https://doi.org/10.1177/1744806917697011>.
- [39] R. Das, C. Goswami, TRPV4 expresses in bone cell lineages and TRPV4-R616Q mutant causing Brachyolmia in human reveals “loss of interaction” with cholesterol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 517 (2019) 566–574, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.042>.
- [40] S. Yu, S. Huang, Y. Ding, W. Wang, A. Wang, Y. Lu, Transient receptor potential ion-channel subfamily V member 4: a potential target for cancer treatment, *Cell Death Dis.* 10 (2019), <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1708-9>.

5 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença que afeta grande parte da população mundial (DESANTIS et al., 2014; TORRE et al., 2015) e o câncer de mama é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer em mulheres em todo o mundo (BROOK et al., 2018). Este tipo de tumor é altamente capaz de desenvolver metástase óssea, resultando no aparecimento de um sintoma debilitante que é a dor crônica (BIEHLER-GOMEZ; GIORDANO; CATTANEO, 2019; SCULLY et al., 2012).

A dor do câncer geralmente é de difícil tratamento no cenário clínico atual, e vários estudos têm sido feitos para explorar novos mecanismos envolvidos nesse tipo de patologia, considerando que a dor crônica do câncer diminui expressivamente a qualidade de vida dos pacientes (AHMAD et al., 2018). No entanto, apesar dos esforços para tratar a dor relacionada ao câncer, os opioides ainda são a principal terapia utilizada para reduzir a dor do câncer moderada a grave (GEORGE et al., 2019). Porém, esses medicamentos induzem vários efeitos adversos (SATIJA et al., 2014; THOMAS et al., 2016; VARRASSI et al., 2018) como tolerância, dependência e constipação (PLANTE; VANITALLIE, 2010). Assim, potenciais novos analgésicos devem ser testados utilizando modelos animais de dor induzida por câncer.

Diferentes modelos podem ser utilizados para entender os mecanismos envolvidos na dor induzida por câncer metastático ósseo, como a injeção de células tumorais nos ossos, como tíbia, fêmur ou calcâneo (GOBLIRSCH; ZWOLAK; CLOHISY, 2005; HIASA et al., 2017; MANTYH et al., 2010; MEDHURST et al., 2002; SCHWEI et al., 1999; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015; ZHAO et al., 2013). No entanto, a implantação óssea das células resulta em um número significativo de células tumorais inoculadas diretamente no osso, situação diferente daquela observada em pacientes com câncer de mama.

Dentro disso, Monteiro et al. (2013) mostraram que a perda óssea e a osteoclastogênese ocorreram antes da colonização metastática óssea quando foram injetadas células 4T1 na glândula mamária de camundongos (MONTEIRO et al., 2013). Neste modelo, a progressão da doença é bem comparável ao processo que ocorre no câncer de mama humano (MONTEIRO et al., 2013; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; TAKAHASHI et al., 2015). Dessa forma, a adaptação da infiltração de células metastáticas ao meio ósseo permite seu crescimento e invasividade (BEDNARZ-KNOLL; ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2011; PANIS;

PAVANELLI, 2015), resultando em perda óssea e dor (PANIS; PAVANELLI, 2015). Então, este modelo ortotópico de câncer de mama já foi utilizado para entender o mecanismo de metástase óssea ou para testar novas drogas quimioterápicas (WANG et al., 2015; YERLIKAYA et al., 2016). Entretanto, a investigação do desenvolvimento de dor induzido por câncer neste modelo animal precisava ser elucidada.

Os animais inoculados com células de câncer de mama diretamente na glândula mamária mostraram metástase óssea, alodínia mecânica e ao frio, e alteração na escala de escore facial de camundongos (um escore utilizado como indicativo de nocicepção espontânea). A hipersensibilidade e a nocicepção espontânea detectadas neste modelo foram diminuídas pela administração aguda de AINEs ou opioides e por um agonista canabinoide. A dor induzida por câncer é caracterizada por sintomas patológicos, como hipersensibilidade mecânica e térmica (PEUCKMANN et al., 2009; SARABIA-ESTRADA et al., 2017).

Assim, no primeiro estudo publicado foi identificado que camundongos inoculados com células tumorais desenvolvem alodínia mecânica e ao frio. Estes comportamentos foram detectados usando o teste de von Frey e o teste da acetona, respectivamente. O desenvolvimento de alodínia mecânica e ao frio também foi observado em outros modelos de dor induzida por câncer em camundongos e ratos (HIASA et al., 2017; LOZANO-ONDOUA et al., 2013; SLOSKY; LARGENT-MILNES; VANDERAH, 2015). De fato, após o implante femoral das células de carcinoma mamário 4T1, observou-se a ocorrência de comportamentos relacionados à dor, alodínia mecânica e ao frio (ABDELAZIZ; STONE; KOMAROVA, 2014; LOFGREN et al., 2018; MILADINOVIC et al., 2018; ZWOLAK et al., 2008). Além disso, neste estudo detectou-se o aparecimento de nocicepção espontânea causada pela inoculação de células cancerígenas utilizando a medida de escore facial (MGS), que é um dado relevante, porque tanto a alodínia mecânica como ao frio são medidas de testes reflexivos. A medida de escore facial tem emergido como um recurso útil para detectar nocicepção espontânea em modelos de dor (AKINTOLA et al., 2017; TUTTLE et al., 2018).

Neste modelo, a detecção de alodínia mecânica e nocicepção espontânea ocorreu no dia 10 após o implante de células tumorais, e este período precede o desenvolvimento de metástase óssea; isso pode ser causado por perda óssea inicial e osteoclastogênese que vêm em primeiro lugar neste modelo e são mediadas por citocinas pró-osteoclastogênicas (MONTEIRO et al., 2013). Algumas dessas citocinas,

como IL-17 e RANKL, já foram descritas como mediadoras de dor em modelos de artrite e dor do câncer em ratos (DAI et al., 2018; HONORE et al., 2000; LIPTON; GOESSL, 2011; MCCARTY; DINICOLANTONIO, 2016; PANIS; PAVANELLI, 2015; REMENIUK et al., 2018; TAKAHASHI et al., 2015).

Após 2-3 semanas de injeção de células tumorais na glândula mamária, foi observado a presença de metástase óssea, pois as células 4T1 possuem um comportamento invasivo (BOTTOS et al., 2016; COX et al., 2015; LELEKAKIS et al., 1999; MALL et al., 2016; MONTEIRO et al., 2013; PEREIRA et al., 2016; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Considerando isso, o 20º dia após a injeção das células tumorais foi escolhido para descrever a presença de metástase óssea. É importante ressaltar que, neste dia, os animais também apresentaram nocicepção. Utilizando um ensaio clonogênico metastático, foi detectado clones metastáticos na medula óssea ilíaca, e estes dados estão de acordo com a literatura (MONTEIRO et al. 2013) onde a proliferação de células metastáticas foi observada em diferentes regiões de camundongos (ABU et al., 2015; DUPRÉ; REDELMAN; HUNTER, 2007) mostrando o potencial metastático desta linhagem celular.

Além disso, foi observado aumento dos níveis plasmáticos de cálcio nos animais que apresentaram metástase óssea. Já foi demonstrado que as células de câncer de mama que foram implantadas em camundongos estavam relacionadas ao desenvolvimento de hipercalcemia (LELEKAKIS et al., 1999). Este aumento dos níveis de cálcio plasmáticos é consistente com o que ocorre com pacientes com câncer de mama com metástase óssea (YONG et al., 2011). À medida que o câncer ósseo metastático se desenvolve, ele traz respostas nociceptivas e inflamatórias devido à compressão do nervo pelo tumor, isquemia e liberação de vários mediadores que podem atuar sobre as fibras aferentes. Assim, células ósseas e células cancerígenas iniciam uma cascata de mecanismos, incluindo ativação e sensibilização de nociceptores, que auxiliam no processo de dor e sensibilização central (DORÉ-SAVARD et al., 2010; MANTYH et al., 2002; ZHU et al., 2015).

Para o controle da dor a OMS indica o uso de uma escala analgésica descrevendo passo a passo, através de uma hierarquia de fármacos, quais medicamentos analgésicos devem ser utilizados para cada estágio da dor do câncer em geral associada ao uso de adjuvante analgésico (BALLANTYNE; KALSO; STANNARD, 2016; CURRIE et al., 2014; DERRY et al., 2017; ORGANIZATION, 1986; VARRASSI et al., 2018). Assim, foi optado por testar diferentes analgésicos neste

modelo de dor oncológica, utilizando drogas presentes na escala analgésica (AINEs e opioides). Todas as drogas testadas tiveram efeito antinociceptivo neste modelo, mas o paracetamol não reduziu a alteração de escore facial. Como esperado, o tratamento com morfina apresentou o melhor perfil antinociceptivo quando comparado ao paracetamol, naproxeno ou codeína. O efeito antinociceptivo da morfina em modelos de nocicepção induzidos pelo câncer é bem descrito (RIGO et al., 2013; XU et al., 2016), e este agonista opioide é frequentemente utilizado na clínica para tratar a dor severa mediada pelo câncer (SWARM et al., 2019). Entretanto, com a progressão da doença é comum observar pacientes com dor intratável ou que sofrem com os efeitos adversos dos opioides, como hiperalgesia e constipação (VANDERAH et al., 2000; VARRASSI et al., 2018).

Os diferentes mecanismos envolvidos na dor do câncer não são adequadamente descritos, mas o papel dos receptores canabinoides tem sido relacionado a diferentes modelos de dor do câncer (LOZANO-ONDOUA et al., 2013; UHELSKI et al., 2013). Os receptores canabinoides são expressos em fibras neuronais aferentes, células imunes (como monócitos, células T, células B) e ósseas (osteoblastos e osteoclastos) e, quando ativados, podem causar efeito antinociceptivo, atenuar a dor do câncer ósseo e diminuir a metástase óssea (LOZANO-ONDOUA et al., 2010; UHELSKI et al., 2013). Já foi relatado que a atenuação da hiperalgesia mecânica pelo agonista WIN 55,212-2 parece estar relacionada à redução da atividade espontânea em nociceptores (fibra C) que podem diminuir a condução de estímulos para manter a sensibilização de neurônios nociceptivos do corno dorsal e uma diminuição nas respostas de fibras C evocadas por estímulos mecânicos (UHELSKI et al., 2013).

Desta forma, também foi testado neste modelo de dor do câncer um agonista canabinoide (WIN 55,212-2) que já apresentou efeito antinociceptivo em um modelo de dor do câncer causada pela injeção de células 66.1 ou células de sarcoma CCL-11 no osso, ambas linhagens de células de câncer de mama (LOZANO-ONDOUA et al., 2010, 2013). No presente estudo, o agonista canabinoide mostrou redução da alodínia mecânica e ao frio, e dor espontânea. Como já demonstrado em um modelo de dor do câncer em camundongos, é provável que a ativação do receptor canabinoide atenuar as respostas dos nociceptores da fibra C e reduza a dor do câncer ósseo por inibir a liberação de substâncias inflamatórias que ativam e sensibilizam os nociceptores (UHELSKI et al., 2013). Ainda, em um estudo mais recente, foi

demonstrado que outro composto (MJN110), inibidor da monoacilglicerol lipase, é capaz de aumentar a produção endógena de 2-araquidonilglicerol, ativando receptores CB1 e CB2, e inibindo a dor (THOMPSON et al., 2020). Também já foi relatado a interação entre o WIN 55,212-2 e o TRPA1 (AKOPIAN et al., 2008; KOCH et al., 2011), mostrando a capacidade do agonista canabinoide em ativar o TRPA1, levando a dessensibilização das respostas nociceptivas de agonistas TRPA1 e assim apresentando efeito antinociceptivo (AKOPIAN et al., 2008). Ainda, é interessante que outro mecanismo do agonista canabinoide relacionado a receptores TRPs, onde suas baixas concentrações são capazes de mediar respostas anti-inflamatórias via TRP (LOWIN, PONGRATZ e STRAUB, 2016), já foi discutido, e provavelmente isso se deve a sua capacidade de dessensibilizar estes canais. Dessa forma, é possível observar que a inativação de canais TRPs, como o TRPA1 e a ativação de receptores canabinoides, ambos via tratamento com o agonista canabinoide WIN 55,212-2, é interessante para a diminuição da nocicepção. Com isso, observa-se a importância do sistema endocanabinoide na atenuação da dor do câncer em modelos animais.

O modelo caracterizado neste trabalho pode ser uma forma confiável para observar os mecanismos da dor induzida por câncer de mama ou para observar a eficácia de novos compostos analgésicos e outros mecanismos. Desta maneira o envolvimento do TRPA1 foi avaliado neste processo de dor, pois o esse receptor foi descrito como envolvido na indução e manutenção da dor neuropática (BUEHLMANN et al., 2018; FUSI et al., 2014; MATERAZZI et al., 2012; NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013; RIGO et al., 2013; YOON; OH, 2018). Consequentemente, se a ativação do TRPA1 também estiver envolvida na dor do câncer, o tratamento com antagonistas do TRPA1 poderia ser empregado para controlar a dor do câncer e a dor neuropática induzida por quimioterapia, que geralmente estão presentes em pacientes com câncer (BUEHLMANN et al., 2018; YOON; OH, 2018). Além disso, em um estudo recente, foi demonstrado que o TRPA1 também está envolvido na dor do câncer em um modelo de melanoma metastático em camundongos (ANTONIAZZI et al., 2019).

Nessa visão, o papel do TRPA1 foi explorado na nocicepção observada em um modelo de câncer de mama em camundongos, utilizando ferramentas farmacológicas e genéticas. Os dados deste estudo mostraram que o TRPA1 está envolvido na hipersensibilidade mecânica e ao frio e na alteração do escore facial induzidos pela inoculação do tumor em camundongos em um modelo de inoculação de células de câncer de mama na glândula mamária dos animais. Estes resultados foram

confirmados utilizando a administração intragástrica de antagonistas de TRPA1 (HC-030031 e A-967079) e por injeção de oligonucleotídeo anti-sentido para TRPA1. Ainda, foi observado um aumento na produção de H₂O₂ (um agonista do TRPA1) nos tecidos avaliados, o que poderia manter a ativação/sensibilização do TRPA1 neste modelo.

Primeiro, foi detectado que a administração de antagonistas do TRPA1 de forma intragástrica (HC-030031 e A-967079) reduziu a hipersensibilidade mecânica e ao frio e o escore facial nos camundongos. Esses antagonistas foram injetados em doses comumente usadas para testar o papel do TRPA1 em modelos de dor em camundongos (NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013, 2016). Além disso, o papel do TRPA1 já foi investigado na indução da dor neuropática trigeminal e periférica após lesão nervosa (DE LOGU et al., 2017; TREVISAN et al., 2016), dor inflamatória (PEREIRA et al., 2017) e enxaqueca (BENEMEI et al., 2014). Assim, os antagonistas do TRPA1 são descritos como medicamentos potenciais para o controle da dor crônica (BENEMEI et al., 2014; MORAN; SZALLASI, 2018).

Os resultados obtidos utilizando antagonistas de TRPA1 foram confirmados utilizando-se a injeção intratecal de oligonucleotídeo anti-sentido de TRPA1 (AS). A injeção de TRPA1 AS reduziu o desenvolvimento de nocicepção induzida pela dor do câncer e o comportamento relacionado com a dor espontânea. Esses dados estão de acordo com aqueles observados para o modelo de dor causado pela administração de células de melanoma (ANTONIAZZI et al., 2019). Considerando os dados obtidos pela administração de antagonistas de TRPA1 e a injeção de oligonucleotídeo anti-sentido de TRPA1, parece que a ativação de TRPA1 é importante para a nocicepção neste modelo de dor do câncer de mama.

O TRPA1 é um sensor conhecido para compostos reativos, como acroleína e 4-HNE (SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020). Assim, o canal TRPA1 poderia ser ativado ou sensibilizado neste modelo de dor por câncer metastático por um agonista endógeno, como o H₂O₂. Sabe-se que sua produção tem sido associada à ativação do TRPA1 em modelos neuropáticos e inflamatórios de dor (DE LOGU et al., 2017; SUGIYAMA et al., 2018; TREVISAN et al., 2014, 2016). De fato, os níveis de H₂O₂ foram aumentados nos camundongos 20 dias após a inoculação do tumor, e a atividades da NADPH oxidase e da SOD também aumentaram, um fator que poderia impulsionar o aumento da produção de H₂O₂ (VIANA, 2016). Além disso, foi descrito que espécies reativas de oxigênio poderiam estar envolvidas no desenvolvimento da

dor do câncer, mas não foi indicado um potencial receptor que pudesse ser bloqueado por compostos reativos envolvidos na dor do câncer (ZHOU et al., 2018). Ainda, apoiando estes achados, a atividade aumentada da NADPH oxidase já foi demonstrada em um modelo de tumor de mama em camundongos (RABBANI et al., 2010). É importante salientar que os níveis destes compostos se apresentaram aumentados também nos ossos dos animais, o que poderia estar associado com o desenvolvimento de dor óssea proveniente do desenvolvimento de metástases. Pouco se sabe sobre isso, mas um aumento na atividade da SOD já foi demonstrado em ossos de ratos (tíbia e fêmur), em ovariectomia e em modelo de diabetes mellitus tipo 1 (RIVOIRA et al., 2018; YANG et al., 2014). Entretanto, a expressão proteica do TRPA1 não foi observada no tecido ósseo neste modelo. Isso pode estar de acordo com outros achados, por experimentos utilizando uma plataforma de Sequence Read Archive (SRA), onde a expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 em nível transcricional não está presente em linhagem de células ósseas de camundongos.

Além disso, um composto antioxidante (ácido α -lipoico) apresentou efeito antinociceptivo e reduziu os parâmetros de escore facial no modelo estudado, reforçando o envolvimento de substâncias reativas nesse modelo de dor. Foi previamente demonstrado que a injeção aguda de ácido α -lipoico induziu um efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática induzida por quimioterápico e dor neuropática induzida por lesão nervosa (DE LOGU et al., 2017; TREVISAN et al., 2013, 2016), revelando o papel de compostos reativos na dor neuropática. Também, já foi relatado que o tratamento com HC-030031 ou ácido α -lipoico por injeção intraplantar diminuiu os parâmetros de nocicepção em um modelo de neuropatia causada pela administração de bortezomib (TREVISAN et al., 2013). Embora este mesmo efeito ainda não tenha sido descrito em relação à dor do câncer ósseo, aqui observamos que o tratamento local com o antagonista do TRPA1 e o antioxidante produzem analgesia em um modelo de dor do câncer com metástase óssea. Com esses resultados em torno do efeito antinociceptivo do composto antioxidante e todas as pesquisas já mencionadas, torna-se interessante ressaltar que o receptor TRPA1 pode ser ativado por espécies reativas de oxigênio, como é o caso do H_2O_2 . Esta substância endógena origina-se do radical superóxido, que além de ser uma espécie reativa de oxigênio, é considerado também um radical livre, que pode ter seu efeito suprimido no organismo através da ação de compostos antioxidantes. Dessa forma, a ação do composto antioxidante analisado está intimamente relacionada com a

diminuição da ativação do TRPA1 por seus compostos endógenos, como o H₂O₂. Finalmente, todos esses achados indicaram que o TRPA1 participa dos mecanismos de dor do câncer.

Também, foi investigado se o uso de um antagonista de TRPA1 ou do composto antioxidante poderia reduzir a toxicidade do paclitaxel em células 4T1 utilizando o ensaio MTT. O paclitaxel é um composto comumente utilizado para o tratamento do câncer de mama e tem como efeito adverso a indução de neuropatia periférica (GRIFFITHS et al., 2018). Verificou-se que o HC-030031 ou o ácido α -lipoico não causaram efeito citotóxico. Além disso, a associação do antagonista TRPA1 não alterou o efeito do quimioterápico na viabilidade celular, mas a associação entre o antioxidante e o paclitaxel apresentou alteração no resultado. Entretanto, já foi observado que esta alteração pode ocorrer pelo fato de substâncias com poder antioxidante inibirem a formação de radicais livres nas células tumorais, inibindo dessa forma a apoptose destas células, diminuindo a sensibilidade do medicamento quimioterápico (SALGANIK, 2001). Porém, ainda notamos que mesmo com a pequena redução da viabilidade celular entre a associação do paclitaxel e do antioxidante, o quimioterápico continuou tendo efeito significativo sobre a viabilidade das células tumorais. Sabe-se que o poder dos quimioterápicos para o tratamento do câncer é valioso pelo fato de reduzir a viabilidade das células tumorais. Entretanto, a utilização destas drogas leva os pacientes a desenvolver sintomas dolorosos como a neuropatia periférica (GRIFFITHS et al., 2018). Estudos já demonstraram a relação do aparecimento da dor pela ativação do receptor TRPA1 com o uso de quimioterápicos em camundongos (MATERAZZI et al., 2012). Foi relatado que a injeção sistêmica de bortezomib aumentou a alodínia mecânica e ao frio e que o bloqueio do receptor TRPA1 atenuou estes comportamentos de dor (TREVISAN et al., 2013). Além disso, já foi descrito que a neuropatia periférica induzida por paclitaxel foi parcialmente reduzida por um antagonista de TRPA1 (HC-030031) (MATERAZZI et al., 2012).

O câncer de mama com metástase óssea afeta mulheres em todo o mundo e é responsável pelo aparecimento de dor que pode evoluir para dor persistente e intensa, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (BROOK et al., 2018; LIEPE, 2018). Nesses casos, a utilização prolongada de medicamentos analgésicos, como os opioides, é uma das formas de tratar a dor. Entretanto, sabe-se que isso leva ao aparecimento de inúmeros efeitos adversos (GEORGE et al., 2019). Assim, foi

observado se o antagonismo do TRPA1, por um período prolongado, poderia desenvolver um efeito antinociceptivo por mais tempo. Com isso, foi relatado que o tratamento com doses repetidas de HC-030031 manteve seu efeito antinociceptivo, demonstrando potencial terapêutico para pacientes que sofrem com dor do câncer ósseo. Os mecanismos relacionados a este fato ainda precisam ser elucidados nos próximos estudos, mas uma hipótese pode ser o fato de o uso repetido por dias de um antagonista TRPA1 levar a dessensibilização do receptor, ou ainda, outra hipótese pode ser que o tratamento repetido pode ter uma ação anti-inflamatória, diminuindo agonistas endógenos do receptor, levando a um efeito antinociceptivo prolongado. Além desse achado, foi demonstrado anteriormente que o bloqueio do TRPA1 foi capaz de atenuar a tolerância induzida pela administração repetida de morfina em ratos (WEI et al., 2016).

Apesar de não ter sido observada a expressão proteica do TRPA1 nos ossos dos animais, e não a encontrar em nível transcricional, foi possível verificar nos experimentos SRA a presença do TRPV4 em células de tecido ósseo de camundongos. Isso torna-se importante pelo fato deste receptor já ter sido relacionado ao desenvolvimento de dor oncológica e sua expressão proteica ter sido relatada em tecido ósseo de camundongos em modelos de dor do câncer (MAQBOUL; ELSADEK, 2018; SO; MILEVSKIY; MONTEITH, 2020). Isso, deixa uma lacuna interessante para o desenvolvimento de novas pesquisas relacionadas aos TRPs e a dor do câncer ósseo. Apesar destes últimos achados em tecido ósseo, isso não invalida a relação do TRPA1 com a dor do câncer, já que as pesquisas presentes neste trabalho vêm de encontro a outros estudos, que já demonstraram a relação do TRPA1 com o desenvolvimento de dor durante o desenvolvimento de câncer ósseo (ZHAO et al., 2019).

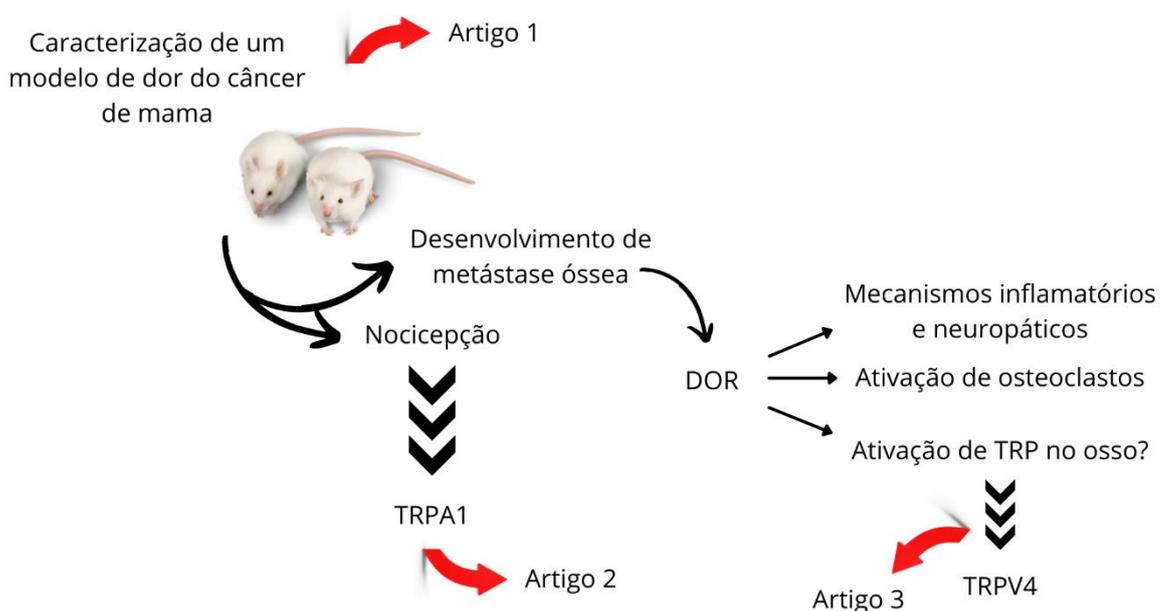
A avaliação da nocicepção em um modelo de câncer de mama em camundongos mostrou a presença de hipersensibilidade mecânica e ao frio e alteração no escore facial, medidas que poderiam ser utilizadas para testar o efeito antinociceptivo dos compostos em estudo. Além disso, neste modelo de dor induzida por câncer, foi detectado o efeito antinociceptivo dos analgésicos usados clinicamente, seguindo a escala analgésica da OMS. Infelizmente, o melhor tratamento atual em uso são os opioides, que causam inúmeros efeitos adversos (CANDIDO; KUSPER; KNEZEVIC, 2017; GEORGE et al., 2019; XU et al., 2016).

Assim, novas estratégias para o tratamento da dor do câncer devem ser buscadas, encontrando novos alvos que estão relacionados ao desenvolvimento da

dor. Dessa forma, foi verificado também que um agonista canabinoide reduziu a nocicepção neste modelo de câncer e mama metastático em camundongos, mostrando a importância dos receptores canabinoides para a sensibilização mediada por câncer. Além disso, é notável uma alta contribuição do TRPA1 no desenvolvimento da dor do câncer de mama, tanto na alodínia mecânica e ao frio quanto na nocicepção espontânea, que são as condições mais problemáticas da dor do câncer (EVERDINGEN et al., 2007; MAGEE et al., 2019). A busca pelo entendimento do mecanismo da dor do câncer com o receptor TRPA1, baseado nesta pesquisa, também levou a publicação de um artigo de revisão abordando a relação dos TRPs com a dor do câncer (DE ALMEIDA et al., 2021), e ainda a escrita de um capítulo de livro sobre este mesmo tema. Isso mostra a importância de estudar novos alvos, como o TRPA1, para o tratamento deste sintoma.

O bloqueio do TRPA1 por seus antagonistas, tanto em tratamento agudo ou em tratamento com doses repetidas, e até mesmo a atenuação da dor por um composto antioxidante, mostra a existência de possíveis novas estratégias terapêuticas para a melhora da dor do câncer de mama com metástase óssea. Além disso, estes achados abrem um novo caminho para a busca de tratamentos analgésicos relacionados a dor do câncer ósseo em relação a outros cânceres capazes de produzir metástase óssea, como câncer de próstata e câncer de pulmão.

RESUMO GRÁFICO DA TESE



6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

1. Foi observado o desenvolvimento de nocicepção (alodínia mecânica e ao frio e alteração do escore facial) em um modelo de dor do câncer com metástase óssea;
2. Através do ensaio de clonogênico e da presença de hipercalcemia foi detectado a presença de metástase óssea proveniente da inoculação de células 4T1 na glândula mamária de camundongos fêmeas;
3. Os compostos disponíveis na clínica, como paracetamol, naproxeno, codeína e morfina, bem como um agonista canabinoide, apresentaram efeito antinociceptivo em um modelo de dor do câncer de mama;
4. Os antagonistas do receptor TRPA1 (HC-030031 e A-967079) mostraram efeito antinociceptivo em um modelo de dor do câncer de mama, também a administração intraplantar de HC-030031 reduziu a hipersensibilidade neste modelo;
5. A administração intratecal de oligonucleotídeo antisentido para o receptor TRPA1 mostrou a diminuição de parâmetros nociceptivos em um modelo de dor do câncer de mama, comprovando o envolvimento deste receptor neste modelo de dor;
6. O desenvolvimento de hiperalgesia química através de um agonista de TRPA1 após a indução de nocicepção neste modelo de dor do câncer foi observada, e foi diminuída com a administração de um antagonista de TRPA1 (HC-030031), comprovando mais uma vez o envolvimento deste receptor neste modelo de dor;

7. Foi observado o aumento da atividade da enzima NADPH oxidase e dos níveis de peróxido de hidrogênio, bem como o aumento na atividade da SOD na pele da pata e no nervo ciático após 20 dias da inoculação das células tumorais;
8. A administração de um composto antioxidante (ácido α -lipoico) por via intragástrica ou intraplantar apresentou efeito antinociceptivo neste modelo de dor do câncer de mama;
9. O uso dos compostos HC-030031 e ácido α -lipoico *in vitro* não alterou a viabilidade celular das células 4T1 ou modificou o efeito citotóxico do quimioterápico paclitaxel;
10. As células 4T1 não apresentam expressão do receptor TRPA1;
11. Existe produção de peróxido de hidrogênio, bem como aumento da produção de NADPH e SOD em tecido ósseo de animais submetidos a este modelo de dor do câncer;
12. O tratamento com doses repetidas utilizando um antagonista do TRPA1 teve efeito antinociceptivo;
13. A expressão do receptor TRPA1 no tecido ósseo após a indução de nocicepção em um modelo de câncer não foi alterada;
14. Não há expressão proteica de TRPA1 em tecido ósseo de camundongos, entretanto existem evidências da presença de TRPV4.

Todas as evidências aqui apresentadas demonstram a relação do receptor TRPA1 no desenvolvimento de nocicepção em um modelo de dor do câncer de mama com metástase óssea. Cabe ressaltar que o modelo estudado é mais fidedigno ao que ocorre na clínica, demonstrando que, através de mais estudos, este receptor pode ser um alvo farmacológico para o tratamento desta patologia.

7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista a relação do receptor estudado, TRPA1, com o desenvolvimento de dor em um modelo de câncer de mama com metástase óssea, a continuidade dos estudos deve seguir para que os antagonistas TRPA1 possam ser, futuramente, utilizados como alvo terapêuticos para o tratamento da dor do câncer. Além disso, foi observado que o TRPV4 também pode possuir relação com a dor do câncer ósseo, além de estar presentes nesse tecido. Assim, mais pesquisas que envolvam este receptor são necessárias, para que mais alvos terapêuticos sejam estudados, e dessa forma, sejam desenvolvidos melhores medicamentos para a dor do câncer.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, D. M.; STONE, L. S.; KOMAROVA, S. V. Osteolysis and pain due to experimental bone metastases are improved by treatment with rapamycin. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 143, n. 2, p. 227–237, 2014.
- ABU, N. et al. In vivo antitumor and antimetastatic effects of flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 1401-1407, 2015.
- AHMAD, I. et al. Pain Management in Metastatic Bone Disease: A Literature Review. **Cureus**, v. 10, n. 9, 2018.
- AKINTOLA, T. et al. Neurobiology of Pain The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. **Neurobiology of Pain**, v. 2, p. 13–17, 2017.
- AKOPIAN, A. N. et al. Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1064-1075, 2008.
- ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 133, p. 189–204, 2012.
- ANEKAR, A. A.; CASCELLA, M. WHO Analgesic Ladder. **StatPearls [Internet]**. 2021.
- ANTONIAZZI, C. T. D. D. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 2, p. 355–365, 2019.
- BAAMONDE, A. et al. Antihyperalgesic effects induced by the IL-1 receptor antagonist anakinra and increased IL-1 β levels in inflamed and osteosarcoma-bearing mice. **Life Sciences**, v. 81, p. 673–682, 2 ago. 2007.

BAI, J. Z.; LIPSKI, J. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. **NeuroToxicology**, v. 31, p. 204–214, 2010.

BALLANTYNE, J. C.; KALSO, E.; STANNARD, C. WHO analgesic ladder: A good concept gone astray. **BMJ (Online)**, v. 352, p. i20, 2016.

BANDELL, M. et al. Three other TRPV ion channels with distinct thresholds (mTRPA1) show a sharp increase in intracellular calcium. **Neuron**, v. 41, p. 849–857, 2004.

BARALDI, P. G. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 5085–5107, 2010.

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

BEDNARZ-KNOLL, N.; ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. **Breast Cancer Research**, v. 13, p. 228, 2011.

BELL, A. The neurobiology of acute pain. **Veterinary Journal**, v. 237, p. 55–62, 2018.

BENEMEI, S. et al. The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 2552-2567, 2014.

BENÍTEZ-ANGELES, M. et al. TRPV1: Structure, endogenous agonists, and mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1–18, 2020.

BIEHLER-GOMEZ, L.; GIORDANO, G.; CATTANEO, C. Journal of Forensic and Legal Medicine The appearance of breast cancer metastases on dry bone: Implications for forensic anthropology. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 61, p. 5–12, 2019.

BILIR, K. A. et al. Involvement of spinal cannabinoid receptors in the antipruritic effects of WIN 55,212-2, a cannabinoid receptor agonist. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 43, p. 553–558, 2018.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020.

BLOOM, A. P. et al. Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. **Journal of Pain**, v. 12, p. 698–711, 2011.

BOKHARI, F.; SAWATZKY, J. A. V. Chronic Neuropathic Pain in Women After Breast Cancer Treatment. **Pain Management Nursing**, v. 10, p. 197–205, 2009.

BOTTOS, A. et al. Decreased NK-cell tumour immunosurveillance consequent to JAK inhibition enhances metastasis in breast cancer models. **Nature Communications**, v. 7, p. 12258, 2016.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394–424, 2018.

BROOK, N. et al. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 96, p. 63–78, 2018.

BRUERA, E.; PAICE, J. A. Cancer Pain Management: Safe and Effective Use of Opioids. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 35, p. e593–e599, 2015.

BRUSCO, I. et al. Dacarbazine alone or associated with melanoma-bearing cancer pain model induces painful hypersensitivity by TRPA1 activation in mice. **International Journal of Cancer**, v. 146, p. 2797–2809, 2020.

BUEHLMANN, D. et al. Longitudinal resting-state fMRI in a mouse model of metastatic bone cancer reveals distinct functional reorganizations along a developing chronic pain state. **Pain**, v. 159, p. 719-727, 2018.

BUJAK, J. K. et al. Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–16, 2019.

BURKE, R. E. Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: A centenary appreciation. **Brain**, v. 130, p. 887–894, 2007.

BURRELL, B. D. Comparative biology of pain: What invertebrates can tell us about how nociception works. **Journal of Neurophysiology**, v. 117, p. 1461–1473, abr. 2017.

CANDIDO, K. D.; KUSPER, T. M.; KNEZEVIC, N. N. New Cancer Pain Treatment Options. **Current Pain and Headache Reports**, v. 21, p. 12, 2017.

CAPPARIELLO, A. et al. The Great Beauty of the Osteoclast. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 558, p. 70-78, 2014.

CHAVES, G. P. Sistema Canabinóide e seu Possível Papel em Processos de Neuroproteção e Plasticidade: Estudos in vivo e in vitro. **Catálogo USP**, 2008.

CHEN, J. et al. Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. **BioScience Trends**, v. 8, p. 1–10, 2014.

COX, T. R. et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. **Nature**, v. 522, p. 106-110, 2015.

CURRIE, G. L. et al. Animal models of bone cancer pain: Systematic review and meta-analyses. **Pain**, v. 154, p. 917–926, 2013.

CURRIE, G. L. et al. Using animal models to understand cancer pain in humans. **Current Pain and Headache Reports**, v. 18, p. 423, 2014.

DAI, X.-J. et al. Changes of Treg/Th17 Ratio in Spleen of Acute Gouty Arthritis Rat Induced by MSU Crystals. **Inflammation**, v. 41, p. 1955-1964, 2018.

DE ALMEIDA, et al. TRP channels in cancer pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 904, 2021.

DE LOGU, F. DE et al. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–16, 2017.

DE LOGU, F. et al. Trpa1 expression in synovial sarcoma may support neural origin. **Biomolecules**, v. 10, p. 1–13, 2020a.

DE LOGU, F. et al. Macrophages and Schwann cell TRPA1 mediate chronic allodynia in a mouse model of complex regional pain syndrome type I. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 88, p. 535–546, 2020b.

DELAISSÉ, J. M. et al. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 504–513, 2003.

DERRY, S. et al. Oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs for fibromyalgia in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 3, 2017.

DESANTANA, J. M. et al. Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. **Iasp**, p. 1–8, 2020.

DESANTIS, C. et al. Breast Cancer Statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 64, 2014.

DHOPESHWARKAR, A.; MACKIE, K. CB2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target--What Does the Future Hold? **Molecular Pharmacology**, v. 86, p. 430–437, 2014.

DING, Z. et al. Normalizing GDNF expression in the spinal cord alleviates cutaneous hyperalgesia but not ongoing pain in a rat model of bone cancer pain. **International Journal of Cancer**, v. 140, p. 411–422, 15 jan. 2017.

DORÉ-SAVARD, L. et al. Behavioral, Medical Imaging and Histopathological Features of a New Rat Model of Bone Cancer Pain. **PLoS ONE**, v. 5, p. e13774, 2010.

DUBE, G.; ELAGOZ, A.; MANGAT, H. Acid Sensing Ion Channels and Acid Nociception. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 1750–1766, 2009.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3760–3772, nov. 2010.

DUPRÉ, S. A.; REDELMAN, D.; HUNTER, K. W. The mouse mammary carcinoma 4T1: Characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 351-360, 2007.

ELOY, J. O. et al. Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 159–167, 2017.

ERDOGAN, B.; CICIN, I. Medical Treatment of Breast Cancer Bone Metastasis: From Bisphosphonates to Targeted Drugs. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 4, p. 1503–1510, 2014.

EVERDINGEN, M. H. J. V. D. B. et al. High prevalence of pain in patients with cancer in a large population-based study in The Netherlands. **Pain**, v. 132, p. 312–320, 2007.

FALK, S.; DICKENSON, A. H. Pain and nociception: Mechanisms of cancer-induced bone pain. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 1647–1654, 2014.

FATTORI, V. et al. Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. **Molecules**, v. 21, p. 1–33, 2016.

FELLER, L. et al. Pain: Persistent postsurgery and bone cancer-related pain. **Journal of International Medical Research**, v. 47, p. 528–543, 2019.

FERNÁNDEZ-CARVAJAL, A. et al. Investigational drugs in early phase clinical trials targeting thermotransient receptor potential (thermoTRP) channels. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 29, p. 1209–1222, 2020.

FLATTERS, S. J. L.; DOUGHERTY, P. M.; COLVIN, L. A. Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review. **British Journal of Anaesthesia**, v. 119, p. 737–749, out. 2017.

FRAGUAS-SÁNCHEZ, A. I.; TORRES-SUÁREZ, A. I. Medical Use of Cannabinoids. **Drugs**, v. 78, p. 1665-1703, 2018.

FUSI, C. et al. Steroidal and non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

FUTAKUCHI, M.; FUKAMACHI, K.; SUZUI, M. Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: Mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 206–211, 2016.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **BBA - Reviews on Cancer**, v. 1796, p. 293–308, 2009.

GEORGE, B. et al. Opioids in cancer-related pain: current situation and outlook. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, p. 3105–3118, 2019.

GOBLIRSCH, M. J.; ZWOLAK, P.; CLOHISY, D. R. Advances in understanding bone cancer pain. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, p. 682-688, 2005.

GOODMAN, O. B. et al. Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, p. 1904–1913, 2009.

GRIFFITHS, L. A. et al. Evoked and Ongoing Pain-Like Behaviours in a Rat Model of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. **Pain Research and Management**, v.

2018, 2018.

GU, X. P. et al. Intrathecal administration of the cannabinoid 2 receptor agonist JWH015 can attenuate cancer pain and decrease mRNA expression of the 2B subunit of N-methyl-D-aspartic acid. **Anesthesia and Analgesia**, v. 113, p. 405–411, 2011.

GUERRA LIBERAL, F. D. C.; TAVARES, A. A. S.; TAVARES, J. M. R. S. Palliative treatment of metastatic bone pain with radiopharmaceuticals: A perspective beyond Strontium-89 and Samarium-153. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 110, p. 87–99, 2016.

GUISE, T. A. Breast cancer bone metastases: It's all about the neighborhood. **Cell**, v. 154, p. 957–958, 2013.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, 2019.

HAVELIN, J. et al. Mediation of movement-induced breakthrough cancer pain by IB4-binding nociceptors in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 37, p. 5111–5122, 2017.

HENSON, L. A. et al. Palliative care and the management of common distressing symptoms in advanced cancer: Pain, breathlessness, nausea and vomiting, and fatigue. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, p. 905–914, 2020.

HEO, M. H. et al. Analgesic effect of quetiapine in a mouse model of cancer-induced bone pain. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 32, p. 1069–1074, 2017.

HIASA, M. et al. Bone pain induced by multiple myeloma is reduced by targeting V-ATPase and ASIC3. **Cancer Research**, v. 77, p. 1283–1295, 2017.

HONORE, P. et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. **Nature Medicine**, v. 6, p. 521-528, 2000.

HUI, D.; BRUERA, E. A personalized approach to assessing and managing pain in

patients with cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 1640-1646, 2014.

JIMENEZ-ANDRADE, J. M. et al. Preventive or late administration of anti-NGF therapy attenuates tumor-induced nerve sprouting, neuroma formation, and cancer pain. **Pain**, v. 152, p. 2564–2574, 2011.

JULIUS, D. TRP Channels and Pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 355–384, 2013.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanism of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

KANEKO, Y.; SZALLASI, A. Transient receptor potential (TRP) channels: A clinical perspective. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 2474–2507, 2014.

KOCH, M. et al. The cannabinoid WIN 55, 212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels. **Hippocampus**, v. 21, p. 554-564, 2011.

KOLB, A. D. et al. Osteoblasts are “educated” by crosstalk with metastatic breast cancer cells in the bone tumor microenvironment 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology 11 Medical and Health . **Breast Cancer Research**, v. 21, p. 1–30, 2019.

KOSEK, E. et al. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? **Pain**, v. 157, p. 1382–1386, 2016.

KREMEYER, B. et al. A Gain-of-Function Mutation in TRPA1 Causes Familial Episodic Pain Syndrome. **Neuron**, v. 66, p. 671–680, 2010.

LACHGAR, A.; SAHLI, N.; BENJAAFAR, N. Éxacerbation De La Douleur Après La Radiothérapie Externe Antalgique: Étude Prospective De 41 Cas. **Cancer/Radiotherapie**, v. 21, p. 373–376, 2017.

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 47, p. 173–180, 2020.

LEFAUCHEUR, J. P. Clinical neurophysiology of pain. **Handbook of Clinical Neurobiology**, v. 161, p. 121-148, 2019.

LEIBBRANDT, A.; PENNINGER, J. M. RANK(L) as a key target for controlling bone loss. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 647, p. 130–145, 2009.

LELEKAKIS, M. et al. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 17, p. 163-170, 1999.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 989–1003, 2007.

LIBERATI, S. et al. Oncogenic and Anti-Oncogenic Effects of Transient Receptor Potential Channels. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 344–366, 2013.

LIEPE, K. 188 Re-HEDP therapy in the therapy of painful bone metastases. **World Journal of Nuclear Medicine**, v. 17, p. 133, 2018.

LIPTON, A.; GOESSL, C. Clinical development of anti-RANKL therapies for treatment and prevention of bone metastasis. **Bone**, v. 48, p. 96-99, 2011.

LIU, W. C. et al. Multidimensional Treatment of Cancer Pain. **Current Oncology Reports**, v. 19, p. 10, 2017.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473–7, jul. 2008.

LOFGREN, J. et al. Analgesics promote welfare and sustain tumour growth in orthotopic 4T1 and B16 mouse cancer models. **Lab Animal**, v. 52, p. 351-364, 2018.

LOZANO-ONDOUA, A. N. et al. A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. **Life Sciences**, v. 86, p. 646-653, 2010.

LOZANO-ONDOUA, A. N. et al. Disease modification of breast cancer-induced bone remodeling by cannabinoid 2 receptor agonists. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, p. 92–107, 2013.

LOZANO-ONDOUA, A. N.; SYMONS-LIGUORI, A. M.; VANDERAH, T. W. Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models. **Neuroscience Letters**, v. 557, p. 52–59, 2013.

LOWIN, T.; PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 mesylate decreases the production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by activating CB2, TRPV1, TRPA1 and yet unidentified receptor targets. **Journal of Inflammation**, v. 13, p. 15, 2016.

LUENGO-ALONSO, G. et al. Denosumab treatment for giant-cell tumor of bone: a systematic review of the literature. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 139, p. 1339–1349, 2019.

MAGEE, D. et al. Cancer pain: where are we now? **Pain management**, v. 9, p. 63–79, 2019.

MALL, C. et al. Repeated PD-1/PD-L1 monoclonal antibody administration induces fatal xenogeneic hypersensitivity reactions in a murine model of breast cancer. **Oncology**, v. 5, p. 1–12, 2016.

MANTYH, P. Bone cancer pain: Causes, consequences, and therapeutic opportunities. **Pain**, v. 154, p. S54–S62, 2013.

MANTYH, P. W. et al. Molecular mechanisms of cancer pain. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 201–209, 2002.

MANTYH, P. W. Mechanisms that drive bone pain across the lifespan. **British Journal**

of **Clinical Pharmacology**, v. 85, p. 1103-1113, 2018.

MANTYH, W. G. et al. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. **Neuroscience**, v. 85, p. 1103-1113, 2010.

MAQBOUL, A.; ELSADEK, B. A novel model of cancer-induced peripheral neuropathy and the role of TRPA1 in pain transduction. **Pain Research and Management**, v. 2017, 2017.

MAQBOUL, A.; ELSADEK, B. Expression profiles of TRPV1, TRPV4, TLR4 and ERK1/2 in the dorsal root ganglionic neurons of a cancer-induced neuropathy rat model. **PeerJ**, v. 2018, p. e4622, 2018.

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

MCCARTY, M.; DINICOLANTONIO, J. Suppression of NADPH Oxidase Activity May Slow the Expansion of Osteolytic Bone Metastases. **Healthcare**, v. 4, p. 60, 2016.

MCSHERRY, E. A. et al. Molecular basis of invasion in breast cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 3201–3218, 2007.

MEDHURST, S. J. et al. A rat model of bone cancer pain. **Pain**, v. 96, p. 129-140, 2002.

MEENTS, J. E.; CIOTU, C. I.; FISCHER, M. J. M. Trpa1: A molecular view. **Journal of Neurophysiology**, v. 121, p. 427–443, 2019.

MILADINOVIC, T. et al. Functional effects of TrkA inhibition on system x C⁻-mediated glutamate release and cancer-induced bone pain. **Molecular Pain**, 2018.

MONTEIRO, A. C. et al. T Cells Induce Pre-Metastatic Osteolytic Disease and Help

Bone Metastases Establishment in a Mouse Model of Metastatic Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1–13, 2013.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Science Signaling**, v. 2005, p. re3, 2005.

MORAN, M. M.; SZALLASI, A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, p. 2185-2203, 2018.

NASSINI, R. et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. **Pain**, v. 152, p. 1621–1631, 2011.

NEUFELD, N. J.; ELNAHAL, S. M.; ALVAREZ, R. H. Cancer pain: A review of epidemiology, clinical quality and value impact. **Future Oncology**, v. 13, p. 833–841, 2017.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 274–284, 2009.

NILIUS, B. TRP channels in disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1772, p. 805–812, 2007.

O’CARRIGAN, B. et al. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2017, 2017.

W. H.O. Cancer pain relief. **Cancer Pain Relief. Geneva, Switzerland, World Health Organization**, 1986.

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

PANIS, C.; PAVANELLI, W. R. Cytokines as mediators of pain-related process in breast cancer. **Mediators of Inflammation**, 2015.

PEREIRA, J. X. et al. The deficiency of galectin-3 in stromal cells leads to enhanced tumor growth and bone marrow metastasis. **BMC Cancer**, v. 16, p. 636, 2016.

PEREIRA, S. et al. Neuropathic pain after breast cancer treatment: characterization and risk factors. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 54, p. 877-888, 2017.

PEUCKMANN, V. et al. Chronic pain and other sequelae in long-term breast cancer survivors: Nationwide survey in Denmark. **European Journal of Pain**, v. 13, p. 478–485, 2009.

PLANTE, G. E.; VANITALLIE, T. B. Opioids for cancer pain: The challenge of optimizing treatment. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 59, p. S47-S52, 2010.

PORTENOY, R. K. Treatment of cancer pain. **The Lancet**, v. 377, p. 2236-2247, 2011.

PULASKI, B. A; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current protocols in immunology**, v. Chapter 20, p. Unit 20.2, 2001.

RABBANI, Z. N. et al. Antiangiogenic action of redox-modulating Mn(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin, MnTE-2-PyP(5+), via suppression of oxidative stress in a mouse model of breast tumor. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 992–1004, 2010.

RAOUF, R.; QUICK, K.; WOOD, J. N. Pain as a channelopathy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3745–3752, nov. 2010.

REMENIUK, B. et al. Disease modifying actions of interleukin-6 blockade in a rat model of bone cancer pain. **Pain**, v. 159, p. 684–698, 2018.

RIGO, F. K. et al. Effect of ω -conotoxin MVIIA and Ph α 1 β on paclitaxel-induced acute and chronic pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 115, p. 16-22,

2013.

RINGKAMP, M.; DOUGHERTY, P. M.; RAJA, S. N. Anatomy and Physiology of the Pain Signaling Process. **Essentials of Pain Medicine**, p. 3-10, 2018.

RIVOIRA, M. et al. Naringin prevents bone loss in a rat model of type 1 Diabetes mellitus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 637, p. 56–63, 2018.

RUPAREL, S. et al. Released lipids regulate Transient Receptor Potential Channel (TRP)-dependent oral cancer pain. **Molecular Pain**, v. 11, p. 1–8, 2015.

SABINO, M. A. C. et al. Different tumors in bone each give rise to a distinct pattern of skeletal destruction, bone cancer-related pain behaviors and neurochemical changes in the central nervous system. **International Journal of Cancer**, v. 104, p. 550–558, 2003.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: Novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, p. 7–14, 2010.

SALGANIK, R. I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **Journal of the American College of Nutrition**, p. 464S-472S, 2001.

SANTONI, G. et al. Transient Receptor Potential Cation Channels in Cancer Therapy. **Medical Sciences**, v. 7, p. 108, 2019.

SARABIA-ESTRADA, A. R. et al. Metastatic human breast cancer to the spine produces mechanical hyperalgesia and gait deficits in rodents. **The Spine Journal**, v. 17, p. 1325-1334, 2017.

SATIJA, A. et al. Breast cancer pain management - a review of current & novel therapies. **The Indian journal of medical research**, v. 139, p. 216-225, 2014.

SCHMIDT, B. L. The neurobiology of cancer pain. **Neuroscientist**, v. 20, p. 546–562, 2014.

SCHWEI, M. J. et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. **J Neurosci**, v. 19, p. 10886–10897, 1999.

SCULLY, O. J. et al. Breast cancer metastasis. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 9, p. 311-320, 2012.

SEXTON, J.; ATAYEE, R. S.; BRUNER, H. C. Case Report: Ketamine for Pain and Depression in Advanced Cancer. **Journal of Palliative Medicine**, v. 21, p. 1670–1673, 2018.

SHENOY, P. A. et al. The Walker 256 Breast Cancer Cell-Induced Bone Pain Model in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1–13, 2016.

SINDHI, V.; ERDEK, M. Interventional treatments for metastatic bone cancer pain. **Pain Management**, v. 9, p. 307–315, 2019.

SLOSKY, L. M. et al. The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ drives breast tumor cell glutamate release and cancer-induced bone pain. **Pain**, v. 157, p. 2605–2616, 2016.

SLOSKY, L. M.; LARGENT-MILNES, T. M.; VANDERAH, T. W. Use of Animal Models in Understanding Cancer-induced Bone Pain. **Cancer growth and metastasis**, v. 8, p. 47–62, 2015.

SMYTH, E. N. et al. Patient-reported pain and other quality of life domains as prognostic factors for survival in a phase III clinical trial of patients with advanced breast cancer. **Health and Quality of Life Outcomes**, p. 1–10, 2016.

SNEDDON, L. U. Comparative Physiology of Nociception and Pain. **Physiology**, v. 33, p. 63–73, 2018.

SO, C. L.; MILEVSKIY, M. J. G.; MONTEITH, G. R. Transient receptor potential cation channel subfamily V and breast cancer. **Laboratory Investigation**, v. 100, p. 199-206, 2020.

SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO, D. et al. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 24, p. 997–1008, 2020.

STAROWICZ, K.; FINN, D. P. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. **Adv Pharmacol**, v. 80, p. 437-475, 2017.

SUGIYAMA, D. et al. Hydrogen peroxide induces muscle nociception via transient receptor potential ankyrin 1 receptors. **Anesthesiology**, v. 127, n. 4, p. 695–708, 2018.

SWARM, R. A. et al. Adult cancer pain, version 3.2019. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, p. 977-1007, 2019.

TAKAHASHI, K. et al. Mammary tissue microenvironment determines T cell-dependent breast cancer-associated inflammation. **Cancer Science**, v. 106, p. 867-874, 2015.

TAKAHASHI, N. et al. Cancer Cells Co-opt the Neuronal Redox-Sensing Channel TRPA1 to Promote Oxidative-Stress Tolerance. **Cancer Cell**, v. 33, p. 985- 1003.e7, 2018.

THOMAS, A. et al. Efficacy of intrathecal morphine in a model of surgical pain in rats. **PLoS ONE**, v. 11, 2016.

THOMPSON, A. L. et al. The endocannabinoid system alleviates pain in a murine model of cancer-induced bone pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 373, p. 230–238, 2020.

TODA, T. et al. Inhibitory effects of Tyrphostin AG-related compounds on oxidative stress-sensitive transient receptor potential channel activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 786, p. 19–28, 2016.

TOMOTSUKA, N. et al. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion of the rat bone cancer pain model. **Journal of Pain Research**, v. 7, p. 415–423, 2014.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA A Cancer Journal of Clinicians**, v. 65, p. 87-108, 2015.

TREEDE, R.-D. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. **Pain reports**, v. 3, p. e643, 2018.

TREEDE, R.-D. et al. Chronic pain as a symptom or a disease. **Pain**, v. 160, p. 19–27, 2019.

TREVISAN, G. et al. Novel Therapeutic Strategy to Prevent Chemotherapy- Induced Persistent Sensory Neuropathy By TRPA1 Blockade. **Cancer Research**, v. 73, p. 3120–3132, 2013.

TREVISAN, G. et al. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 72, p. 200–209, 2014.

TREVISAN, G. et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain**, v. 65 p. 1361-1377, 2016.

TSAGARELI, M. G. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs attenuate agonist-evoked activation of transient receptor potential channels. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, p. 745–751, 2018.

TUTTLE, A. H. et al. A deep neural network to assess spontaneous pain from mouse facial expressions. **Molecular Pain**, p. 1–9, 2018.

UHELSKI, M. L. et al. The non-selective cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2

attenuates responses of C-fiber nociceptors in a murine model of cancer pain. **Neuroscience**, v. 247, p. 84–94, 2013.

UNGARD, R. G.; SEIDLITZ, E. P.; SINGH, G. Inhibition of breast cancer-cell glutamate release with sulfasalazine limits cancer-induced bone pain. **Pain**, v. 155, p. 28–36, 2014.

VANDERAH, T. W. et al. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. **The Journal of neuroscience**, v. 20, p. 7074-7079, 2000.

VARRASSI, G. et al. A Pharmacological Rationale to Reduce the Incidence of Opioid Induced Tolerance and Hyperalgesia: A Review. **Pain and Therapy**, v. 7, p. 59-75, 2018.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 387–417, 2007.

VIANA, F. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. **The Journal of Physiology**, p. 34–96, 2016.

VON HEHN, C. A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. **Neuron**, v. 73, p. 638–652, fev. 2012.

WANG, L. et al. Identification of in Vivo Disulfide Conformation of TRPA1 Ion Channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 9, p. 6169–6176, 2012.

WANG, T. X. et al. Antinociceptive and hypnotic activities of pregabalin in a neuropathic pain-like model in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 31-39, 2015.

WANG, W. et al. Upregulation of bone morphogenetic protein 2 (Bmp2) in dorsal root ganglion in a rat model of bone cancer pain. **Molecular Pain**, v. 15, 2019.

WEI, H. et al. Potential role of spinal TRPA1 channels in antinociceptive tolerance to

spinally administered morphine. **Pharmacological Reports**, v. 68, p. 472–475, 2016.

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

WU, M.-Y. et al. Molecular Regulation of Bone Metastasis Pathogenesis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 1423–1438, 2018.

XU, Y. et al. Mechanisms of PDGF siRNA-mediated inhibition of bone cancer pain in the spinal cord. **Scientific Reports**, 2016.

YANG, M. H. et al. Pleiotropic pharmacological actions of capsazepine, a synthetic analogue of capsaicin, against various cancers and inflammatory diseases. **Molecules**, v. 24, p. 1–14, 2019.

YANG, Y. et al. Increased activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 451, p. 86–92, 2014.

YE, Y. et al. Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, p. 1667–1676, 2011.

YEKKIRALA, A. S. et al. Breaking barriers to novel analgesic drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, p. 545–564, 2017.

YERLIKAYA, A. et al. A novel combination treatment for breast cancer cells involving BAPTA-AM and proteasome inhibitor bortezomib. **Oncology Letters**, v. 12, p. 323–330, 2016.

YONG, M. et al. Survival in breast cancer patients with bone metastases and skeletal-related events: A population-based cohort study in Denmark (1999-2007). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 129, p. 495-503, 2011.

YOON, S. Y.; OH, J. Neuropathic cancer pain: Prevalence, pathophysiology, and

management. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 33, p. 1058–1069, 2018.

ZAJACZKOWSKA, R. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.

ZAJĄCZKOWSKA, R. et al. Bone pain in cancer patients: Mechanisms and current treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.

ZHAO, D. et al. Roles of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in regulating bone cancer pain via TRPA1 signal pathway and beneficial effects of inhibition of neuro-inflammation and TRPA1. **Molecular Pain**, v. 15, 2019.

ZHAO, J. et al. Spinal interleukin-33 and its receptor ST2 contribute to bone cancer-induced pain in mice. **Neuroscience**, v. 253, p. 172–182, 2013.

ZHOU, J.; LIU, T.; WANG, W. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 9 expression in osteosarcoma. **Medicine (Baltimore)**, p. 1–7, 2018.

ZHOU, S. Z. et al. Analgesic Effect of Methane Rich Saline in a Rat Model of Chronic Inflammatory Pain. **Neurochemical Research**, v. 43, p. 869-877, 2018.

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

ZHU, Y. F. et al. Cancer pain and neuropathic pain are associated with A β sensory neuronal plasticity in dorsal root ganglia and abnormal sprouting in lumbar spinal cord. **Molecular Pain**, v. 14, 2018.

ZWOLAK, P. et al. Addition of receptor tyrosine kinase inhibitor to radiation increases tumour control in an orthotopic murine model of breast cancer metastasis in bone. **European Journal of Cancer**, v. 4, p. 2507-2516, 2008.

ANEXOS

Segue abaixo os certificados dos Comitês de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense e Universidade Federal de Santa Maria.



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 042-2014-02

Professor responsável: Gabriela Trevisan dos Santos

Equipe: Juliano Ferreira, Flávia Karine Rigo, Leticia Bitencourt Mendes, Denize Angioletto, Cléber Márcio Lima, Yanka Oliveira Coelho, Edinara da Silva Silveira, Lara Back

Título: “Desenvolvimento de um novo modelo de dor do câncer de mama e avaliação da participação do receptor TRPA1 neste modelo em camundongos”.

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 154 Camundongos Balb/C, com 60 dias, pesando aproximadamente 30 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 042-2014-02

Principal Investigator: Gabriela Trevisan dos Santos

Researchers: Juliano Ferreira, Flávia Karine Rigo, Leticia Bitencourt Mendes, Denize Angioletto, Cléber Márcio Lima, Yanka Oliveira Coelho, Edinara da Silva Silveira, Lara Back

Project title: “Development of a novel model of breast cancer pain and the evaluation of TRPA1 receptor participation in this model in mice.”

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 10 de setembro de 2014.

VILSON HEIZEN CARDOSO
Coordenador Adjunto da CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento de um novo modelo de dor do câncer de mama e avaliação da participação do receptor TRPA1 neste modelo em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 7536250417, sob a responsabilidade de **Gabriela Trevisan dos Santos e equipe; Amanda Spring de Almeida; Enzo Disconzi; Guilherme Vargas Bochi; Jady Moraes Franco; Patrícia Severo do Nascimento; Sabrina Qader Kudsi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 25/05/2017.

We certify that the proposal "Development of a novel model of breast cancer pain and the evaluation of TRPA1 receptor participation in this model in mice", utilizing 224 Heterogenics mice (224 females), protocol number CEUA 7536250417, under the responsibility of **Gabriela Trevisan dos Santos and team; Amanda Spring de Almeida; Enzo Disconzi; Guilherme Vargas Bochi; Jady Moraes Franco; Patrícia Severo do Nascimento; Sabrina Qader Kudsi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 05/25/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 05/2017 a 03/2021

Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério externo](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [60 a 60 dias](#)

N: [224](#)

Linhagem: [BALB/c](#)

Peso: [20 a 30 g](#)

Resumo: A dor relacionada ao câncer é um dos mais importantes sintomas em termos de prevalência e consequências potenciais, sendo assim o tratamento adequado deste tipo de dor deve ser prioridade na clínica. Tumores como o de mama frequentemente apresentam metástases ósseas e estas contribuem para a dor incapacitante, prejudicando as tarefas diárias e a qualidade de vida dos pacientes. A terapêutica mais adequada para o tratamento da dor do câncer envolve diferentes classes de analgésicos de acordo com a severidade da dor, sendo que os opioides são os fármacos mais efetivos disponíveis. Porém o uso contínuo de opioides para o tratamento de dor do câncer pode levar ao aparecimento de efeitos adversos graves. Mesmo com diversas informações sobre o tratamento adequado da dor do câncer, é ainda descrito que 43% dos pacientes com câncer apresentam tratamento inadequado para a dor. Os mecanismos associados à dor do câncer são ainda incertos, sendo que diversos canais iônicos parecem estar envolvidos na transdução de estímulos nocivos no câncer. O receptor TRPA1 é um sensor a estímulos nocivos, como o isotiocianato de alila (AITC, encontrado no óleo de mostarda) e o peróxido de hidrogênio. Além disso, já foi descrito a participação deste receptor em uma série de patologias dolorosas, como dor inflamatória e neuropática. Dessa maneira, o canal TRPA1 é um alvo em potencial para a descoberta de novos analgésicos. Porém, até o momento não foi avaliado se o receptor TRPA1 poderia estar envolvido no desenvolvimento da dor do câncer. Então este projeto tem como objetivo principal avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 na dor do câncer de mama com metástases ósseas e também promover o desenvolvimento de um modelo para este tipo de dor. Para isso serão utilizados camundongos BALB/c fêmeas (20-30 g). A indução da dor do câncer será realizada pela inoculação de 105 células 4T1 na quarta glândula mamária, e os testes de dor serão realizados em diferentes períodos de tempo e também no dia do pico nociceptivo a ser verificado, após a inoculação. Primeiramente, será avaliado o desenvolvimento de nocicepção (alodinia mecânica e ao frio nocivo, dor espontânea e comportamentos relacionados à dor) no modelo de dor do câncer de mama com metástases ósseas, onde serão testados diversos fármacos já disponíveis para o tratamento da dor do câncer (morfina, paracetamol, naproxeno e codeína). Para avaliar a participação do receptor TRPA1 serão utilizados os antagonistas TRPA1 específicos (HC-030031 e A-967079) e também a administração intratecal de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1. O desenvolvimento de hiperalgesia química será avaliada pela administração de um agonista TRPA1 (AITC) administrado por via intraplantar. Após a indução da dor do câncer de mama com metástases ósseas serão investigados diversos parâmetros como: produção de agonistas endógenos do TRPA1 (peróxido de hidrogênio e 4-hidroxinonal), atividade de enzimas (NADPH oxidase, superóxido dismutase, mieloperoxidase, NAGase), presença de macrófagos e a variação na expressão do canal TRPA1 no nervo ciático e na pele da pata. Também será avaliado o efeito antinociceptivo do composto antioxidante (ácido α -lipoico) neste modelo de dor do câncer. Dessa forma, o presente projeto irá promover a procura por novos alvos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de analgésicos para o tratamento da dor do câncer de mama com



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

 Universidade Federal de Santa Maria

metástases. Palavras-chave: 4-hidroxinonal, peróxido de hidrogênio, opioides, metástase óssea.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa Experimental da Fisiopatologia da Dor

Santa Maria, 26 de maio de 2017

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Roseberg
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria