

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

Maria Fernanda Pessano Fialho

**RECEPTORES B<sub>2</sub> E B<sub>1</sub> DE CININAS SENSIBILIZAM OS RECEPTORES DE  
POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 E VANILÓIDE 4 CONTRIBUINDO  
PARA OS SINTOMAS DE DOR MUSCULOESQUELÉTICA INDUZIDOS PELO  
ANASTROZOL**

Santa Maria, RS  
2024

Maria Fernanda Pessano Fialho

**RECEPTORES B<sub>2</sub> E B<sub>1</sub> DE CININAS SENSIBILIZAM OS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 E VANILÓIDE 4 CONTRIBUINDO PARA OS SINTOMAS DE DOR MUSCULOESQUELÉTICA INDUZIDOS PELO ANASTROZOL**

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

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

Santa Maria, RS  
2024

Maria Fernanda Pessano Fialho

**RECEPTORES B<sub>2</sub> E B<sub>1</sub> DE CININAS SENSIBILIZAM OS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 E VANILÓIDE 4 CONTRIBUINDO PARA OS SINTOMAS DE DOR MUSCULOESQUELÉTICA INDUZIDOS PELO ANASTROZOL**

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

---

Sara Marchesan de Oliveira, Dr<sup>a</sup>. (Orientadora/UFSM)

---

Cássia Regina da Silva, Dr<sup>a</sup>. (UFU)

---

Juliano Ferreira, Dr. (UFSC)

---

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)

---

Roselei Fachinetto, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)

Santa Maria, RS  
2024

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

Fialho, Maria Fernanda Pessano  
RECEPTORES B2 E B1 DE CININAS SENSIBILIZAM OS  
RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 E  
VANILÓIDE 4 CONTRIBUINDO PARA OS SINTOMAS DE DOR  
MUSCULOESQUELÉTICA INDUZIDOS PELO ANASTROZOL / Maria  
Fernanda Pessano Fialho.- 2024.  
129 p.; 30 cm

Orientadora: Sara Marchesan de Oliveira  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2024

Orientadora: Sara Marchesan de Oliveira  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2024

1. inibidores da aromatase 2. terapia endócrina  
adjuvante 3. vias intracelulares 4. TRPs 5. câncer de  
mama I. Marchesan de Oliveira, Sara II. Título.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar sempre meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente mesmo diante a todos os desafios impostos.

Aos meus familiares, em especial, meus pais Fernando e Sara, ao meu irmão Pedro e a minha tia Cláudia pelo apoio incondicional, o que contribuiu para que todos os momentos difíceis se tornassem passageiros. Obrigada profundamente pelo amor, paciência e encorajamento constantes que me proporcionaram. Vocês são os meus maiores incentivadores! Além disso, agradeço profundamente ao meu anjo da guarda, minha tia Tânia (*in memoriam*), pois independente de onde estiveres, sei que sempre esteve e estará torcendo por mim.

À minha orientadora, Sara Marchesan de Oliveira, pela oportunidade oferecida desde a iniciação científica, por guiar com excelência o meu caminho científico. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial, não medir esforços para passar ensinamentos, paciência, conselhos e pelo bom convívio de sempre. Hoje levo você, professora Sara, como um exemplo de profissional, mas também um exemplo de amiga.

Aos amigos e colegas de laboratório que me acompanharam desde o início desta jornada e aos que se juntaram a mim ao longo do caminho: Indiara, Camila, Evelyne, Gabriela, Natháli, Amanda, Ana Clara, João Pedro, Samuel, Lara, Patrick e Rafaela pela ótima convivência diária, sugestões, críticas, risadas, desabafos e principalmente, pelo apoio e ajuda incondicional que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. A cada um de vocês, quero expressar meu profundo agradecimento por estar ao meu lado durante os desafios e as conquistas deste percurso acadêmico, vocês foram indispensáveis fontes constantes de ânimo, incentivo e apoio diário.

Em especial, agradeço a Evelyne e Gabizinha, minhas grandes amigas e maravilhosas colegas de laboratório. Nossas risadas diárias, conselhos, companheirismo, compreensão, incentivo e apoio diário foram confirmação da nossa verdadeira amizade, e por isso sou eternamente grata. Obrigada por me ajudaram a concretizar esse trabalho e pelo encorajamento constante que me proporcionaram, os quais foram fundamentais para minha trajetória acadêmica.

Aos meus amigos de graduação, de Santa Maria e Rosário do Sul que mesmo distantes do meio científico, nunca mediram esforços em apoiar e incentivar minhas escolhas.

Aos meus colegas e amigos da New York University, Alan, Jeffy, Shavonne, Gokul, Rocco, Chloe e Raquel, obrigada por todos os ensinamentos durante meu período do Sanduíche, ajuda na execução dos experimentos e por me receberem tão bem. Em especial, agradeço a Raquel, cujo apoio, conselhos e companheirismo foram essenciais para a finalização da minha jornada de doutorado. Aos professores, Nigel Bunnett e Dane Jensen, obrigada por me receberem tão bem na universidade e possibilitarem tamanho aprendizado.

Aos amigos que fiz durante o período em Nova Iorque, Luisa, Tamires, Ísis, Alef, Amanda, Dona Marlene (minha *roomie*), Paola e João Otávio vocês fizeram meu intercâmbio ser ainda mais especial, acolhedor, maravilhoso e inesquecível! Em especial a Luisa, obrigada por cada conversa e cada momento de descontração, que possamos continuar compartilhando momentos memoráveis e construindo novas experiências juntas em NY.

Aos meus amigos, aqueles que caminham comigo e aqueles que nem sempre podem estar por perto.

Agradeço aos professores que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso, bem como a CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

### RECEPTORES B<sub>2</sub> E B<sub>1</sub> DE CININAS SENSIBILIZAM OS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 E VANILÓIDE 4 CONTRIBUINDO PARA OS SINTOMAS DE DOR MÚSCULOESQUELÉTICA INDUZIDOS PELO ANASTROZOL

AUTORA: Maria Fernanda Pessano Fialho

ORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

O anastrozol, um inibidor da aromatase (IA), induz sintomas musculoesqueléticos dolorosos, que reduzem a qualidade de vida dos pacientes podendo levar à descontinuação da terapia. Estudos têm sido realizados para compreender os mecanismos envolvidos nesses sintomas dolorosos para melhor controlá-los. Neste sentido o Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1), e os receptores B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) e B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) de cininas contribuem para o desenvolvimento e manutenção de sintomas dolorosos associados ao uso dos IA. Outro alvo potencial que pode estar envolvido nesses sintomas dolorosos é o Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 4 (TRPV4), que está colocalizado com o TRPA1 em neurônios sensoriais primários. No entanto, o envolvimento do TRPV4, bem como a possível sensibilização do TRPA1 e do TRPV4 pelas vias de sinalização a jusante da ativação dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R na dor induzida por anastrozol são desconhecidas. O modelo de dor musculoesquelética foi induzido pela administração oral de anastrozol em camundongos C57BL/6 machos. O anastrozol causou sintomas de dor (alodínia mecânica e perda de força muscular) em camundongos, os quais foram reduzidos pelos antagonistas dos B<sub>2</sub>R (Icatibant), B<sub>1</sub>R (DALBk) ou TRPA1 (A967079). A administração local de agonistas dos B<sub>2</sub>R (bradicinina), B<sub>1</sub>R (DABk) ou TRPA1 (AITC) (todos em doses subnociceptivas) induziu um comportamento de nociceção espontânea, aumentou e prolongou os parâmetros dolorosos em camundongos tratados com anastrozol, os quais foram atenuados pelo pré-tratamento com seus respectivos antagonistas. Utilizando agonistas, antagonistas desses receptores e um protocolo de dessensibilização *in vivo* confirmamos a interação entre os B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R e TRPA1 nos sintomas dolorosos induzidos pelo anastrozol. A administração local de inibidores da PLC, PKC ou PKA também atenuou os sintomas dolorosos induzidos pelos agonistas dos B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R ou TRPA1 em animais previamente tratados com anastrozol. O HC067047, antagonista do TRPV4, reduziu a alodínia mecânica e a perda de força muscular induzida pelo anastrozol. Em animais previamente tratados com anastrozol, a administração local dos agonistas TRPV4 (4 $\alpha$ -PDD ou solução hipotônica), B<sub>2</sub>R (bradicinina) ou B<sub>1</sub>R (DABk) (todos em doses subnociceptivas) aumentou os comportamentos de dor induzidos pelo anastrozol, os quais foram reduzidos pelo pré-tratamento com o antagonista do TRPV4. A inibição local das vias de sinalização dependentes da ativação dos receptores de cininas, PLC, PKC ou PKC $\epsilon$  atenuou os parâmetros dolorosos induzidos pelos agonistas TRPV4, B<sub>2</sub>R ou B<sub>1</sub>R em animais previamente tratados com anastrozol. Dessa maneira, confirmamos o envolvimento do TRPV4, bem como a interação intracelular dos receptores de cininas (B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R) com o TRPA1 (via sinalização da PLC/PKC e PKA) e com o TRPV4 (via sinalização da PLC, PKC e PKC $\epsilon$ ). Assim, a regulação dos receptores de cininas ou do TRPA1 e TRPV4 incentiva o tratamento direcionado para mitigar o impacto potencial dos sintomas dolorosos relatados pelos usuários dos IA, como o anastrozol.

**Palavras-chave:** inibidores da aromatase; terapia endócrina adjuvante; vias intracelulares; TRPs; câncer de mama.

## ABSTRACT

### KININ B<sub>2</sub> AND B<sub>1</sub> RECEPTORS SENSITIZE THE POTENTIAL TRANSIENT ANKYRIN 1 AND VANILLOID 4 RECEPTORS CONTRIBUTING TO ANASTROZOLE-INDUCED MUSCULOSKELETAL PAIN SYMPTOMS

AUTHOR: Maria Fernanda Pessano Fialho

ADVISOR: Sara Marchesan de Oliveira

Anastrozole, an aromatase inhibitor (AI), induces painful musculoskeletal symptoms, which reduce patients' quality of life and may lead to therapy discontinuation. Studies have been made to understand the mechanisms involved in these painful symptoms to manage them better. In this sense, the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and kinin B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) and B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) receptors contribute to the development and maintenance of painful symptoms associated with AI use. Another potential target that might be involved in the painful symptoms is Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4), which is co-localized with the TRPA1 channel in primary sensory neurons. However, the involvement of TRPV4 and the possible sensitization of TRPA1 and TRPV4 by signalling pathways downstream of B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation in anastrozole-induced pain are unknown. The musculoskeletal pain model was induced by oral administration of anastrozole in male C57BL/6 mice. Anastrozole caused pain symptoms (mechanical allodynia and loss of muscle strength) in mice, which were reduced by B<sub>2</sub>R (Icatibant), B<sub>1</sub>R (DALBk) or TRPA1 (A967079) antagonists. The local administration of B<sub>2</sub>R (bradykinin), B<sub>1</sub>R (DABk) or TRPA1 (AITC) agonists (all in sub-nociceptive doses) induced overt nociceptive behaviour and enhanced and prolonged the painful parameters in anastrozole-treated mice, which were attenuated after pre-treatment with their respective antagonists. Utilizing agonists, antagonists of these receptors, and an *in vivo* desensitization protocol, we confirmed the interaction between B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 in the painful symptoms induced by anastrozole. The local administration of PLC, PKC or PKA inhibitors attenuated the painful symptoms induced by B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R or TRPA1 agonists in animals previously treated with anastrozole. HC067047, TRPV4 antagonist, reduced the anastrozole-induced mechanical allodynia and muscle strength loss. In animals previously treated with anastrozole, the local administration of the TRPV4 (4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution), B<sub>2</sub>R (bradykinin) or B<sub>1</sub>R (DABk) agonists (all in sub-nociceptive doses) enhanced the anastrozole-induced pain behaviours, which were reduced by pre-treatment with TRPV4 antagonist. Local inhibition of signalling pathways dependent on kinin receptor activation, PLC, PKC, or PKC $\epsilon$  pathways attenuated the painful parameters induced by TRPV4, B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists in animals previously treated with anastrozole. In this way, we confirmed the involvement of TRPV4, as well as the intracellular interaction of kinin receptors (B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R) with TRPA1 (via PLC/PKC and PKA signalling) and TRPV4 (via PLC, PKC and PKC $\epsilon$  signalling). Thus, regulating kinin receptors or the TRPA1 or TRPV4 encourages targeted treatment to mitigate the potential impact of painful symptoms reported by AI users, such as anastrozole.

**Keywords:** aromatase inhibitors; adjuvant endocrine therapy; intracellular pathways; TRPs; breast cancer.

## **LISTA DE FIGURAS**

**FIGURA 1** – Representação das vias ascendentes e descendentes da dor.

**FIGURA 2** – Mecanismo da dor nociceptiva.

**FIGURA 3** – Mecanismos da dor inflamatória.

**FIGURA 4** – Mecanismos da dor neuropática.

**FIGURA 5** – Mecanismos da dor nociplástica.

**FIGURA 6** – Cininas e seus receptores.

**FIGURA 7** – Estrutura do Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 e Vanilóide 4.

**FIGURA 8** – Mecanismo de sensibilização intracelular dos Receptores de Potencial Transitório pelos Receptores acoplados a proteína G.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15d-PGJ2	15-Deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J <sub>2</sub>
4-HNE	4-hidroxinonenal
4 $\alpha$ -PDD	4 alfa-forbol 12,13-didecanoato
AA	Ácido araquidônico
AITC	Isotiocianato de alila (do inglês, <i>Allyl isothiocyanate</i> )
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiônico
ANKTM1	Proteína tipo-anquirina com domínios transmembrana 1 (do inglês, <i>Ankyrin-like protein with transmembrane domains protein 1</i> )
ASIC	Canais iônicos sensíveis a ácido (do inglês, <i>Acid-sensing ion channel</i> )
ATP	Trifosfato de Adenosina (do inglês, <i>Adenosine triphosphate</i> )
B <sub>1</sub> R	Receptor B1
B <sub>2</sub> R	Receptor B2
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic fator</i> )
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, <i>Calcitonin gene related peptide</i> )
COX	Ciclooxigenase
CS1	Córtex somatossensorial primário
CS2	Córtex somatossensorial secundário
Cu <sup>2+</sup>	Íons cobre
DABk	Des-Arg <sup>9</sup> -Bradicinina
DAG	Diacilglicerol
DAKd	Des-Arg <sup>10</sup> -calidina
DRG	Gânglio da raiz dorsal (do inglês, <i>Dorsal root ganglion</i> )
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FDA	Faixa dinâmica ampla
GABA	Ácido gama aminobutírico (do inglês, <i>Gamma-aminobutyric acid</i> )
GPCR	Receptores acoplados à proteína G (do inglês <i>G protein-coupled receptor</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio

HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (do inglês <i>Human Epidermal growth factor receptor-type 2</i> )
IAs	Inibidores da aromatase
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, <i>Association for the study of pain</i> )
IB4	Isolectina B4
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de Inositol (do inglês, <i>Inositol Trisphosphate</i> )
K <sup>+</sup>	Íons potássio
LOX	Lipooxigenase
Mg <sup>2+</sup>	Íons magnésio
Na <sup>+</sup>	Íons sódio
NGF	Fator de crescimento do nervo (do inglês, <i>Nerve growth factor</i> )
NK1	Neuroquinina 1 (do inglês, <i>Neurokinin 1</i> )
NMDA	N-metil-D-aspartado
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>Nitric oxide</i> )
NS	Nociceptivas específicas (do inglês <i>Nociceptive specific</i> )
PAG	Substância cinzenta periaquedutal (do inglês, <i>Periaqueductal gray matter</i> )
PAR <sub>2</sub>	Receptor ativados por protease 2 (do inglês, <i>Protease-activated receptor 2</i> )
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (do inglês <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> )
PKA	Proteína quinase A (do inglês, <i>Protein kinase A</i> )
PKC	Proteína quinase C (do inglês, <i>Protein kinase C</i> )
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> (do inglês, <i>Phospholipase A2</i> )
PLC	Fosfolipase C (do inglês <i>Phospholipase C</i> )
RVM	Medula rostroventromedial (do inglês, <i>Rostral ventromedial medulla</i> )
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TM	Transmembrana
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TrkA	Tropomiosina relacionada à quinase A (do inglês, <i>Tropomyosin-related kinase A</i> )

TRP	Receptor de potencial transitório (do inglês, <i>Transient receptor potential</i> )
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1 (do inglês, <i>Transient receptor potential ankyrin 1</i> )
TRPV4	Receptor de potencial transitório vanilóide 4 (do inglês, <i>Transient receptor potential vanilloid 4</i> )
VGCCs	Canais de cálcio dependentes à voltagem (do inglês, <i>Voltage-gated calcium channel</i> )
Zn <sup>2+</sup>	Íons zinco



## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 DOR E NOCICEPÇÃO .....	20
2.1.1 <i>Transmissão da Dor</i> .....	20
2.2.1. <i>Tipos de dor</i> .....	32
2.2.1.1 Dor Nociceptiva.....	33
2.2.1.2 Dor inflamatória .....	35
2.2.1.3 Dor Nociplástica .....	38
2.2.1.4 Dor Neuropática .....	40
2.2.1.5 Dor associada ao câncer .....	42
2.2. DOR ASSOCIADA AOS INIBIDORES DA AROMATASE.....	44
2.3 CININAS E SEUS RECEPTORES .....	47
2.4 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRPs).....	51
2.4.1 <i>TRPA1 e TRPV4</i> .....	52
2.4.1.1. TRPA1 e TRPV4 e sua interação com as cininas.....	57
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	61
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	61
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	61
3.2.1 Artigo Científico 1: .....	61
3.2.2 Artigo Científico 2: .....	61
<b>4. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	63
4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I.....	63
4.2 ARTIGO CIENTÍFICO II .....	85
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	101
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	105
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	106
<b>8. APÊNDICE I - ARTIGOS COMPLEMENTARES</b> .....	124
<b>9. ANEXOS</b> .....	125
<b>ANEXO A</b> .....	127
<b>ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO USO DE ANIMAIS: PROJETO ANASTROZOL E TRPV4</b> .....	128

**ANEXO C – LICENÇA DA PARA UTILIZAÇÃO DO CONTEÚDO DO ARTIGO CIENTÍFICO II..... 129**

## APRESENTAÇÃO

Nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA constam a introdução e uma revisão da literatura sobre os temas abordados nesta tese, respectivamente. A metodologia utilizada, resultados obtidos, discussões pertinentes e referências bibliográficas que compõem esta tese estão apresentados nos itens descritos abaixo, e representam a íntegra deste estudo:

- (i) ARTIGO CIENTÍFICO I, publicado no periódico internacional *Pharmaceutics* (Qualis A1 na Área Ciências Biológicas II, Fator de impacto 5,4 e índice H 85 em 2024);
- (ii) ARTIGO CIENTÍFICO II, publicado no periódico internacional *Molecular Neurobiology* (Qualis A1 na Área Ciências Biológicas II, Fator de impacto 5,1 e índice H 130 em 2024);

O item DISCUSSÃO e CONCLUSÕES encontrado no final desta tese, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos I e II contidos neste estudo.

As ABREVIATURAS e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente aquelas que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta tese, uma vez que as abreviaturas e referências utilizadas para a elaboração dos artigos científicos estão mencionadas nos mesmos.

No item APÊNDICE I consta a capa de artigos complementares a essa tese, produzidos como primeira autoria durante o período de doutorado e publicados nas revistas: *Pharmacology & Therapeutics* (Qualis A1 na Área Ciências Biológicas II, Fator de impacto 13,5 (em 2024) e índice H 220): ***“Animal models of fibromyalgia: What is the best choice?”***. *Inflammopharmacology* (Qualis A1 na Área Ciências Biológicas II, Fator de impacto 5,8 (em 2024) e índice H 61): ***“Could the fibromyalgia syndrome be triggered or enhanced by COVID-19?”***. *European Journal of Pharmacology* (Qualis A1 na Área Ciências Biológicas II, Fator de impacto 5,0 (em 2024) e índice H 197): ***“Involvement of peripheral mast cells in a fibromyalgia model in mice”***.

Nos itens ANEXOS constam as autorizações do Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Santa Maria para o uso dos animais de experimentação e a licença para utilização do artigo científico.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde global e uma das principais causas de morbidade e mortalidade. A incidência do câncer aumentou nas últimas décadas devido ao aumento da expectativa de vida, mudanças no estilo de vida e melhores métodos de diagnóstico (SIEGEL et al., 2023; SUNG et al., 2021). A dor é o sintoma sensorial mais comum em pacientes com câncer (BENNETT et al., 2019), e sua prevalência pode aumentar durante e após o regime terapêutico (procedimentos cirúrgicos, radioterapia e/ou tratamento antineoplásico) (BENNETT et al., 2019; MANTYH, 2006).

O câncer da mama é o câncer mais comum entre as mulheres no mundo todo (11,7%), com uma estimativa de milhões de novos casos anualmente (2,3 milhões de novos casos) e responsável por 15,5% das mortes por câncer no ano de 2020 (SIEGEL et al., 2023; SUNG et al., 2021). As pacientes com câncer de mama podem desenvolver sintomas dolorosos causados pelo próprio tumor e suas metástases, procedimentos cirúrgicos, ou tratamentos oncológicos (BENNETT et al., 2019; LOIBL et al., 2021; MANTYH, 2006), sendo a dor crônica relatada em 74% dos casos (HAMOOD et al., 2018).

Atualmente, a terapia endócrina adjuvante representa uma abordagem terapêutica indispensável para mulheres diagnosticadas com câncer de mama positivo para receptores hormonais, uma vez que melhora consideravelmente a qualidade de vida e as taxas de sobrevivência das pacientes (TENTI et al., 2020; WAKS; WINER, 2019). A terapêutica adjuvante com inibidores da aromatase (AIs) é principal terapia sistêmica, recomendada por um longo período (5-10 anos), para mulheres pós-menopausa após o diagnóstico de câncer de mama, sendo mais comumente prescrito o anastrozol (64% dos casos) (BURSTEIN et al., 2019; GIBSON et al., 2009; NYROP et al., 2016; TENTI et al., 2020; WAKS; WINER, 2019).

Embora o uso desta classe de medicamento seja considerado seguro e promissor, muitos pacientes relatam efeitos adversos significativos desde o início do tratamento (HENRY et al., 2008; LAROCHE et al., 2014; TENTI et al., 2020; WAKS; WINER, 2019). Sintomas musculoesqueléticos dolorosos, caracterizados por rigidez matinal, dores articulares, mialgia e diminuição da força, são sintomas dolorosos diários de muitos pacientes (30-60%) que utilizam os AIs (CREW et al., 2007; HENRY et al., 2008; LAROCHE et al., 2014). Infelizmente, as abordagens terapêuticas que atenuam a dor associada a distúrbios articulares inflamatórios são ineficazes para aliviar a dor relatada pelo pacientes em tratamento com IAs (CREW et al., 2007), motivo pelo qual pelo menos um quarto dos pacientes descontinuam a terapia (HENRY et al., 2008). Uma vez que o sucesso da terapia com IAs depende da habilidade dos pacientes

em aderir ao tratamento, estudos que objetivem intervenções para aliviar os sintomas dolorosos nesses pacientes são necessários (CREW et al., 2007).

Esforços têm sido feitos para elucidar os mecanismos envolvidos nos sintomas dolorosos relacionados ao uso dos AIs e assim, melhor tratá-los (BRUSCO et al., 2023; DE LOGU et al., 2016; FIALHO et al., 2023a, 2023b; FUSI et al., 2014; ROBARGE et al., 2016). Os estudos atuais concentraram-se na capacidade dessa classe de medicamento em modular a excitabilidade dos neurônios sensoriais (ROBARGE et al., 2016), o qual parece ser um mecanismo dependente da estimulação direta dos Receptores de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1, do inglês *Transient Receptor Potential Ankyrin 1*) pelos IAs (FUSI et al., 2014). Embora os autores sugiram que o TRPA1 seja um dos principais mediadores das ações pró-algésicas dos IAs, a concentração de IAs necessária para sua ativação *in vitro* é maior do que aquela encontrada no plasma de pacientes (FUSI et al., 2014). Dessa forma, as evidências atuais não descartam que outras vias pró-algésicas operem sozinhas ou em conjunto no desenvolvimento e manutenção desses sintomas dolorosos. De fato, a ativação do Receptor Ativado por Protease-2 (PAR<sub>2</sub>, do inglês *Protease activated receptor 2*) pareceu mediar em *in vitro* a sensibilização do TRPA1, contribuindo para a dor induzida pelos AIs (FUSI et al., 2014). Além disso, os Receptores B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) e B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) de cininas também parecem estar mediando o desenvolvimento dos sintomas dolorosos associados ao uso de IAs (BRUSCO et al., 2023; FUSI et al., 2014).

Relevantemente, a ativação de ambos os receptores de cininas, B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R, em neurônios sensoriais medeiam a sensibilização dos Receptores de Potencial Transitório (TRPs, do inglês *Transient Receptor Potential*), como o TRPA1 e o Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 4 (TRPV4, do inglês *Transient Receptor Potential Vanilloid 4*), e contribuí para o desenvolvimento e manutenção de comportamentos dolorosos em diferentes modelos de dor (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; COSTA et al., 2018; FERREIRA; DA SILVA; CALIXTO, 2004; PENG; POOLE; VELDHUIS, 2022; WANG et al., 2008b). Estudos demonstram que a proteína quinase C (PKC, do inglês *Protein kinase C*) e a proteína quinase A (PKA, do inglês *Protein kinase A*) formadas após a estimulação de diferentes subtipos de receptores acoplados à proteína G (GPCRs, do inglês *G Protein-Coupled Receptors*), são capazes de fosforilar, por via intracelular, o TRPA1 e o TRPV4 e modular a sua ativação (PENG; POOLE; VELDHUIS, 2022; VELDHUIS et al., 2015). Além disso, a liberação de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) dos estoques intracelulares e as substâncias metabolizadas durante a hidrólise do ácido araquidônico (AA) são sensibilizadores intracelulares bem estabelecidos do TRPA1 e TRPV4 (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; BAUTISTA et al., 2006; PENG; POOLE;

VELDHUIS, 2022; SCHMIDT et al., 2009; WANG et al., 2008b; WENG et al., 2012). Portanto, esses mecanismos potencialmente interligados dependentes de GPCRs, como os receptores de cininas, podem aumentar a atividade do TRPA1 e do TRPV4 e/ou o tráfego para a membrana, permitindo à amplificação de sintomas dolorosos (PENG; POOLE; VELDHUIS, 2022; SCHMIDT et al., 2009).

Até o momento o envolvimento do TRPV4 e se a ativação dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R as vias de sinalização a jusante da ativação de B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R contribuem para a sensibilização dos canais TRPA1 e TRPV4 no modelo de dor induzido por IAs, como o anastrozol, são desconhecidas. Embora a contribuição individual do TRPA1 e dos receptores de cininas no modelo de dor induzida por IA já tenha sido esclarecida (BRUSCO et al., 2023; FUSI et al., 2014), é plausível sugerirmos que esses receptores possam estar atuando em conjunto para sustentar tais sintomas dolorosos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DOR E NOCICEPÇÃO**

A dor é uma experiência subjetiva, individual e tem papel fundamental de sinalizar para o organismo danos potenciais ocasionados por estímulos físicos, térmicos e químicos nocivos, protegendo-o de futuras lesões, e conseqüentemente torna-se essencial para a sobrevivência e o bem-estar de um organismo (BASBAUM et al., 2009; KUNER; KUNER, 2021; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014; TRACEY, 2017). A dor é considerada uma experiência complexa, pois além de provocar uma sensação desagradável, é capaz de gerar angústia, aflição, decréscimo da produtividade no trabalho com conseqüente redução da qualidade de vida dos pacientes por ela acometidos (PANDELANI et al., 2023; WILLIAMS; CRAIG, 2016). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante à aquela associada, à uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Assim, embora utilizemos uma única palavra, dor, para descrever uma ampla gama de sensações desagradáveis associadas ao desconforto e desprazer, a dor é influenciada por fatores biológicos, psicológicos e sociais (BASBAUM et al., 2009; CHO; DEOL; MARTIN, 2021; RAJA et al., 2020).

Ainda que a nocicepção e a dor sejam considerados termos distintos, a dor causada por uma lesão não pode ocorrer sem a nocicepção (SNEDDON, 2018). A dor é considerada uma experiência individual e subjetiva, pois os indivíduos aprendem a descrevê-la por meio de suas experiências, emoções, expectativas, contexto cultural e estado mental (BASBAUM et al., 2009; CHO; DEOL; MARTIN, 2021; RAJA et al., 2020). Já a nocicepção, refere-se apenas ao componente sensorial da dor, incluindo todos os processos de codificação e processamento de informações desencadeadas pelos estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008; PRESCOTT; RATTÉ, 2017; SNEDDON, 2018). Assim, por envolver fatores emocionais difíceis de serem avaliados em animais, a dor em modelos experimentais é geralmente avaliada pelo componente sensorial, conhecido como nocicepção (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; LOESER; TREEDE, 2008; SNEDDON, 2018).

#### **2.1.1 Transmissão da Dor**

O processo nociceptivo é iniciado quando estímulos nocivos, sejam eles físicos, térmicos ou químicos são detectados por uma subpopulação de fibras aferentes primárias ou também conhecidos como neurônios de primeira ordem (BASBAUM et al., 2009; BASBAUM; JESSELL, 2000). As fibras aferentes primárias possuem quatro componentes funcionais: O



terminal periférico, parte da fibra localizada na periferia do corpo ou nos tecidos, responsável por detectar e realizar a transdução dos estímulos sensoriais em sinais elétricos, iniciando os potenciais de ação. O axônio, responsável por conduzir os potenciais de ação, e o corpo celular que controla a identidade e a integridade do neurônio, e integra os potenciais de ação transmitidos pelos terminais periféricos. Por último, o terminal central, componente que forma o elemento pré-sináptico no sistema nervoso central (SNC) (VIANA; VOETS, 2019; WOOLF; MA, 2007).

Os corpos celulares das fibras aferentes primárias inervam diferentes regiões do corpo e estão localizados em diferentes gânglios sensoriais (BASBAUM et al., 2009; FIORE et al., 2023). Os corpos celulares que inervam o tronco e os membros do corpo são encontrados no gânglio da raiz dorsal (DRG, do inglês *dorsal root ganglion*), localizados ao longo da coluna vertebral e considerado parte do sistema nervoso periférico (BASBAUM et al., 2009; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014). Já o gânglio do trigêmeo abriga os corpos celulares dos neurônios que inervam a cabeça, e é responsável por transmitir informações sensoriais da face, boca e outras estruturas cranianas (VILLANUEVA; NOSEDA, 2013). O gânglio nodoso abriga os corpos celulares das fibras aferentes vagais, e transmite as informações sensoriais dos órgãos internos, como o coração, os pulmões, o trato gastrointestinal e outros (BASBAUM et al., 2009; GEBHART; BIELEFELDT, 2016).

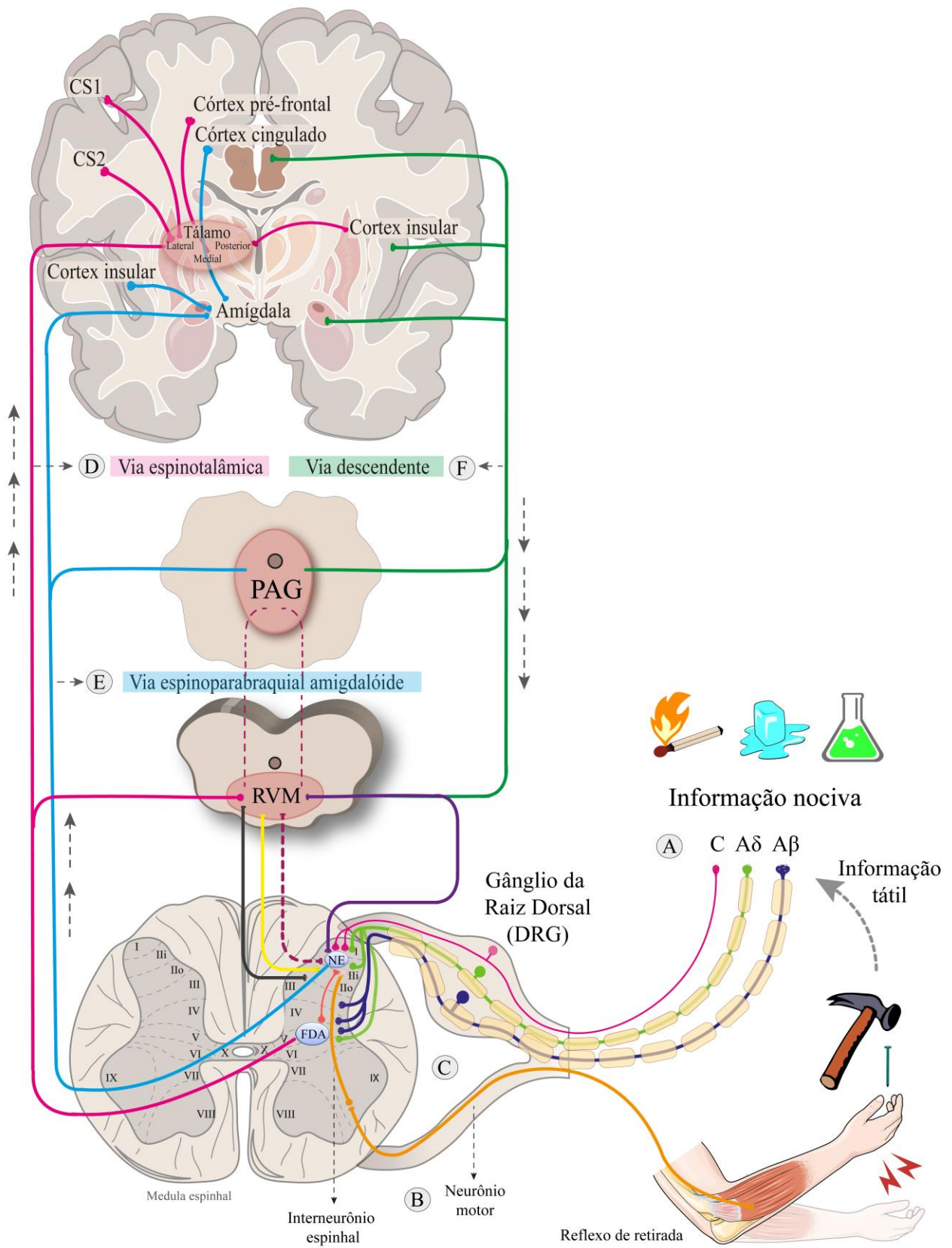
Essas fibras apresentam uma morfologia única, constituída por um único axônio originado do corpo celular que divide-se em dois ramos: Um ramo se estende aos tecidos periféricos, como pele, mucosa e órgãos internos, e o outro ramo estendendo-se para o SNC (medula espinhal ou tronco encefálico), retransmitindo as informações sensoriais detectadas nos tecidos periféricos para os neurônios de segunda ordem (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; TODD; R.H, 2013; VIANA; VOETS, 2019). Dessa forma, as fibras aferentes primárias são classificadas como neurônios pseudo-unipolares, e sua morfologia é altamente adaptativa para sua funcionalidade, pois permite que um único neurônio seja responsável tanto pela detecção dos estímulos inócuos ou nocivos na periferia quanto pela transmissão rápida desses sinais para o SNC, onde esses sinais serão processados e interpretados como estímulo sensorial inócuo ou doloroso (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; KUNER; KUNER, 2021).

Para que ocorra a transmissão sensorial, seja ela inócua ou nociva, é necessário a ativação das fibras aferentes primárias (BASBAUM et al., 2009; MEYER et al., 2008). Assim, baseando-se na sua função (isto é, velocidade de condução) quanto de suas características anatômicas (tamanho da fibra axonal ou mielinização), os neurônios sensoriais primários são

classificados em duas principais categorias, as fibras do tipo A ou do tipo C (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; MEYER et al., 2008).

As fibras aferentes primárias são subclassificadas em fibras A $\beta$ , A $\delta$  e fibras C (**Figura 1A**). As fibras A $\beta$  são altamente mielinizadas e por isso apresentam diâmetro (4-20  $\mu\text{m}$ ) e corpo celular de tamanhos grande (> 40  $\mu\text{m}$ ), o que favorece uma condução muito rápida do estímulo sensorial (> 30-70 m/s). Além disso, as fibras A $\beta$  são ativadas por estímulos de baixo limiar conduzindo principalmente estímulos táteis discriminativos (por exemplo, toque leve, pressão e vibração) e são responsáveis pela localização e postura do corpo no espaço, fenômeno denominado de propriocepção. Apesar desse tipo de fibras transmitirem normalmente estímulos de baixo limiar que sinalizam as sensações inócuas, sabe-se que em algumas condições de dor crônica, essas fibras podem estar contribuindo para a transmissão de estímulos nocivos (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; KUNER; FLOR, 2017).

Os outros dois tipos de fibras aferentes primárias, A $\delta$  e C, são responsáveis por conduzir os estímulos nocivos, e por isso são tradicionalmente conhecidas como nociceptores ou “fibras de dor” (D’MELLO; DICKENSON, 2008; KUNER; FLOR, 2017). Elas podem responder a diferentes modalidades de estímulos nocivos, incluindo estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Embora alguns nociceptores respondam apenas a um único tipo de estímulo, outros são responsivos para dois ou mais estímulos, sendo denominados como nociceptores polimodais, capazes de detectar diversos estímulos sensoriais (BASBAUM et al., 2009; BESSOU; PERL, 1969; PARICIO-MONTESINOS et al., 2020). Dessa forma, considera-se que os nociceptores possuem diferentes propriedades biofísicas e moleculares que permitem detectar e responder seletivamente a estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009; PARICIO-MONTESINOS et al., 2020).



**Figura 1- Representação das vias ascendentes e descendentes da dor.** As fibras aferentes primárias conduzem estímulos sensoriais periféricos até o corno dorsal da medula espinal. (A) Essas fibras são classificadas em fibras

A $\beta$  (azul escuro, mielinizadas), A $\delta$  (em verde claro, finamente mielinizadas) e C (em rosa, não-mielinizadas). As fibras sensoriais primárias, A $\beta$ , A $\delta$  e C, detectam estímulos inócuos ou nocivos (mecânico, térmico e químico) e conduzem o sinal sensorial até o corno dorsal da medula espinhal via potenciais de ação. **(B)** Essas fibras fazem sinapse com interneurônios espinhais (laranja) que ativam neurônios motores, conduzindo a informação até o tecido muscular, na periferia, sinalizando a rápida retirada da parte do corpo em contato com o estímulo potencialmente nocivo. **(C)** As fibras aferentes primárias podem projetar-se para as lâminas mais superficiais (I-III) ou mais profundas (IV-VI) do corno dorsal da medula espinhal. Nessa região também são encontradas as células nociceptivas específicas (NS) que são capazes de fazer sinapses com as fibras A $\delta$  e C; enquanto nas lâminas profundas (IV-V) encontram-se os neurônios de faixa dinâmica ampla (FDA) que recebem informações dos três tipos de fibras. As fibras aferentes primárias fazem sinapse com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal que enviam as informações sensoriais para regiões supra-espinhais por meio de duas principais vias ascendentes. **(D)** Os neurônios da *via espinotalâmica* (em rosa) se projetam da medula espinhal até o tálamo lateral, medial ou posterior, onde neurônios de terceira ordem conectam-se com o córtex somatossensorial primário (CS1) e secundário (CS2), córtex insular ou córtex pré-frontal, e determina o componente sensorial-discriminativo, localização e a intensidade e aspectos cognitivos do estímulo nocivo **(E)** Os neurônios da *via espinoparabraquial amigdalóide* (em azul) partem da medula espinhal até a amígdala, e desta para o córtex insular e cíngulo, estabelecendo o componente afetivo-emocional da dor. **(F)** Vias descendentes da dor (em verde) projetam-se de áreas encefálicas para áreas do tronco encefálico como a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula rostral ventromedial (RVM), que ao serem ativadas são capazes de modular o processamento espinhal da dor. Adaptado de Benarroch (2008), D’Mello; Dickenson (2008), Ossipov; Dussor; Porreca (2010); Finnerup et al (2021). Partes da Figura foram elaboradas usando imagens da Servier Medical Art, fornecidas pela Servier, licenciadas sob uma licença não-portada Creative Commons Attribution 3.0.

As fibras A $\delta$  são finamente mielinizadas, apresentam diâmetro (2-5  $\mu\text{m}$ ) e corpo celular (30-40  $\mu\text{m}$ ) de tamanhos médio, possuindo uma velocidade de condução rápida (12-30 m/s) do estímulo nocivo, e são conhecidas por mediar a dor “rápida” e bem localizada (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; WANG; THYAGARAJAN, 2022) **(Figura 1A)**. Esse tipo de fibra pode ser subdividida em fibra do tipo I, que respondem a estímulos mecânicos e químicos, mas possui um alto limiar de detecção para o calor (> 50°C) e as do tipo II que possuem um alto limiar para a detecção de estímulos mecânicos e baixo limiar para a detecção do calor (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; KUNER, 2010).

A segunda classe de nociceptores é constituída de fibras nociceptivas do tipo C **(Figura 1A)**, as quais não são mielinizadas e por isso têm diâmetro (0,4-1,2  $\mu\text{m}$ ) e corpo celular (< 25  $\mu\text{m}$ ) de tamanhos pequenos, o que a faz conduzir lentamente (0,5-2 m/s) os estímulos nocivos, conferindo o que popularmente identificamos como dor latejante ou “secundária”. As fibras C detectam seletivamente estímulos nociceptivos ou dolorosos por possuírem alto limiar

de ativação (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; MELLO; DICKENSON, 2008; SHIERS et al., 2021). As fibras C são subdivididas em fibras C peptidérgicas e não peptidérgicas (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; SHIERS et al., 2021). As subpopulações de fibras C são ainda mais diversas do que apenas esses dois subconjuntos, uma vez que elas se originam de linhagens distintas durante o seu desenvolvimento, e portanto podem ser subdivididas por meio de diferentes marcadores moleculares (BACHY et al., 2011; BOURINET et al., 2014; LUO et al., 2007; SHIERS et al., 2021).

As fibras C peptidérgicas são assim denominadas por liberarem neuropeptídeos pró-inflamatórios como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, do inglês *calcitonin gene-related peptide*). Além disso, elas também expressam o receptor de tropomiosina relacionada à quinase A (TrkA, do inglês *tropomyosin-related kinase A*) que responde ao fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*). Ao passo que as fibras C não peptidérgicas são compostas principalmente por neurônios que expressam o receptor de neutrofina c-Ret, que é alvo do fator neurotrófico derivado da glia. Como mencionado, essas duas subpopulações de fibras C não são molecularmente homogêneas, refletindo em diferentes funções na detecção das informações sensoriais. Por exemplo, as células positivas para o receptor c-Ret contêm uma população de neurônios que expressam conjugados de glicol na superfície celular, conhecidos como isolectina B4 (IB4) (BOURINET et al., 2014; MOLLIVER et al., 1995; SHIERS et al., 2021) e receptores purinérgicos (por exemplo P2X<sub>3</sub>) (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009). Além disso, um subgrupo específico de células Ret-positivas e negativas para IB4 corresponde as fibras C mecanorreceptoras de baixo limiar que expressam especificamente a tirosina hidroxilase e o transportador vesicular de glutamato VGlut3 (BOURINET et al., 2014; LI et al., 2011; SEAL et al., 2009). No entanto, apesar das claras diferenças entre as duas populações de fibras C, ainda são necessários mais estudos para esclarecer os diferentes tipos funcionais de estímulos que elas podem responder (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; PARICIO-MONTESINOS et al., 2020; SCHOLZ; WOOLF, 2002; SHIERS et al., 2021).

A medula espinhal é considerada o principal centro de processamento sensorial do SNC, pois realiza conexões importantes entre regiões periféricas e supra-espinhais (BOURINET et al., 2014) (**Figura 1C**). A medula espinhal pode ser subdividida em 10 lâminas (I-X), que se estendem da região mais superficial à região mais profunda (D'MELLO; DICKENSON, 2008). As lâminas I-VI formam o corno dorsal da medula espinhal, que contém as terminações centrais dos neurônios aferentes primários, interneurônios envolvidos no processamento sensorial e os neurônios de projeção ou também conhecidos como neurônios de

segunda-ordem (BASBAUM et al., 2009; KUNER, 2010; KUNER; KUNER, 2021). O corno ventral da medula espinhal (localizado nas lâminas mais profundas), por outro lado, contém neurônios envolvidos no controle motor (KUNER; KUNER, 2021; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014) (**Figura 1C**).

A organização laminar do corno dorsal da medula espinhal (I-VI) também sugere papéis funcionais distintos das fibras aferentes primárias e dos interneurônios espinhais. As lâminas I e II (também conhecida como zona marginal e substância gelatinosa, respectivamente), constituem o principal alvo para os nociceptores (fibras nociceptivas A $\delta$  e C). No entanto, vale ressaltar que essas fibras, em menor número, também podem ser projetadas para as lâminas mais profundas do corno dorsal da medula espinhal (D'MELLO; DICKENSON, 2008; KUNER; KUNER, 2021; TODD, 2010). A lâmina II pode ser frequentemente subdividida em duas partes: interna (IIi) e externa (IIo) (BASBAUM et al., 2009; KUNER, 2010). Por exemplo, as fibras C peptidérgicas se projetam para a lâmina I e para a parte mais externa da lâmina II (IIo), enquanto as fibras C não peptidérgicas são direcionadas para a parte mais interna da lâmina II (IIi). Por outro lado, as fibras A $\beta$  (responsivas a estímulos sensoriais inócuos) projetam-se para as lâminas I e IIo, bem como para a região mais profunda do corno dorsal, a lâmina V. Estudos anatômicos e análises eletrofisiológicas demonstraram que as fibras que se projetam na lâmina I geralmente respondem à estímulos nocivos (por exemplos, fibras A $\delta$  e C), enquanto as que se projetam para a lâmina III e V são geralmente responsivos à estimulação inócua (por exemplo, fibras A $\beta$ ) (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; D'MELLO; DICKENSON, 2008; KUNER, 2010; KUNER; FLOR, 2017; TODD, 2010) (**Figura 1C**).

Na região mais superficial do corno dorsal da medula espinhal, lâminas I e II, também são encontradas as células nociceptivas específicas (NS, do inglês *nociceptive specific*), as quais são capazes de fazer sinapses com as fibras A $\delta$  e C, uma vez que elas disparam potenciais de ação quando um estímulo doloroso é detectado na periferia (BOURINET et al., 2014; COGHILL, 2020; D'MELLO; DICKENSON, 2008). Nas lâminas mais profundas, lâmina V, existe outro tipo de neurônio denominado de neurônio de faixa dinâmica ampla (FDA), o qual recebe informações dos três tipos de fibras sensoriais e, portanto, responde a uma ampla gama de estímulos desde o toque leve e a estímulos nocivos (mecânico, térmico e químico) (BOURINET et al., 2014; COGHILL, 2020; D'MELLO; DICKENSON, 2008) (**Figura 1C**). Vale ressaltar que outros tipos células não neuronais são encontrados na medula espinhal como astrócitos e micróglia (células gliais), e também são capazes de influenciar na transmissão da

dor, especialmente sob condições patológicas (D'MELLO; DICKENSON, 2008; FIORE et al., 2023; KUNER, 2010; KUNER; FLOR, 2017).

No corno dorsal da medula espinhal também há presença de interneurônios, os quais compõem a grande parte da população neuronal em todo corno dorsal e estão predominantemente na lâmina I e III (HUGHES; TODD, 2020; SORKIN; TONY, 2013; TODD, 2017). Esses interneurônios podem ser classificados em excitatórios, os quais liberam o neurotransmissor glutamato, e inibitórios que liberam os neurotransmissores ácido gama aminobutírico (GABA, do inglês, *gamma-aminobutyric acid*) e glicina. Sendo assim, os interneurônios são capazes de aumentar ou diminuir a resposta das células NS e FDA, e conseqüentemente tem habilidade de modular a saída do sinal nociceptivo do corno dorsal da medula espinhal (BOURINET et al., 2014; D'MELLO; DICKENSON, 2008; HUGHES; TODD, 2020; SORKIN; TONY, 2013; TODD, 2017).

Para que a experiência sensorial seja iniciada, seja ela inócua ou nociva, é necessário que os estímulos sensoriais sejam reconhecidos na periferia e retransmitidos até o SNC, processo conhecido como transdução sensorial, a qual a energia do estímulo é convertida em correntes iônicas (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; GOLD, 2013). O processo de transdução sensorial é estabelecido a partir da despolarização da membrana neuronal, e pode ser iniciado por três maneiras principais (GOLD, 2013).

Um potencial gerador por ser originado diretamente pela ativação e abertura de canais iônicos, incluindo principalmente os TRPs, canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ), canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC, do inglês *acid-sensing ion channel*), entre outros (BINGHAM et al., 2009; CATERINA et al., 1997; GRACE et al., 2014; JULIUS, 2013). À medida que o estímulo sensorial atinge o limiar crítico de ativação dos canais iônicos, ocorrerá a abertura desses canais expressos na membrana do neurônio sensorial e promoverá a entrada de íons carregados positivamente, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula (GOLD, 2013). O processo de despolarização da membrana neuronal, ou seja, a inversão temporária na sua polaridade (interior da célula se torna positivamente carregado em relação ao exterior), é crucial para o processo de transmissão do impulso nervoso, pois é o primeiro passo na geração de um potencial de ação, que será propagado em direção ao SNC (BASBAUM et al., 2009; GOLD, 2013; MELLO; DICKENSON, 2008). Além disso, diferentes estímulos sensoriais também podem atuar nos GPCRs expressos nos nociceptores, levando a ativação de cascatas de sinalização intracelulares, capazes de modificar a atividade desses canais iônicos e impulsionar o disparo do potencial de ação (GOLD, 2013).

Um segundo mecanismo subjacente ao potencial gerador envolve o fechamento de canais responsáveis por gerar correntes hiperpolarizantes, como os canais de potássio ( $K^+$ ) (ROCHA-GONZÁLEZ; MAO; ALVAREZ-LEEFMANS, 2008). O fechamento dos canais de  $K^+$  é um mecanismo indireto capaz de contribuir para uma corrente despolarizante, devido a distribuição de íons  $K^+$  dentro e fora do neurônio, pois os neurônios nociceptivos apresentam alta concentração intracelular de  $K^+$  (GOLD, 2013; ROCHA-GONZÁLEZ; MAO; ALVAREZ-LEEFMANS, 2008). Dessa maneira, quando ocorre o fechamento dos canais de  $K^+$  permite que o interior do neurônio permaneça mais positivo, facilitando que o potencial de membrana se eleve para um valor acima do limiar de potencial de ação. Vale ressaltar que, para a eficiência desse mecanismo é necessário que uma corrente de despolarização, por exemplo a abertura de canais de  $Na^+$ , esteja simultaneamente ativa (GOLD, 2013; ROCHA-GONZÁLEZ; MAO; ALVAREZ-LEEFMANS, 2008). O terceiro mecanismo é também indireto e depende de uma associação entre um canal iônico capaz de conduzir a despolarização da membrana, e um canal iônico controlado por baixa tensão capaz de empurrar o potencial de membrana acima do limiar de potencial de ação (GOLD, 2013; LIU et al., 2010).

A transmissão dos estímulos sensoriais é transmitida, via potenciais de ação, até o corno dorsal da medula espinhal pelos neurônios aferentes primários (neurônios de primeira ordem). Quando os potenciais de ação atingem os terminais pré-sinápticos no corno dorsal da medula espinhal ocorre conexões com neurônios motores (fibras eferentes, os quais conduzem a informação do SNC para a periferia contribuindo para o reflexo de retirada do membro afetado pelo estímulo potencialmente nocivo) (DERDERIAN; TADI, 2019; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014) (**Figura 1B**).

Além disso, quando os potenciais de ação alcançam os terminais pré-sinápticos no corpo dorsal da medula espinhal, ocorre a abertura dos canais de cálcio dependentes à voltagem (VGCCs, do inglês, *voltage-gated calcium channel*) que contribuem para a exocitose de neurotransmissores excitatórios das vesículas sinápticas. Por exemplo, o glutamato que ao ligar-se em receptores glutamatérgicos pós-sinápticos disparam potenciais pós-sinápticos excitatórios (BASBAUM et al., 2009; BOURINET et al., 2014). O glutamato é capaz de ativar receptores ionotrópicos (canais iônicos) ou metabotrópicos (GPCRs) presentes em neurônios pós-sinápticos. Entre os receptores ionotrópicos, destaca-se o receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e o N-metil-D-aspartado (NMDA), os quais são altamente permeáveis ao íon  $Ca^{2+}$ . Uma vez que o glutamato é liberado do terminal pré-sináptico, ocorre ativação destes receptores e um maior influxo de  $Ca^{2+}$  para dentro do neurônio pós-sináptico, resultando na despolarização da membrana, que possui papel fundamental na plasticidade



sináptica no corno dorsal da medula espinhal (KUNER; KUNER, 2021; LARSSON, 2009; TONG; KAFTAN; MACDERMOTT, 2008). Curiosamente, embora os receptores sensíveis ao glutamato estejam majoritariamente presentes nos terminais centrais dos aferentes primários, onde contribuem para a transmissão sináptica na medula espinhal, eles também são encontrados na periferia, onde podem impulsionar a geração do potencial de ação (GOLD, 2013; PARK; HAN, 2022).

A composição das substâncias liberadas no corno dorsal da medula espinhal depende do tipo de fibra que será ativada. Dependendo do estímulo, algumas fibras nervosas sensoriais também liberam o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), trifosfato de adenosina (ATP, do inglês *Adenosine triphosphate*), quimiocinas, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), entre outros. Uma vez liberados, eles se ligam aos seus respectivos receptores sinápticos nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal e/ou aos seus receptores expressos em células não neuronais da medula espinhal (BASBAUM et al., 2009; FIORE et al., 2023). Ademais, após a ativação das fibras C peptidérgicas ocorre a liberação de SP e CGRP que ativam seus respectivos GPCRs, conhecidos como receptor de neurocinina 1 (NK1, do inglês, *neurokinin 1*) e receptor de calcitonina 1 e 2 (CGRP-1 e CGRP-2), expressos tanto a nível periférico quanto central (BINGHAM et al., 2009; CHOI; DI NARDO, 2018; SHIERS et al., 2021). À nível periférico, a liberação desses neuropeptídeos causa uma forma específica de inflamação, conhecida como inflamação neurogênica. Esse tipo específico de inflamação gera um aumento na permeabilidade vascular com subsequente extravasamento plasmático e edema, acúmulo de células inflamatórias, especialmente neutrófilos, e liberação de diversos mediadores inflamatórios (CHOI; DI NARDO, 2018; GEPPETTI et al., 2008).

Esse processo inflamatório periférico pode promover uma redução do limiar de ativação e a amplificação da resposta dos nociceptores periféricos, fenômeno denominado como sensibilização periférica. Uma vez estabelecida a sensibilização periférica, os nociceptores são capazes de amplificar a inflamação local, liberando mais neurotransmissores que junto com os mediadores inflamatórios liberados por células inflamatórias infiltradas e ativadas são capazes de atrair mais células inflamatórias, contribuindo para exacerbar ainda mais o processo inflamatório. Consequentemente, ocorre um aumento da eficácia sináptica no corno dorsal da medula espinhal gerando uma resposta aumentada dos neurônios nociceptivos do SNC, provocando a denominada sensibilização central (BASBAUM et al., 2009; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; JAYAKAR et al., 2021; MCCABE, 2004).

Uma vez ocasionada a sensibilização central, o SNC pode amplificar a dor, aumentando seu grau, duração e extensão (plasticidade sináptica) (KUNER; KUNER, 2021; WOOLF, 2010). A liberação de neuropeptídeos a nível de SNC contribuí ainda mais para o aumento dos níveis de glutamato, causando assim um feedback positivo e uma exacerbação da plasticidade sináptica (BINGHAM et al., 2009; CHOI; DI NARDO, 2018; KUNER; KUNER, 2021). Dessa forma, a liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos facilitam a sinapse dos neurônios aferentes primários com os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009).

O neurônio de segunda ordem ascende o sinal nociceptivo da medula espinhal (*espino*) até o tálamo (região cerebral; *talâmica*) lateral, posterior e medial, pela via denominada *espinotalâmica* (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; KUNER; KUNER, 2021) (**Figura 1D**). No tálamo lateral, constituído pelo núcleo talâmico lateral posterior e núcleo ventral posterior inferior, os neurônios de terceira ordem se projetam para diferentes regiões corticais, como o córtex somatossensorial primário (CS1) ou secundário (CS2). As projeções do tálamo lateral para as regiões do CS1 e CS2 medeiam o aspecto sensorial-discriminativo da dor, por exemplo, "quando, onde e quão forte". Sabe-se que a localização e a intensidade do estímulo nocivo são identificadas pelo CS1, enquanto o tipo do estímulo (por exemplo, térmico ou mecânico) é determinado no CS2. Além disso, grande parte das fibras da *via espinotalâmica* tem como alvo o tálamo posterior, constituído pelo núcleo posterior, núcleo supragenículado e o núcleo pulvinar anterior. Atualmente sabe-se que as projeções da *via espinotalâmica* para o núcleo pulvinar anterior estão relacionadas com a dor pós-AVC (VARTIAINEN et al., 2016) e as respostas frente à estímulos dolorosos na pele (BASTUJI et al., 2016). Ao passo que, o núcleo posterior tem projeções para a ínsula posterior (DUM; LEVINHAL; STRICK, 2009), contribuindo para os aspectos cognitivos da dor e para a geração da percepção dolorosa (BASBAUM et al., 2009; KUNER; KUNER, 2021). Finalmente, as fibras da *via espinotalâmica* também podem se projetar para o tálamo medial, constituído pelo núcleo mediodorsal, núcleo lateral central e o núcleo parafascicular. As células retransmissoras desses núcleos projetam-se principalmente para o córtex cingulado e córtex pré-frontal (DUM; LEVINHAL; STRICK, 2009; KUNER; KUNER, 2021). Assim, essas projeções medeiam aspectos motores, orientação atencional e o componente emocional da percepção da dor. Juntos, a ativação do tálamo medial pode desencadear a atividade do córtex cingulado anterior, contribuindo para a qualidade emocional e aversiva da percepção da dor (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; KUNER; KUNER, 2021).

A outra via capaz de conduzir estímulos do corno dorsal da medula espinhal (*espino*) ao córtex insular e cingulado, através de conexões no núcleo parabraquial (tronco encefálico; *parabraquial*) e na amígdala (*amígdala*) é a *via espinoparabraquial-amígdaloide*, e representa um caminho direto para o sistema límbico (**Figura 1E**). Ambas as estruturas, o córtex cingulado e amígdala, fazem parte do sistema límbico, onde as dimensões afetivo-emocionais da dor são processadas. O descontentamento e o sofrimento relacionados à dor são reconhecidos pela região anterior do córtex cingulado, enquanto a aversão emocional e a reação autonômica ao estímulo que evoca a dor, são determinados no córtex insular (BASBAUM et al., 2009; KUNER; KUNER, 2021). É importante ressaltar que vários outros sistemas, como diversas projeções para o hipocampo, hipotálamo e potencialmente outras vias através do tronco cerebral, também podem contribuir para a percepção multifacetada da dor gerada no córtex (KUNER; KUNER, 2021).

O processamento espinhal das informações nociceptivas está sob poderoso controle inibitório e facilitatório, que partem de diferentes locais do tronco cerebral com longas projeções descendentes até o corno dorsal espinhal, conhecidas como modulação dos circuitos descendentes da dor (JULIUS; BASBAUM, 2001; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). A substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *periaqueductal gray matter*) localizada no tronco encefálico, é a primeira região cerebral elucidada como parte do sistema modulatório da dor. Sua localização no tronco encefálico é primordial para que essa região exerça um forte controle descendente da dor, pois essa região é responsável por integrar múltiplas regiões corticais que receberam os estímulos nociceptivos ascendentes, como o córtex somatossensorial, córtex pré-frontal, córtex insular, córtex cingulado anterior, amígdala e hipotálamo (BINGHAM et al., 2009; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014).

Além disso, a PAG realiza conexões com a medula rostroventromedial (RVM, do inglês *rostral ventromedial medulla*) localizada na parte inferior do tronco encefálico, considerada o transmissor final da via descendente, uma vez que essa região irá projetar-se diretamente para corno dorsal da medula espinhal (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014) (**Figura 1F**). A RVM exerce um efeito modulador bidirecional da dor, tanto inibindo quanto facilitando a dor. Esses efeitos da via descendente da dor são mediados pela existência de dois tipos de neurônios encontrados na RVM, conhecidos como células “liga” (on) e células “desliga” (off). Quando ativas as células on são capazes de facilitar a transmissão nociceptiva e assim causar a hiperalgesia (aumento da sensibilidade dolorosa frente à estímulos nocivos), e as células off quando ativas são capazes inibir a transmissão nociceptiva e assim produzir um efeito antinociceptivo. Esse efeito de ativação das células off é necessário para as ações

analgésicas dos opióides endógenos ou quando administrados por microinjeção na RVM (PAN; FIELDS, 1996; SALAS et al., 2016). Ambos os neurônios, on e off, partem da RVM e projetam-se amplamente até o corno dorsal da medula espinhal, especificamente para as lâminas I, II e V (FIELDS; MALICK; BURSTEIN, 1995; VANEGAS; BARBARO; FIELDS, 1984 ). Como resultado, esses neurônios são capazes de provocar uma modulação positiva ou negativa, respectivamente, na transmissão dolorosa (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014).

Entre as várias populações de axônios que se projetam do encéfalo para a medula espinhal, os neurônios monoaminérgicos (serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgicos) têm atraído atenção especial, pois eles têm sido considerados uma via alternativa para a modulação da transmissão dolorosa a partir da via descendente da dor (BENARROCH, 2008). Atualmente, o que se sabe é que os axônios serotoninérgicos se originam no núcleo magnus da rafe (constituente da RVM, localizado no tronco cerebral), enquanto os neurônios positivos para noradrenalina e dopamina são originados no locus coeruleus e da área tegmental ventral (ambos constituintes do tronco cerebral), respectivamente. Esses axônios projetam-se e são amplamente distribuídos por todo corno dorsal da medula espinhal, mas são encontrados em maiores quantidades nas lâminas I e II (BENARROCH, 2008; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005).

A via monoaminérgica descendente a qual inclui neurônios positivos para serotonina, noradrenalina ou dopamina, age em diferentes subtipos de receptores capazes de inibir ou facilitar a transmissão nociceptiva a nível de corno dorsal da medula espinhal (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Uma vez que neurônios positivos para monoaminas e as células on e off são capazes de modular a transmissão nociceptiva, sugere-se que o desequilíbrio na ativação/inibição da via descendente da dor seja capaz de alterar a resposta nociceptiva frente a um estímulo nocivo periférico, e essas alterações poderiam sustentar diferentes estados patológicos da dor. Portanto, a via descendente da dor representa um importante alvo farmacológico para o manejo da dor (BENARROCH, 2008; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014).

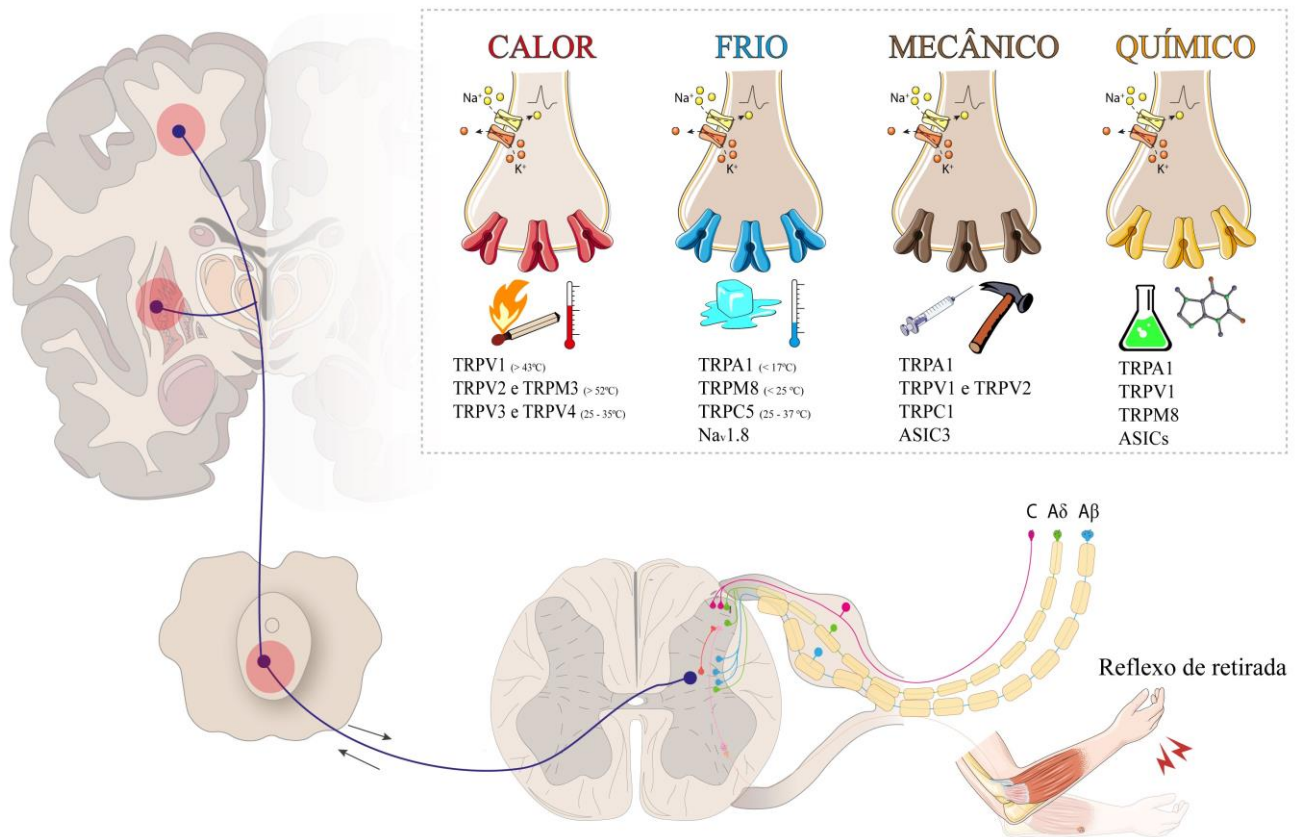
### **2.2.1. Tipos de dor**

A dor pode ser classificada quanto a sua duração e suas características em dor aguda e dor crônica. A dor aguda é de curta duração e geralmente resultante de uma lesão tecidual recente em uma parte específica do corpo. Esse tipo de dor é restrito ao local da lesão, pode durar segundos, minutos, horas ou até algumas semanas, mas apresenta uma duração limitada

e desaparece à medida que a lesão se cura. Ao contrário, a dor crônica é considerada uma dor patológica, que persiste por um período prolongado, persistindo após o período de cura e pode não ter uma causa claramente identificável (JAYAKAR et al., 2021; JULIUS; BASBAUM, 2001; KUNER, 2010; KUNER; FLOR, 2017; KUNER; KUNER, 2021). A dor em si é bastante complexa, e pode ser resultado de diversos mecanismos moleculares e celulares que operam isoladamente ou em conjunto, tanto ao nível de sistema nervoso central quanto periférico, para produzir as diferentes formas de dor, a dor nociceptiva, inflamatória, nociplástica e neuropática (BASBAUM et al., 2009; JAYAKAR et al., 2021; SCHOLZ; WOOLF, 2002; WOOLF, 2010). Dessa forma, a dor não é um fenômeno unitário, e, portanto, não existe e nem deve existir uma única classe de analgésicos universalmente eficazes. Em vez disso, é crucial compreender que existem quatro subtipos principais de dor com subgrupos adicionais dentro de cada subtipo, cada uma podendo exigir intervenções terapêuticas distintas (COHEN; VASE; HOOTEN, 2021; COLLOCA et al., 2017; WOOLF, 2020).

#### 2.2.1.1 Dor Nociceptiva

A dor nociceptiva é conhecida por atuar como um sistema de proteção fisiológica e/ou alerta precoce, essencial para a sobrevivência do organismo, pois esse tipo de dor é capaz detectar e minimizar o contato do tecido afetado com estímulos potencialmente perigosos ou nocivos. A dor nociceptiva é o tipo de dor que sentimos ao tocar em algo muito quente ou muito frio, tocar em um objeto afiado ou pontiagudo, ou seja, é quando diferentes estímulos nocivos de alto limiar são capazes de agir sobre as fibras aferentes primárias (fibras A $\delta$  e C), e assim, desenvolver a dor nociceptiva (BASBAUM et al., 2009; JAYAKAR et al., 2021; PRESCOTT; RATTÉ, 2017; SCHOLZ; WOOLF, 2002; WOOLF, 2010, 2020; WOOLF; MA, 2007) (**Figura 2**). A ativação dos nociceptores causa reflexos de retirada protetores e chama a nossa atenção de maneira imediata, o que nos ajuda a aprender quais os estímulos que são perigosos e que devem, no futuro, ser evitados (BASBAUM et al., 2009; PRESCOTT; RATTÉ, 2017). Com isso, a dor nociceptiva é considerada uma resposta normal do organismo frente a insultos nocivos a fim de evitar danos teciduais (BASBAUM et al., 2009; DAI, 2016; JAYAKAR et al., 2021; PRESCOTT; RATTÉ, 2017; WOOLF, 2020).



**Figura 2 – Mecanismo da dor nociceptiva.** O reconhecimento da dor nociceptiva ocorre por meio de canais iônicos sensíveis a estímulos térmicos (calor ou frio), mecânicos ou químicos, localizados na periferia das fibras sensoriais primárias. A informação nociceptiva é reconhecida e conduzida até a medula espinal e regiões corticais, onde a informação nociceptiva é processada como um sinal doloroso. Adaptado de Dai (2016). Partes da Figura foram elaboradas usando imagens da Servier Medical Art, fornecidas pela Servier, licenciadas sob uma licença não-portada Creative Commons Attribution 3.0.

Uma vez que a dor nociceptiva serve como um importante mecanismo de defesa para o indivíduo, a deficiência deste sistema de proteção pode resultar em sérios problemas. Há estudos que demonstram que a doença denominada insensibilidade congênita ou indiferença à dor é devido à rara deleção do gene *SCN9A*, gene que codifica o canal de  $\text{Na}^+$  dependente de voltagem 1.7 ou gera a perda de função do receptor de tropomiosina TrkA. Indivíduos com deleção desse gene normalmente danificam a língua e os lábios ao comer, os dedos das mãos ao explorar objetos, ou não reconhecem quando quebram um membro, o que reduz a expectativa de vida e pode levar a morte precoce (BENNETT; WOODS, 2014; DRISSI; WOODS; WOODS, 2020; SUN et al., 2020). Por outro lado, a super expressão desse gene pode resultar na hiperexcitabilidade dos neurônios no corno dorsal da medula espinal, resultando em dor

intensa. Em vista disso, a dor nociceptiva é uma dor essencial para manter a integridade corporal (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; WOOLF; MA, 2007).

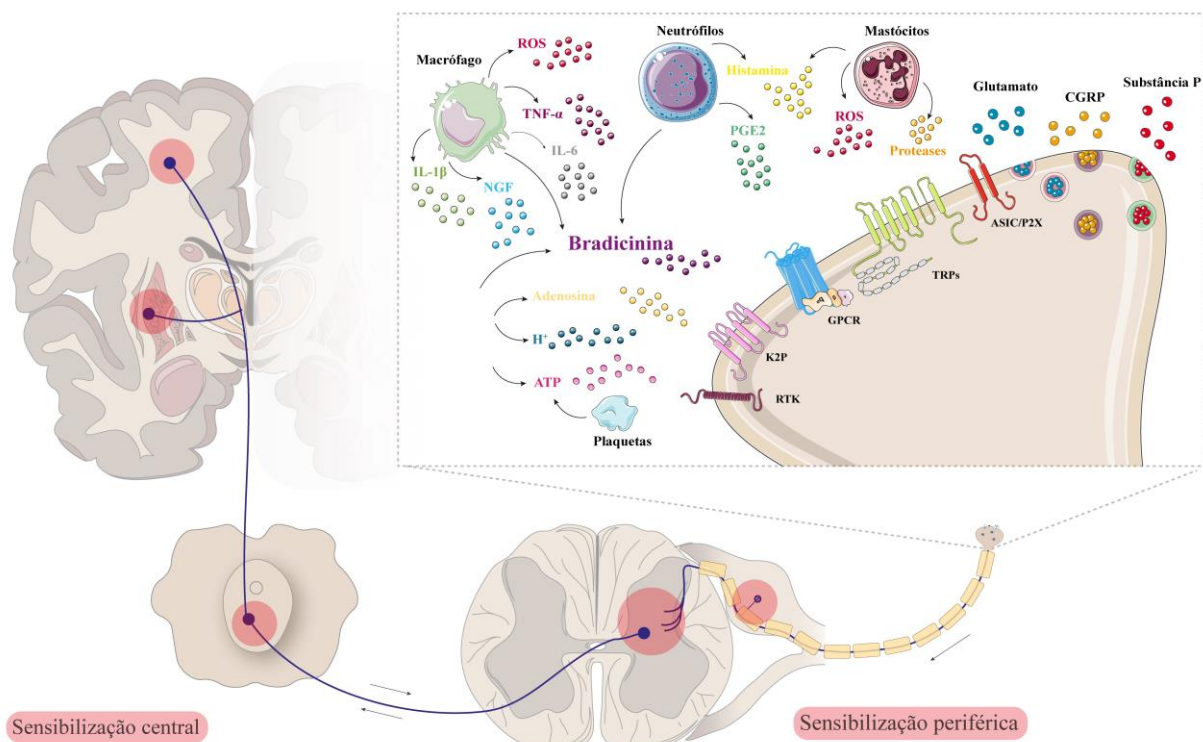
As fibras A $\delta$  e C são as responsáveis por detectar periféricamente os estímulos ambientais nocivos (térmico, mecânico ou químico) por meio de receptores específicos ou canais iônicos sensíveis a esses estímulos. Assim a informação nociceptiva é conduzida por meio de potenciais de ação até a medula espinhal e posteriormente até regiões corticais, onde a informação nociceptiva é processada como um sinal doloroso (BINGHAM et al., 2009; SCHOLZ; WOOLF, 2002). Canais iônicos são fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da dor nociceptiva (BASBAUM et al., 2009; DAI, 2016) (**Figura 2**). Nos últimos anos, os canais iônicos, como os canais de Na<sup>+</sup>, TRPs e ASIC têm sido identificados como receptores-chave para a transmissão da dor nociceptiva (DAI, 2016; HWANG; OH, 2007; VOLKERS; MECHIOUKHI; COSTE, 2014). Juntos, esses canais atuam como sensores de vários estímulos, uma vez que estímulos exógenos térmicos, mecânicos e químicos são capazes de ativá-los direta ou indiretamente e contribuir para percepção da dor nociceptiva (BASBAUM et al., 2009; DAI, 2016; VRIENS; NILIUS; VOETS, 2014). Preservar a dor nociceptiva é essencial, e por isso que normalmente não se planeja sua intervenção terapêutica, exceto durante ou após a cirurgia ou imediatamente após grandes traumas (JAYAKAR et al., 2021; WOOLF, 2020).

#### 2.2.1.2 Dor inflamatória

A dor inflamatória difere da dor nociceptiva, pois ela não tem como objetivo somente proteger o organismo frente a um estímulo potencialmente nocivo e sim, lidar com as consequências causadas pelo dano tecidual a fim de contribuir para a cura e reparo da parte do corpo lesionado (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; JAYAKAR et al., 2021). A dor inflamatória, ocorre como parte da resposta normal do hospedeiro contra patógenos ou após um dano tecidual, incluindo aquela causada por estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Esse tipo de dor é resultante de uma resposta inflamatória, evento onde as células e mediadores inflamatórios colaboram para neutralizar e eliminar os estímulos prejudiciais e permitir a manutenção da homeostasia tecidual (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; JAYAKAR et al., 2021; MATSUDA; HUH; JI, 2019; WOOLF, 2020).

O contato do organismo frente a um patógeno ou o dano tecidual pode causar alterações fisiológicas nos neurônios sensoriais primários, recrutamento e ativação de células não neuronais (por exemplo, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, e entre outros), ocasionando

a liberação de diversos mediadores pró-algésicos endógenos (como a substância P, CGRP, bradicinina, prostaglandinas, NGF, ATP, histamina, proteases e entre outros), as quais compõem o fenômeno conhecido como “sopa inflamatória” (**Figura 3**). A liberação desses mediadores inflamatórios gera a ativação direta ou indireta dos nociceptores, sensibilizando os terminais periféricos, e conseqüentemente promovendo uma redução do limiar de ativação dos nociceptores, promovendo a sensibilização periférica (BINGHAM et al., 2009; JAYAKAR et al., 2021; VOSCOPOULOS; LEMA, 2010; WOOLF, 2020). A sensibilização periférica possibilita que um estímulo de baixa intensidade, que normalmente não seria percebido como doloroso passe a ser nocivo (alodinia) e estímulos nocivos que já são dolorosos passem a ser detectados de forma mais exagerada e prolongada (hiperalgesia). Uma vez estabelecida a sensibilização periférica, os nociceptores sensibilizados causam uma maior liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores excitatórios no corno dorsal da medula espinhal, amplificando a inflamação local e excitabilidade sináptica e assim, ocasionado a sensibilização central (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009) (**Figura 3**).



**Figura 3 – Mecanismos da dor inflamatória.** A dor inflamatória é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios pelos nociceptores ativados ou células não neuronais que residem ou se infiltram na área lesionada. Esses mediadores incluem histamina, glutamato, ATP, adenosina, bradicinina, prostaglandinas (por exemplo, PGE2), tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides, fator de crescimento nervoso (NGF), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), proteases, espécies reativas de oxigênio (ROS), substância P,



CGRP, ocasionando um fenômeno denominado como “sopa inflamatória”. Esses fatores podem ativar indireta ou diretamente os neurônios sensoriais, ligando-se a um ou mais receptores de superfície celular, promovendo uma redução do limiar de ativação dos nociceptores, ocasionando a sensibilização periférica. Quando ocorre a sensibilização periférica, os nociceptores são capazes de causar uma maior liberação de neuropeptídeos (SP e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, CGRP) e neurotransmissores excitatórios (glutamato) no corno dorsal da medula espinhal, amplificando a inflamação local e assim, contribuindo para o aumento da excitabilidade da membrana neuronal e eficácia sináptica no corno dorsal, fenômeno denominado de sensibilização central. Adaptado de Scholz e Woolf (2002). Partes da Figura foram elaboradas usando imagens da Servier Medical Art, fornecidas pela Servier, licenciadas sob uma licença não-portada Creative Commons Attribution 3.0.

Normalmente, a dor inflamatória desaparece após a resolução da lesão tecidual inicial. No entanto, em dores inflamatórias crônicas, a dor contínua não é adaptativa porque a inflamação não desaparece e a cura não ocorre (JAYAKAR et al., 2021; KUNER; KUNER, 2021). Nessas situações, a combinação de inflamação crônica e dor contínua constitui um grande problema clínico a ser controlado, podendo a dor ser considerada mal-adaptativa ou patológica (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; JAYAKAR et al., 2021; MINHAS; CLAUW, 2021). A dor persiste enquanto a inflamação estiver ativa devido às diferentes alterações neuronais. A plasticidade ou remodelamento do processamento neuronal podem variar dependendo do tipo de dor e das contribuições relativas de fatores periféricos e centrais (KUNER; KUNER, 2021), porém atualmente se sabe que é um dos principais fatores da transição da dor aguda para um estado de dor crônica (KUNER; KUNER, 2021; VOSCOPOULOS; LEMA, 2010). A neuroplasticidade é responsável pelas alterações funcionais dos nociceptores, as quais podem ser divididas em modulação ou modificação. A modulação é caracterizada por mudanças reversíveis na excitabilidade dos neurônios sensoriais primários e centrais por modificação química de receptores e canais iônicos, levando uma maior ativação de cascatas de transdução sensorial. Por outro lado, a modificação representa alterações mais duradouras na expressão de transmissores, receptores e canais iônicos ou na sua estrutura, maior interação e sobrevivência dos neurônios. Juntos, todas essas alterações contribuem para a transição da dor aguda para a dor crônica (KUNER; KUNER, 2021; VOSCOPOULOS; LEMA, 2010).

Atualmente, não há disponível no mercado uma única modalidade terapêutica capaz de reverter completamente o processo inflamatório e os sintomas dolorosos observados nas dores inflamatórias (JAYAKAR et al., 2021; KUNER, 2010; WOOLF, 2020). A principal abordagem dos tratamentos farmacológicos disponíveis no mercado envolve inibir a síntese ou o acúmulo de moléculas de sinalização liberadas nos locais da lesão. Dessa forma, a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais, que bloqueiam a síntese de prostaglandina E2 (PGE2), bem como anticorpos anti-fator TNF- $\alpha$  ou anti-IL-1 são recomendados para o tratamento desse

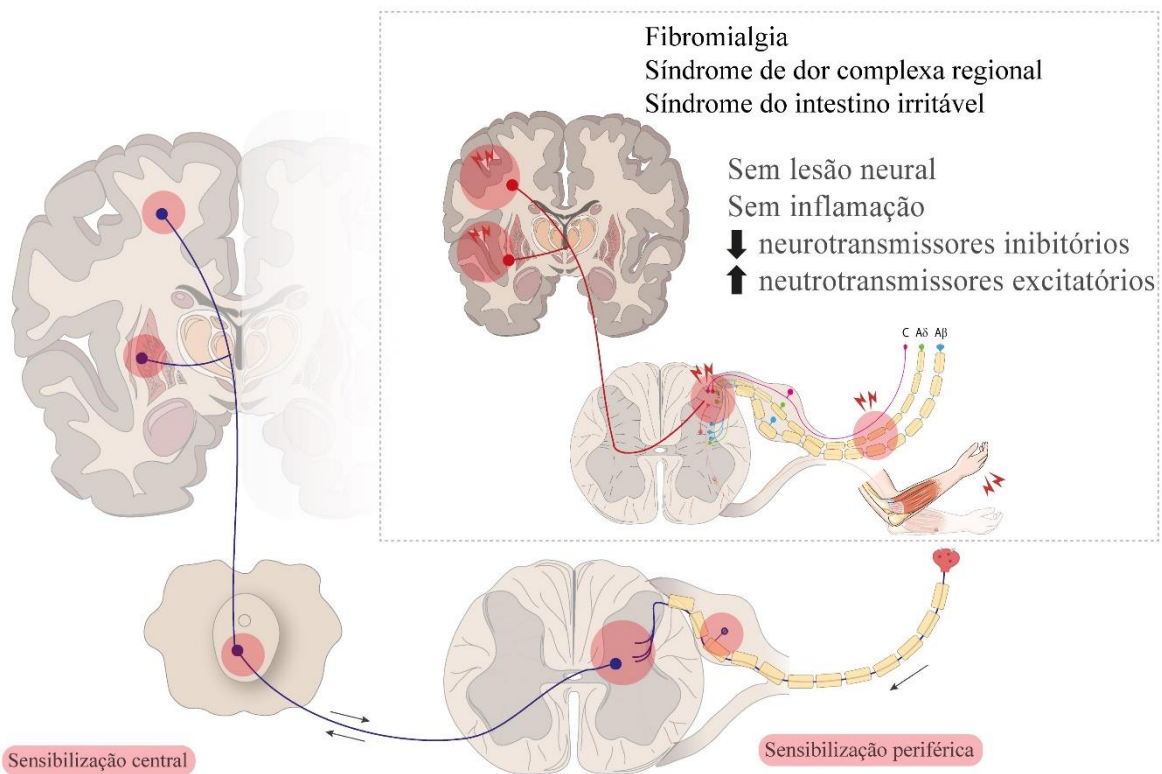
tipo de dor (JAYAKAR et al., 2021; POGATZKI-ZAHN; CHANDRASENA; SCHUG, 2014; VILLARREAL et al., 2013; WOOLF, 2020). Além disso, a manipulação farmacológica com diferentes classes de antidepressivos têm alcançado destaque no manejo clínico da dor inflamatória crônica (KUNER, 2010; KUNER; KUNER, 2021). No entanto, os analgésicos atualmente disponíveis apresentam vários problemas importantes, incluindo baixa eficácia e múltiplos efeitos adversos (JANG et al., 2021; MCANALLY; BONNET; KAYE, 2020; MOORE et al., 2015). Neste sentido, existe uma enorme necessidade de melhorar a seletividade dos mecanismos de dor a fim de reduzir os efeitos adversos, e ampliar a ação para melhorar a eficácia (WOOLF, 2020).

### 2.2.1.3 Dor Nociplástica

Antigamente acreditava-se que a dor crônica poderia surgir através de duas fontes principais: nociceptiva, associada a uma entrada contínua de uma lesão tecidual real ou ameaçada, ou neuropática, causada por uma lesão ou doença que afeta o sistema nervoso somatossensorial. Esses preceitos deixaram outras condições de dor crônica, com fenótipos bem característicos, mas sem evidência clara de envolvimento nociceptivo ou neuropático sem um termo bem definido (AYDEDE; SHRIVER, 2018; FITZCHARLES et al., 2021; KOSEK et al., 2016). Baseado nisso, a IASP implementou o termo dor nociplástica, ou também conhecida como disfuncional, para definir a “dor que surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara ou ameaça de dano tecidual real causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial causando a dor” (KOSEK et al., 2016; RAJA et al., 2020). Dessa forma, o termo “dor nociplástica” tem sido amplamente aplicado para definir dores crônicas causadas por um processamento nociceptivo alterado, como fibromialgia, síndrome de dor complexa regional, síndrome do intestino irritável e outros distúrbios de dor visceral “funcionais” (FITZCHARLES et al., 2021; JAYAKAR et al., 2021; KOSEK et al., 2016).

As bases mecanicistas subjacentes a esse tipo de dor não são totalmente elucidadas (KOSEK et al., 2016; RAJA et al., 2020). No entanto, baseado em diferentes evidências, os mecanismos atualmente conhecidos podem ser divididos em três principais categorias (BUŁDYŚ et al., 2023) (**Figura 4**). A primeira inclui mecanismos supraespinhais, como uma hiperexcitabilidade à estímulos sensoriais nocivos, hiperatividade e aumento da conectividade entre as regiões do cérebro responsáveis pela percepção dolorosa (FITZCHARLES et al., 2021; HASHMI et al., 2013). Além disso, uma diminuição da atividade e da conectividade das áreas cerebrais responsáveis pela inibição da dor (como diminuição da sinalização GABAérgica) e

aumento da concentração de substância P também são mecanismos supraespinhais observados (FITZCHARLES et al., 2021). A segunda categoria inclui mecanismos espinhais, como neuroplasticidade na medula espinhal, transmissão sináptica amplificada, diminuição da atividade de interneurônios inibitórios espinhais e ativação do sistema imunológico entre as células não neuronais (células gliais) na medula espinhal (FITZCHARLES et al., 2021; HIRAGA et al., 2022; POPKIROV et al., 2020). A terceira categoria inclui mecanismos periféricos relacionados a uma super expressão de receptores e canais iônicos nos nociceptores e a um acoplamento entre os sistemas nervosos periférico e simpático (FITZCHARLES et al., 2021). Dessa forma, os sintomas observados na dor nociplástica englobam uma dor multifocal generalizada ou intensa, ou ambas, bem como sintomas comórbidos, como fadiga, distúrbios do sono, distúrbios cognitivos, hipersensibilidade a estímulos ambientais, ansiedade e humor deprimido (FITZCHARLES et al., 2021; KOSEK et al., 2016).



**Figura 4 – Mecanismos da dor nociplástica.** Não há estímulo nocivo ou inflamação detectável ou dano ao sistema nervoso. A dor nociplástica consiste em uma amplificação sensorial anormal ocasionada por diferentes alterações moleculares a nível de sistema nervoso periférico e central. Partes da Figura foram elaboradas usando imagens da Servier Medical Art, fornecidas pela Servier, licenciadas sob uma licença não-portada Creative Commons Attribution 3.0.

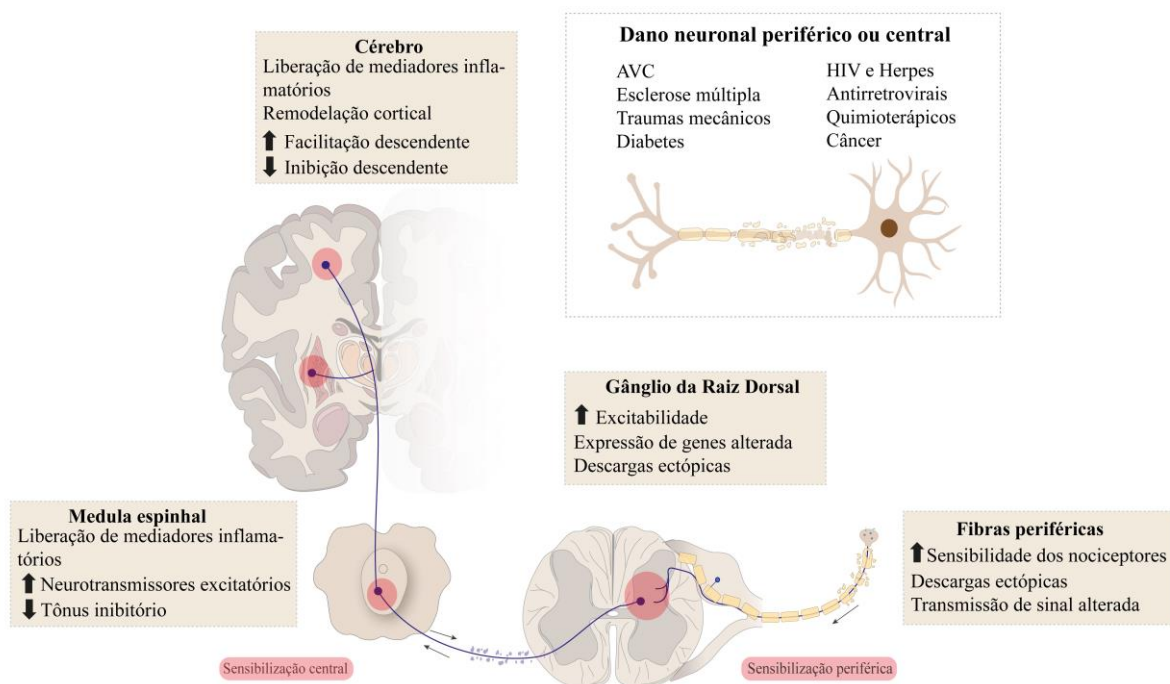
Dessa maneira, além do alívio da dor, o tratamento da dor nociplástica deve incluir a melhoria da função e o alívio das comorbidades (FITZCHARLES et al., 2021). Os tratamentos para a dor nociplástica são idealmente multimodais, compreendendo terapias não farmacológicas e farmacoterapia. Analgésicos tradicionais, como relaxantes musculares, anti-inflamatórios não esteroidais, paracetamol e opióides, são menos eficazes para a dor nociplástica do que para a dor inflamatória. Alguns medicamentos receberam aprovação regulatória para algumas condições nociplásticas, por exemplo, gabapentinóides. No entanto, os mecanismos patofisiológicos que contribuem para a dor nociplástica ainda são escassos, e os medicamentos atualmente aprovados para o seu tratamento não apresentam um efeito clinicamente satisfatório (FITZCHARLES et al., 2021).

#### 2.2.1.4 Dor Neuropática

A dor neuropática é conhecida por ser uma dor que não é protetora, e sim mal-adaptativa, resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso. Esse tipo de dor não é consequência de um sintoma de algum distúrbio, mas sim de um estado de doença patológico capaz de causar lesões no sistema nervoso somatossensorial (FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021; SCHOLZ et al., 2019). A dor neuropática pode ser resultado de lesões centrais, resultante de um acidente vascular cerebral ou esclerose múltipla ou lesões periféricas, ocasionadas por traumas mecânicos, doenças metabólicas como o diabetes, produtos químicos neurotóxicos e infecção, bem como, associados ao próprio câncer ou ao tratamento quimioterápico, entre outros (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; DEVOR, 2013; FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021; GILRON; BARON; JENSEN, 2015). A dor neuropática é frequentemente caracterizada por sintomas comuns de um estado doloroso como alodinia e hiperalgesia e sintomas peculiares, como parestesia (sensações cutâneas, como frio, calor, formigamento, agulhadas e adormecimento) e disestesia (enfraquecimento ou alteração na sensibilidade dos sentidos, como do tato) (COLLOCA et al., 2017; DEVOR, 2013; FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021).

Uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial leva a uma transmissão alterada e desordenada dos sinais sensoriais. Quando um dano é gerado no sistema nervoso somatossensorial, alterações estruturais e funcionais dos nociceptores são observadas. Por exemplo alterações em canais iônicos, com aumento da função dos canais de  $\text{Na}^+$  levando ao aumento da excitabilidade neuronal, juntamente com uma perda de canais de  $\text{K}^+$ , que normalmente contribuem para modular a atividade neuronal (BANNISTER et al., 2020; COLLOCA et al., 2017; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Além disso, no terminal

central dos nociceptores, ocorre um aumento na expressão e função de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a liberação de neurotransmissores excitatórios. Essas alterações moleculares nos nociceptores desencadeiam potenciais de ação ectópicos, onde as fibras danificadas ou intactas se tornam hiperexcitáveis. Ao passo que a sensibilização periférica induz a formação de descargas ectópicas, múltiplas alterações podem estar ocorrendo centralmente, incluindo um desequilíbrio entre a sinalização central excitatória e inibitória, de modo que os interneurônios inibitórios e o sistema de controle descendente da dor fiquem comprometidos. Além disso, ocorre uma regulação negativa dos receptores opióides e GABA e dos interneurônios no corno dorsal da medula espinhal, resultando na “desinibição” da dor e facilitando a transmissão de sinais sensoriais a nível de SNC (COLLOCA et al., 2017; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; DEVOR, 2013; FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021; WOOLF, 2010) (**Figura 5**).



**Figura 5 – Mecanismos da dor neuropática.** Diferentes condições podem afetar o sistema nervoso periférico ou central, como acidente vascular cerebral (AVC), esclerose múltipla, traumas mecânicos, infecções virais (HIV e herpes), antirretrovirais, quimioterápicos ou câncer e causar a dor neuropática. Após a lesão nervosa são observadas diferentes alterações nas fibras periféricas, gânglio da raiz dorsal, medula espinhal e cérebro, que facilitam a transmissão de sinais sensoriais a nível de sistema nervoso periférico e central. Adaptado de Meacham et al. (2017). Partes da Figura foram elaboradas usando imagens da Servier Medical Art, fornecidas pela Servier, licenciadas sob uma licença não-portada Creative Commons Attribution 3.0.

Atualmente estima-se que cerca de 5-7% da população mundial sofra de dor neuropática (BANNISTER et al., 2020; SCHOLZ et al., 2019). Embora sua prevalência seja

alta, o tratamento para pacientes que sofrem de dor neuropática muitas vezes não são bem-sucedidos e muitos não recebem analgesia eficaz no seu regime de tratamento da dor, resultando em uma grave incapacidade física e impactos negativos na qualidade de vida (BANNISTER et al., 2020; FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021; TORRANCE et al., 2013). A dor neuropática se torna importante no cenário de pacientes diagnosticados com câncer, pois uma porção significativa de pacientes possui o risco de desenvolver essa condição dolorosa devido a uma lesão neuronal induzida pelo próprio tumor ou sua metástase, ou devido as intervenções terapêuticas após o diagnóstico (procedimentos cirúrgicos, radioterapia e/ou tratamento antineoplásico) (BENNETT et al., 2019; MANTYH, 2006).

#### 2.2.1.5 Dor associada ao câncer

Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que incidência do câncer vem aumentando a cada ano, causando altas taxas de morbidade e mortalidade (WHO, 2020). Em 2020, cerca de 19,3 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes por câncer ocorreram no mundo todo (SUNG et al., 2021). Apesar da crescente prevalência do câncer, melhorias no diagnóstico e no tratamento tem resultado em um aumento significativo nas taxas de sobrevivência, de modo que mesmo os pacientes diagnosticados com câncer avançado sobrevivem anos ou décadas após o diagnóstico inicial (MANTYH, 2006; SUNG et al., 2021). Embora a dor associada ao câncer é um dos sintomas iniciais mais comuns que resulta no seu diagnóstico, o termo “dor do câncer” pode ser sugestivo, uma vez que essa dor pode ser ocasionada por diversos fatores que podem englobar mecanismos inflamatórios e neuropáticos (BENNETT et al., 2019; MANTYH, 2006).

A dor associada ao câncer pode estar relacionada a uma lesão neuronal direta pelo tumor primário ou metástases ou mediadores derivados de células tumorais e inflamatórias, capazes de ativar e sensibilizar os nociceptores (BENNETT et al., 2019; MANTYH, 2006). Além disso, em pacientes com câncer, ser submetido a uma cirurgia ou receber regime de tratamento completo de radioterapia ou quimioterapia é um dos fatores mais importantes na determinação da sobrevivência (BENNETT et al., 2019; MANTYH, 2006). No entanto, a neurotoxicidade sobre os neurônios periféricos e a dor que os acompanha são os principais efeitos adversos da radioterapia e de muitos agentes antineoplásicos, incluindo taxanos (por exemplo, paclitaxel e docetaxel), alcalóides da vinca (por exemplo, cisplatina e oxaliplatina) e inibidores da aromatase (por exemplo, anastrozol, letrozol e exemestano) (BENNETT et al., 2019; COLVIN, 2019; LAROCHE et al., 2014; STAROBOVA; VETTER, 2017; WAS et al., 2022).

As estratégias de manejo da dor em pacientes com câncer são consideradas um desafio clínico, e incluem equilibrar a dor e os efeitos adversos da analgesia para melhorar a qualidade de vida (BENNETT et al., 2019; OLDENMENGER et al., 2009). A utilização da escada analgésica foi primeiramente recomendada pela Organização Mundial da Saúde como protocolo de tratamento para proporcionar alívio da dor em pacientes com câncer (VENTAFRIDDA et al., 1985). Ao longo dos anos, essa via analgésica sofreu diversas modificações e atualmente é aplicada no tratamento da dor associada ao câncer, mas também em condições dolorosas agudas e crônicas não oncológicas, como distúrbios musculoesqueléticos degenerativos, distúrbios de dor neuropática e outros tipos de dor crônica (ANEKAR; HENDRIX; CASCELLA, 2023). Embora a eficácia da escada analgésica seja discutível, ela fornece uma abordagem simples capaz de reduzir a morbidade relacionada à dor em 70-80% dos pacientes (ANEKAR; HENDRIX; CASCELLA, 2023; ORHAN et al., 2008). Dependendo do grau da dor relatada pelos pacientes, a escada analgésica pode englobar desde anti-inflamatórios não esteroidais até opióides fracos ou fortes, sempre na presença ou não de medicamentos adjuvantes (ANEKAR; HENDRIX; CASCELLA, 2023). Os medicamentos adjuvantes referem-se a um conjunto vasto de fármacos que podem ser úteis em várias condições dolorosas, e por isso, também são conhecidos como co-analgésicos e podem incluir a classe de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptção de serotonina-norepinefrina, anestésicos e terapias tópicas, entre outros (ANEKAR; HENDRIX; CASCELLA, 2023; DWORKIN et al., 2007; MOULIN et al., 2007). Além disso, estratégias não farmacológicas são fortemente recomendadas para tratar a dor associada ao câncer. Apesar de ainda existir inúmeras questões preocupantes a respeito da utilização da escada analgésica, ela ainda continua a ser uma ferramenta essencial para os médicos no tratamento da dor relacionada com o câncer (CUOMO et al., 2019). No entanto, são necessárias mais pesquisas para melhor compreender como o protocolo de utilização da escada analgésica pode ser aperfeiçoado para proporcionar alívio eficaz e seguro da dor em pacientes com câncer (CRUSH et al., 2022).

Atualmente, a necessidade clínica em suprimir ou amenizar os sintomas dolorosos são dificilmente atendidas, e o sofrimento pessoal e os custos econômicos sociais da dor associadas ao câncer são substanciais (BENNETT et al., 2019; MANTYH, 2006; TENTI et al., 2020). Dessa maneira, a elucidação dos mecanismos e vias subjacentes relacionadas dor associada ao câncer, seja ela causada pelo próprio tumor e suas metástases ou pelas intervenções terapêuticas (procedimentos cirúrgicos, radioterapia e tratamento antineoplásico) são fundamentais para o desenvolvimento de tratamentos que visam especificamente às causas subjacentes, e não apenas os sintomas (SCHOLZ; WOOLF, 2002; WOOLF, 2020).

## 2.2. DOR ASSOCIADA AOS INIBIDORES DA AROMATASE

O câncer de mama é o câncer mais prevalente entre as mulheres, com incidência mundial de 11,7% (2,3 milhões de novos casos) e responsável por 15,5% das mortes por câncer no ano de 2020 (SUNG et al., 2021). Apesar da alta taxa de mortalidade anual, mulheres diagnosticadas com câncer de mama apresentam uma sobrevida de cinco anos superior a 80%, principalmente devido à detecção precoce e as melhorias na abordagem terapêutica (HAMOOD et al., 2018; MILLER et al., 2016). No entanto, as pacientes com câncer de mama podem desenvolver sintomas deletérios, que levam à incapacidade e redução da qualidade de vida (HAMOOD et al., 2018). Entre os sintomas apresentados pelas pacientes, a dor crônica é relatada em 74% dos casos (HAMOOD et al., 2018), e pode ser originária do próprio tumor, procedimentos cirúrgicos, ou tratamentos oncológicos (ALMEIDA et al., 2020; BENNETT et al., 2019; BRUSCO et al., 2017; FUSI et al., 2014).

Com base na expressão de receptores de estrogênio, receptores de progesterona ou receptores para o fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2, do inglês *Human epidermal growth factor receptor-type 2*), o câncer de mama é dividido em três subtipos principais: Receptor hormonal positivo (estrogênio e/ou progesterona), HER-2 positivo ou câncer de mama triplo negativo (ausência dos três receptores) (LOIBL et al., 2021). O câncer de mama positivo para os receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona) é o mais prevalente entre os 3 subtipos principais, acometendo 70% das pacientes (WAKS; WINER, 2019). A terapia endócrina adjuvante, que neutraliza o crescimento tumoral promovido pelo hormônio estrogênio, é a principal terapia sistêmica para o câncer de mama hormonal e as opções de terapia diferem com o climatério das mulheres (pré- ou pós-menopausa) (WAKS; WINER, 2019). Para mulheres pós-menopausa, a terapia endócrina adjuvante inclui principalmente os inibidores da aromatase (IAs) de terceira geração, sendo mais comumente prescritos o anastrozol (64%), letrozol (48%) e o exemestano (31%) (GIBSON et al., 2009; NYROP et al., 2016; WAKS; WINER, 2019). Essa classe de drogas tem como mecanismo de ação inativar a aromatase, enzima que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos, principalmente em locais extra gonodais, como glândulas supra-renais, pele, músculos e tecido adiposo (NABHOLTZ, 2008). Portanto, a inibição da enzima aromatase tende a potencializar a privação do estrogênio no tecido periférico, relacionando à uma condição de menopausa espontânea (NABHOLTZ, 2008). Os IAs podem ser utilizados como terapia primária e nesse caso, são recomendados por pelo menos cinco anos após o diagnóstico ou podem ser usados como terapia sequencial ou estendida com tamoxifeno (2 a 3 anos subsequentes) (BURSTEIN et al., 2019; NYROP et al., 2016; TENTI et al., 2020).



A terapia endócrina adjuvante é considerada um tratamento seguro e promissor para mulheres diagnosticadas com câncer de mama positivo para receptores hormonais (TENTI et al., 2020). Entre as terapias adjuvantes aprovadas atualmente, os IAs apresentam maior eficácia antitumoral e melhor perfil de segurança, assim, a utilização dessa classe é amplamente recomendada na prática clínica (HERSHMAN; LOPRINZI; SCHNEIDER, 2015). Embora os IAs sejam amplamente utilizados, aproximadamente um terço dos usuários relatam uma série de efeitos adversos significativos durante o período de tratamento, os quais podem incluir distúrbios sexuais, exacerbação dos sintomas da menopausa (declínio da densidade mineral óssea, ondas de calor, distúrbios do sono, fadiga e dores musculoesqueléticas), sofrimento emocional, ansiedade e depressão, função cognitiva prejudicada, eventos cardiovasculares e musculoesqueléticos (HENRY et al., 2008; HERSHMAN; LOPRINZI; SCHNEIDER, 2015; LAROCHE et al., 2014; TENTI et al., 2020; WAKS; WINER, 2019). Os sintomas musculoesqueléticos dolorosos, caracterizados por rigidez matinal, dores articulares, mialgia e diminuição da força, parecem ser sintomas diários preponderantes nesses pacientes (HENRY et al., 2008; TENTI et al., 2020). Em alguns casos, esses sintomas dolorosos podem ser reconhecidos como dor articular (36%), dor difusa (22%), tendinite (22%), dor mista (11%) ou neuropática (9%) (CREW et al., 2007; HENRY et al., 2008; LAROCHE et al., 2014). A falta de efeito analgésico de algumas classes de medicamentos e a persistência de sintomas dolorosos diários impactam significativamente na qualidade de vida dos pacientes e diretamente na adesão ao tratamento, levando a pelo menos um quarto dos pacientes a descontinuar a terapia (CREW et al., 2007; HENRY et al., 2008). Portanto, estudos que objetivem intervenções para aliviar os sintomas dolorosos nesses pacientes são indispensáveis e destaca uma oportunidade para um futuro direcionamento terapêutico que possa controlar a intensidade da dor associada aos IAs, e conseqüentemente melhorar à adesão ao tratamento.

A gênese da dor associada ao uso dos IAs não está clara, mas pode ser atribuída por vários fatores: privação do estrogênio, terapia hormonal prévia e/ou quimioterapia à base de taxanos (por exemplo, paclitaxel e docetaxel), artralgia pré-existente ou procedimento cirúrgico após o diagnóstico de câncer de mama (mastectomia parcial ou total) (CREW et al., 2007; GAILLARD; STEARNS, 2011; LAROCHE et al., 2014; SCHUG et al., 2019; TENTI et al., 2020). Além disso, abordagens farmacológicas que atenuam sintomas dolorosos fortemente similares aos causados pelos IAs são ineficazes para aliviar a dor relatada pelos usuários dos IAs (CREW et al., 2007). Assim, elucidar os mecanismos e vias subjacentes a esta condição

dolorosa em modelos experimentais pode ter um potencial translacional para desenvolver novos alvos com foco no tratamento dos sintomas de dolorosos associados ao uso dos IAs.

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar os sintomas dolorosos associados ao uso dos IAs, entre eles a capacidade dessa classe em modular a excitabilidade dos neurônios sensoriais (ROBARGE et al., 2016), o qual parece ser um mecanismo dependente da estimulação direta dos IAs ao TRPA1 (FUSI et al., 2014). Embora os autores sugiram que o TRPA1 é o principal mediador dos mecanismos nociceptivos dos IA, a concentração de IA necessária para sua ativação *in vitro* é maior do que aquela encontrada no plasma de pacientes (FUSI et al., 2014), sugerindo que outros fatores pró-algésicos e alvos farmacológicos estão contribuindo na sensibilização do TRPA1 nesse modelo de dor. De fato, estudos anteriores relataram que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ , agonista endógeno do TRPA1) e androstenediona (substrato de aromatase e agonista do TRPA1) são considerados mediadores adicionais que contribuem na sensibilização do TRPA1 e nos sintomas dolorosos associados ao uso dos IAs (DE LOGU et al., 2016; FUSI et al., 2014). Além disso, a função alterada de outros receptores, como o  $PAR_2$ , e receptores  $B_1$  ( $B_1R$ ) e  $B_2$  ( $B_2R$ ) de cininas também parecem estar contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas dolorosos associado aos IA (BRUSCO et al., 2023; FUSI et al., 2014). Portanto, os achados atuais indicam que fatores pró-algésicos adicionais ou vias de sinalização que possam ativar ou sensibilizar o TRPA1 ou outros membros da superfamília dos TRPs, como por exemplo o TRPV4, podem estar atuando em conjunto com os IAs para desencadear tais sintomas dolorosos.

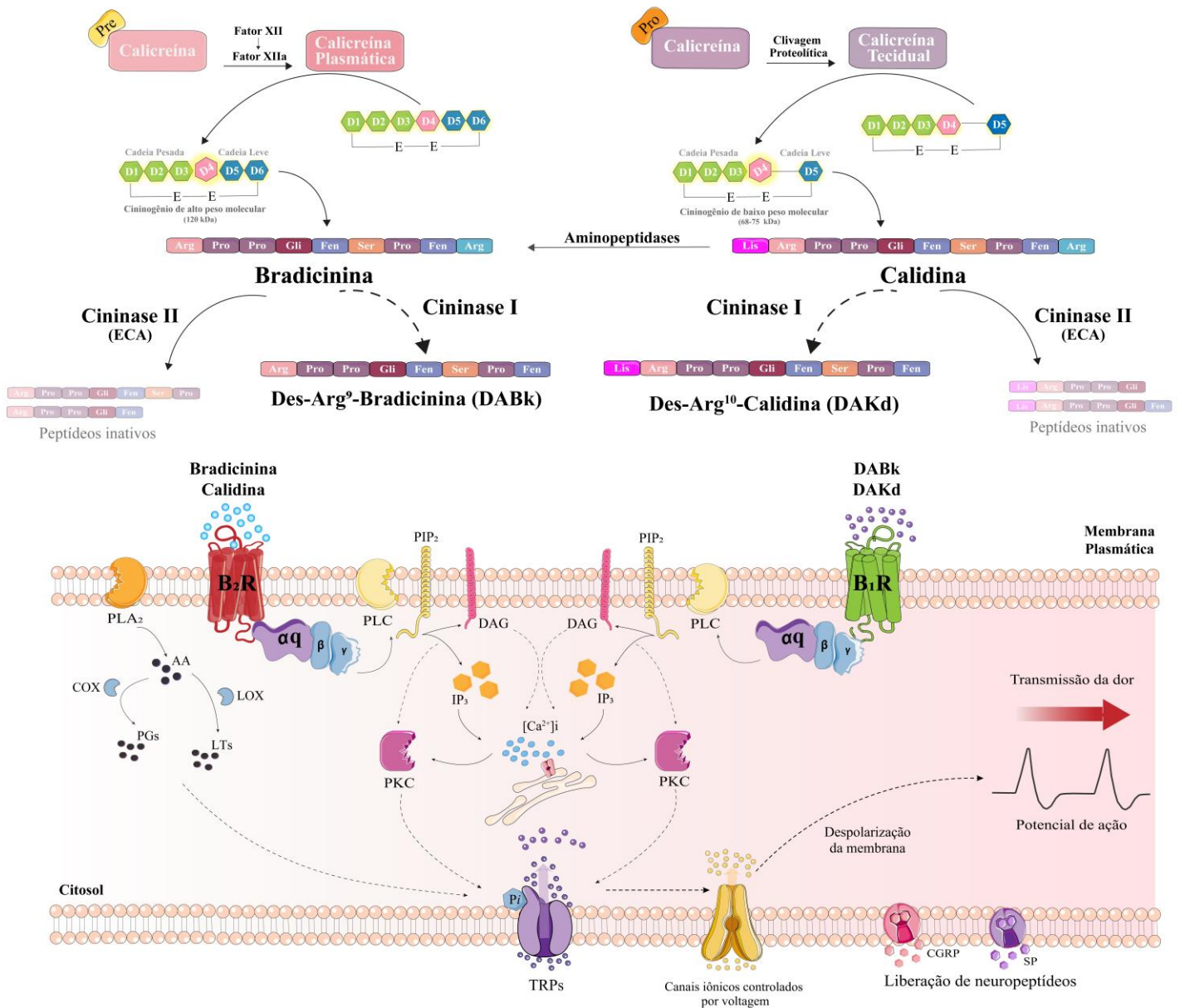
Os canais TRPA1 e o TRPV4 estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da dor em vários modelos, como aqueles induzidos por quimioterápicos ou sintomas dolorosos associados a tumores (ALESSANDRI-HABER et al., 2004; ALMEIDA et al., 2020; ANTONIAZZI et al., 2019; BRUSCO et al., 2020; COSTA et al., 2018; DE LOGU et al., 2021; MATERAZZI et al., 2012; NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013). Além disso, evidências têm sugerido que as cininas e seus  $B_2R$  e/ou  $B_1R$  desempenham um papel crítico na neuropatia periférica induzida por antineoplásicos e na dor causada por alguns tipos de câncer (BRUSCO et al., 2017, 2023; BUJALSKA; TATARKIEWICZ; GUMUŁKA, 2008; COSTA et al., 2011; FUJITA et al., 2010). Ambos  $B_2R$  e  $B_1R$  são co-localizados com os canais TRPA1 e TRPV4 em fibras aferentes primárias, e são capazes de modular a transmissão de estímulos dolorosos (JORDT et al., 2004; MA; HEAVENS, 2001; RODRIGUES; RUVIARO; TREVISAN, 2022; STORY et al., 2003; VAY; GU; MCNAUGHTON, 2012; WOTHERSPOON; WINTER, 2000). Além disso, a ativação de ambos os receptores de cininas em neurônios sensoriais podem mediar a sensibilização intracelular do canal TRPA1 e do canal

TRPV4, e contribuir para o desenvolvimento e manutenção de diferentes modelos de dor (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; COSTA et al., 2018; FERREIRA; DA SILVA; CALIXTO, 2004; MEOTTI et al., 2017; WANG et al., 2008b).

Assim, os canais TRPA1 e TRPV4 atuam como sensores de alterações extracelulares e intracelulares, tornando-os potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da dor patológica. Dessa maneira, é plausível sugerir que o TRPA1 e o TRPV4 e sua sensibilização intracelular mediada pelos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R possam atuar em conjunto para sustentar os sintomas dolorosos induzidos pelos AIs, como o anastrozol.

### 2.3 CININAS E SEUS RECEPTORES

O sistema cinina-caliceína é considerado uma complexa cascata multienzimática (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Esse sistema é essencial em processos fisiológicos e patológicos, como inflamação, vasodilatação, contração do músculo liso, cardioproteção, permeabilidade vascular, controle da pressão arterial, coagulação e dor (KASHUBA et al., 2013). O sistema cinina-caliceínas é constituído por interações complexas entre seus vários componentes: caliceínas (enzimas teciduais e plasmáticas envolvidas na síntese de cininas), cininogênios (glicoproteínas precursoras de cininas), cininases (enzimas que metabolizam as cininas), as próprias cininas e seus receptores (B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R) (DUTRA, 2017; MARCEAU; REGOLI, 2004) (**Figura 6**).



**Figura 6. Cininas e seus receptores.** A conversão do fator XII em fator XIIa, medeia a ativação da pré-callicreína em callicreína, iniciando a produção das cininas. Os cininogênios são substratos para a formação das cininas pela ação de enzimas cininogenases, como a callicreína plasmática e a tecidual. A callicreína plasmática age sobre o cininogênio de alto peso molecular formando a bradicinina, enquanto a callicreína tecidual age sobre o cininogênio de baixo peso molecular formando a calidina. Uma vez formadas, as cininas podem ser metabolizadas pelas cininases. As cininases I metabolizam as cininas, bradicinina e calidina, formando os metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (DABk) e des-Arg<sup>10</sup>-calidina (DAKd). Enquanto as cininases II (ou conhecida como enzima conversora de angiotensina - ECA) transformam a bradicinina ou a calidina em fragmentos inativos. Além disso, a calidina pode ainda ser convertida em bradicinina pela ação de aminopeptidasas. Uma vez produzidas as cininas, bradicinina e a calidina, exercem seus efeitos pela ativação dos B<sub>2</sub>R, ao passo que seus metabólitos ativos des-Arg, ativam o B<sub>1</sub>R. A ativação B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R subtipo Gαq leva a ativação da fosfolipase C (PLC) que hidrolisa o PIP<sub>2</sub> em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub> promove a liberação de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) do retículo endoplasmático. Ambos Ca<sup>2+</sup> e DAG podem ativar a proteína quinase C (PKC). DAG pode ser hidrolisado pela DAG lipase, levando a formação do ácido araquidônico (AA). Além disso, a fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) pode hidrolisar os fosfolípidios de membrana, gerando o AA. O AA formado é convertido pela ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX) em inúmeros metabólitos. A produção e o acúmulo dos segundos mensageiros são capazes de causar a fosforilação de diferentes canais iônicos, estimulando o influxo de íons para dentro das células,

despolarização da membrana e os potenciais de ação a jusante para a transmissão central da dor. Adaptado de Moreau et al. (2005), Kashuba et al. (2013) e Geppetti et al. (2015). Partes da Figura foram desenhadas usando imagens da Servier Medical Art da Servier, licenciadas sob uma licença Creative Commons Attribution 3.0 não portada.

Esse sistema é iniciado pela conversão do fator XII em fator XIIa, o qual medeia a ativação da pré-caliceína em caliceína plasmática, e dessa maneira se inicia a produção das cininas (**Figura 6**) (KASHUBA et al., 2013). Os cininogênios são considerados substratos para a formação das cininas pela ação de enzimas cininogenases, como a caliceína tecidual e a plasmática (KASHUBA et al., 2013; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). A caliceína plasmática age sobre o cininogênio de alto peso molecular, formado por seis domínios onde o D1-D3 incluem a cadeia pesada e o D5-D6 a cadeia leve, essas cadeias são ligadas por D4 que contém a sequência da bradicinina. Já a caliceína tecidual age sobre o cininogênio de baixo peso molecular, constituído por cinco domínios, D1-D3 incluem a cadeia pesada e o D5 a única cadeia leve presente. As duas cadeias também são ligadas por D4, que inclui a sequência conhecida por calidina (MOREAU et al., 2005) (**Figura 6**).

Uma vez formadas, bradicinina e a calidina podem ser metabolizadas por peptidases, conhecidas como cininases. As cininases I (carboxipeptidases M e N) removem aminoácidos terminais da bradicinina e da calidina formando os metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-Bk (DABk) e des-Arg<sup>10</sup>-calidina (DAKd), respectivamente (CASSIM; MODY; BHOOLA, 2002; KASHUBA et al., 2013). Enquanto as cininases II (também conhecida como enzima conversora de angiotensina I, ECA) transformam a bradicinina e a calidina em fragmentos inativos (KASHUBA et al., 2013; MOREAU et al., 2005). No entanto, a calidina pode ainda ser convertida em bradicinina pela ação de aminopeptidases (GUIMARÃES et al., 1973). Uma vez produzidas as cininas, bradicinina e a calidina, exercem seus efeitos pela ativação dos B<sub>2</sub>R, ao passo que seus metabólitos ativos des-Arg, ativam os B<sub>1</sub>R (LEEBS-LUNDBERG et al., 2005; MOREAU et al., 2005) (**Figura 6**).

Os B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R pertencem a grande família de GPCRs, subtipo Gαq (LEEBS-LUNDBERG et al., 2005). Sua estimulação resulta na produção de segundos mensageiros intracelulares, a partir da ativação da fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*), que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>, do inglês *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>, do inglês *inositol trisphosphate*) (**Figura 6**). O IP<sub>3</sub> promove a liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático, e ambos Ca<sup>2+</sup> e DAG ativam a PKC, localizada na superfície da membrana plasmática e ao ser ativada é capaz de fosforilar diferentes proteínas-alvo. O DAG também pode ser hidrolisado

pela DAG lipase para gerar 2-araquidonoliglicerol seguido pela formação do AA dependente da ação do monoacilglicerol lipase (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MOHAMMAD NEZHADY; RIVERA; CHEMTOB, 2020). Além disso, a estimulação dos GPCRs subtipo  $G_{\alpha q}$  também pode gerar a ativação da fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>, do inglês *phospholipase A2*), a qual é capaz de hidrolisar fosfolipídios de membrana, gerando o AA. Uma vez formado, o AA pode ser convertido pelas enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX) em prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (**Figura 6**) (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

A principal diferença entre os dois tipos de receptores de cininas está no padrão de expressão dessas proteínas (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MOREAU et al., 2005). Os B<sub>2</sub>R são expressos constitutivamente na superfície celular de vários tecidos (por exemplo, sistema nervoso gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, geniturinário, periférico e central) (MOREAU et al., 2005), mediando diferentes ações das cininas na nocicepção e na resposta inflamatória (FERREIRA et al., 2002; MOREAU et al., 2005). Por outro lado, B<sub>1</sub>R são normalmente sub expressos e regulados positivamente durante algum processo inflamatório (DUTRA, 2017). Evidências demonstram que o B<sub>1</sub>R pode ser expressos constitutivamente em neurônios de pequeno e médio diâmetro e fibras C peptidérgicas ou não peptidérgicas (MA, 2001; MA; HILL; SIRINATHSINGHJI, 2000). Além disso, a expressão constitutiva não neuronal do B<sub>1</sub>R inclui células do sistema imunológico (por exemplo macrófagos, fibroblastos e neutrófilos) e células endoteliais (EHRENFELD et al., 2006; SCHAEFFER et al., 2001). No entanto, ambos receptores, B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R, são expressos em estruturas importantes para modulação da dor, como nociceptores, DRG, neurônios, nervo ciático, medula espinhal, tálamo, córtex cerebral, hipotálamo, células satélites, gânglios simpáticos, células gliais (astrócitos e micróglia) (BRUSCO et al., 2017; CALIXTO et al., 2004; COSTA et al., 2011; FERREIRA et al., 2005; GRÖGER et al., 2005; MA, 2001; MARCEAU; REGOLI, 2004; NEGRAES et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Fisiologicamente, a ação das cininas nas células endoteliais levam a sintomas clássicos de inflamação, resposta vascular e dor no tecido lesionado (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MARCEAU et al., 2020). Patologicamente, a ativação dos receptores de cininas pode desencadear a nocicepção espontânea, alodinia e hiperalgesia mecânica e térmica em humanos e animais experimentais (BRUSCO et al., 2017; CALIXTO et al., 2004; COSTA et al., 2018; WERNER et al., 2007). Os efeitos das cininas podem ser diretos ou indiretos, e estão envolvidos em diferentes condições dolorosas agudas e crônicas (BRUSCO et al., 2017; COSTA et al., 2018; FERREIRA et al., 2008; MEOTTI et al., 2017; SILVA et al., 2016; WERNER et al.,

2007). Indiretamente, quando os receptores de cininas são ativados por seus ligantes, eles ativam diferentes cascatas de sinalização intracelular, que por sua vez, são capazes de fosforilar outras proteínas (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MOREAU et al., 2005) (**Figura 6**). O processo de fosforilação intracelular pode levar a uma variedade de respostas celulares, como a sensibilização de diferentes receptores envolvidos em processos dolorosos, como por exemplo os TRPs (MOCHLY-ROSEN; DAS; GRIMES, 2012). Dessa maneira, a ativação e/ou sensibilização dos TRPs constitui um evento secundário das cininas e de seus receptores nos neurônios sensoriais e contribui para diferentes condições dolorosas (GEPPETTI et al., 2015; PENG; POOLE; VELDHUIS, 2022).

#### 2.4 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRPs)

Os TRPs são sensores celulares envolvidos em uma grande variedade de processos celulares (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012). Atualmente, em mamíferos a família de canais TRPs consiste em 28 diferentes proteínas, as quais são divididas em 6 subfamílias denominadas de acordo com a sua homologia e não em relação a funcionalidade (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012). Todos os canais TRPs compartilham algumas semelhanças estruturais, incluindo seis domínios transmembrana (TM1 a TM6) e um loop de formação de poro entre o TM5 e TM6, o qual permite a passagem seletiva de cátions. Além disso, os canais TRPs possuem a porção amino (NH<sub>2</sub>)- e carboxi (COOH)-terminais localizadas intracelularmente, podendo possuir comprimentos variáveis (VIANA, 2016; WILD; MESSLINGER; FISCHER, 2015).

Os TRPs são amplamente distribuídos pelos tecidos, de modo que cada célula do corpo provavelmente expresse um ou mais subtipos (CATERINA; PANG, 2016). Além disso, os TRPs são considerados sensores polimodais, uma vez que podem ser controlados por um conjunto diversificado de estímulos físicos, químicos, variando de íons e pequenas moléculas a calor, frio e estímulo mecânico (CATERINA; JULIUS, 2001; JIANG; GAMPER; BEECH, 2011; RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2006). Todos os TRPs atualmente conhecidos são considerados seletivos para cátions (íons com carga positiva), com pouca ou nenhuma permeabilidade aniônica (íons com carga negativa). No entanto, sua seletividade relativa entre os cátions pode variar. Enquanto que a maioria dos TRPs são chamados de canais de cátions não seletivos, mostrando permeabilidade a ambos cátions monovalentes (Na<sup>+</sup>) e divalentes (Ca<sup>2+</sup> e magnésio, Mg<sup>2+</sup>), alguns são altamente seletivos para Ca<sup>2+</sup> ou Na<sup>+</sup> (CATERINA; PANG, 2016).

A entrada do íon  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais TRPs contribui para mudanças nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e conseqüentemente é capaz de aumentar a atividade de alguns canais TRPs ou modular a atividade praticamente todos eles (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; HO; LEE, 2015). A capacidade de muitos canais TRPs de mediar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios, queratinócitos, melanócitos ou células imunes fornece um mecanismo pelo qual esses canais influenciam na proliferação celular, diferenciação, citotoxicidade, migração celular e uma série de outros processos relevantes para saúde e na doença (CATERINA; PANG, 2016). Outra função importante dos TRPs é na despolarização da membrana. Em neurônios sensoriais, a despolarização neuronal mediada por TRPs em resposta a uma série de estímulos químicos, térmicos e mecânicos desencadeia o disparo do potencial de ação, levando a sensação de dor, temperatura ou coceira (BASBAUM et al., 2009).

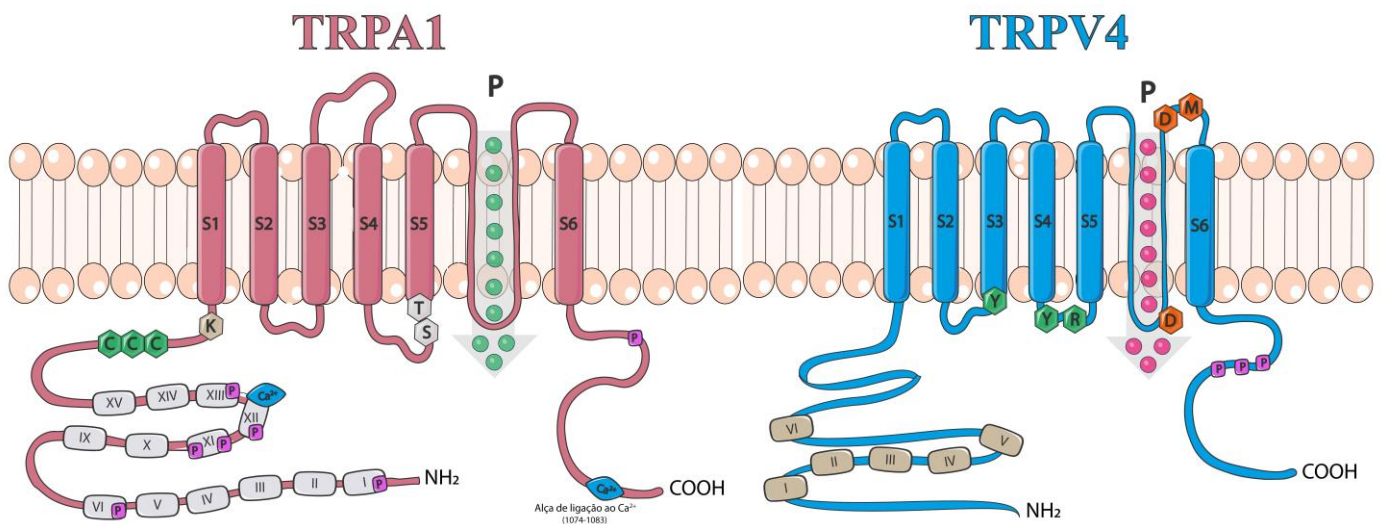
Dado a importância do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular na sinalização de todos os tipos de células, não é surpreendente que disfunções de canais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  são causadoras ou, pelo menos, envolvidas na patogênese de várias doenças (NILIUS et al., 2007). As disfunções dos TRPs são conhecidas como “canalopatias TRPs”, dado que um defeito no funcionamento do canal é a causa direta da doença e proporcionam uma gama de condições patológicas. Por exemplo, duas subfamílias de TRPs, mucolipina e policistina, foram identificadas como sendo a causa direta de doenças hereditárias, como mucopolidose e doença renal policística, respectivamente (NILIUS et al., 2014). Outro exemplo é a síndrome familiar de dor episódica, caracterizada por uma mutação com ganho de função para o TRPA1, ocasionando episódios de dor debilitante principalmente na parte superior do corpo (KREMEYER et al., 2010). Mutações que causam perda de função do TRPV4 também estão associadas a muitas doenças graves, como atrofia muscular escapulo peroneal espinhal, doença de *Charcot-Marie-Tooth* e displasia esquelética (NILIUS; VOETS, 2013), enquanto as mutações de ganho de função torna o TRPV4 mutado sensibilizado à temperatura corporal (36,5°C -37,5°C) (NILIUS; VOETS, 2013). Esses achados fornecem fortes evidências da importância dos TRPs em diferentes condições dolorosas, e identifica essa família de canais como um potente alvo molecular para o tratamento de diversas síndromes (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; NILIUS et al., 2014).

#### 2.4.1 TRPA1 e TRPV4

O TRPA1 é o único membro da subfamília anquirina até agora identificado em mamíferos. Originalmente, esse receptor era conhecido como proteína tipo-anquirina com domínios transmembrana 1 (ANKTM1, do inglês *ankyrin-like protein with transmembrane domains protein 1*), o qual foi primeiramente identificado em fibroblastos de pulmão fetal



humano (JAQUEMAR; SCHENKER; TRUEB, 1999). Estruturalmente, o TRPA1 é considerado uma proteína tetramérica formada pela união de quatro subunidades com seis domínios transmembrana (TM1-TM6) e inclui catorze a dezoito repetições de anquirina na porção NH<sub>2</sub>-terminal intracelular (**Figura 7**) (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; STORY et al., 2003). Uma vez que os outros TRPs podem variar de zero a oito repetições de anquirina, o TRPA1 torna-se um membro incomum entre a grande família dos TRPs (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012).



**FIGURA 7 – Estrutura do Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 e Vanilóide 4.** O Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1) é uma proteína tetramérica formada pela união de quatro subunidades com seis domínios transmembranas (TM1-TM6), e um loop de formação de poro na região TM5-TM6 permitindo a passagem de cátions, como o cálcio (Ca<sup>2+</sup>). Na porção amino (NH<sub>2</sub>-)terminal encontra-se repetições de anquirina e resíduos de cisteína (C) e lisina (K) fundamentais para ação de agonistas eletrofílicos, bem como possíveis sítios de fosforilação. Na região carboxi (COOH)-terminal encontra-se o sítio de ligação do Ca<sup>2+</sup> e possíveis sítios de fosforilação. Agonistas não-eletrofílicos agem sobre resíduos de tirosina (T) ou serina (S) presentes no domínio do poro formando ligações não-covalentes. O Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 4 (TRPV4) é constituído por seis domínios TM (TM1-TM6). Na região NH<sub>2</sub>-terminal encontra-se seis domínios de anquirina e possíveis sítios de fosforilação e a porção COOH-terminal encontrada na região TM6. Entre o TM3-TM4 encontra-se resíduos de tirosina (Y) e arginina (R) fundamentais para ação de agonistas derivados do forbol. No domínio de formação do poro (TM5-TM6) encontra-se resíduos de tirosina aspartato (D) e metionina (M) importantes para a seletividade e permeabilidade do Ca<sup>2+</sup>. Adaptado de Viana et al. (2016) e White et al. (2016). Partes da Figura foram desenhadas usando imagens da Servier Medical Art da Servier, licenciadas sob uma licença Creative Commons Attribution 3.0 não portada.

O TRPA1 é um canal de cátion não seletivo, altamente permeável ao Ca<sup>2+</sup> (DOERNER et al., 2007; ZURBORG et al., 2007) e aos cátions divalentes [zinco (Zn<sup>2+</sup>) e cobre (Cu<sup>2+</sup>)], os quais contribuem para a regulação do canal, uma vez que são capazes de potencializar a

atividade do canal através da interação com resíduos de aminoácidos presentes na porção COOH-terminal (CORDERO-MORALES; GRACHEVA; JULIUS, 2011; SURA et al., 2012).

Sabe-se que baixas temperaturas ( $>17^{\circ}\text{C}$ ) e uma série de irritantes químicos naturais, industriais e ambientais são ativadores conhecidos do TRPA1 (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012). No entanto, vale ressaltar que na presença de dois canais iônicos (TRPV1 e TRPM3), o TRPA1 demonstrou exercer um importante papel na detecção aguda ao calor (VANDEWAUW et al., 2018). Muitos ativadores do TRPA1 são compostos eletrofílicos reativos, os quais podem ser encontrados naturalmente em plantas pungentes ou picantes, como por exemplo o isotiocianato de alila (AITC, do inglês *allyl isothiocyanate*) (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012) ou em compostos industriais e ambientais (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; BESSAC et al., 2008; BLAIR et al., 2016). A ativação do TRPA1 por compostos eletrofílicos ocorre devido a presença de átomos de carbono ou enxofre eletrofílicos capazes de ligar covalentemente em grupos sulfidrila nucleofílicos, como os encontrados nos resíduos de cisteína na porção  $\text{NH}_2$ -terminal do receptor, mecanismo conhecido como reação de adição de Michael (EBERHARDT et al., 2014; HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007).

Além disso, este canal é ativado por compostos algôgenicos produzidos durante ou após dano tecidual e associados a condições dolorosas como o 4-hidroxinonal (4-HNE, produto da peroxidação lipídica) (TREVISANI et al., 2007), lipídeos oxidados, como a 15-Deoxi- $\Delta$  12, 14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) (CHEN; HACKOS, 2015), espécies reativas de oxigênio, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou espécies reativas de nitrogênio, como óxido nítrico (NO) (ANDERSSON et al., 2008, 2015; BESSAC et al., 2008). O TRPA1 também pode ser ativado através de mecanismos não reativos, nos quais esses compostos não induzem as modificações covalentes, tais como o carvacrol (presente no orégano), alicina (encontrado no alho e cebola), nicotina e muitos outros (ANDERSSON et al., 2011; ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; CHEN; HACKOS, 2015). Drogas clinicamente relevantes, incluindo anestésicos gerais, inibidores da aromatase (usados no tratamento do câncer de mama positivos para estrogênio), diidropiridinas e alguns anti-inflamatórios não esteroidais também são considerados ativadores não eletrofílicos do TRPA1 (FAJARDO et al., 2008; FUSI et al., 2014).

Diversos estudos têm demonstrado que o TRPA1 é amplamente expresso em células neuronais e não neuronais. Em células neuronais, o mesmo é encontrado em fibras sensoriais primárias e neurônios do DRG, gânglio trigeminal e nodoso (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; GEPPETTI et al., 2008). Muitos neurônios que expressam TRPA1 são nociceptores que co-expressam o TRPV4 (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012;

RODRIGUES; RUVIARO; TREVISAN, 2022; VAY; GU; MCNAUGHTON, 2012). A estimulação dos nociceptores contendo TRPA1 gera a liberação de neuropeptídeos (CGRP e SP) e uma série de respostas pró-inflamatórias, como o recrutamento de células imunológicas, produzindo vasodilatação e extravasamento plasmático, fenômeno denominado como inflamação neurogênica (GEPPETTI et al., 2008). Dado que o TRPA1 é amplamente distribuído no organismo, agonistas exógenos e endógenos desse canal são capazes de mediar diferentes respostas celulares e moleculares que estão diretamente relacionados com diversos estados dolorosos em roedores e humanos (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; NILIUS et al., 2007). Por esse motivo, o TRPA1 é considerado um sensor polimodal de sinais biológicos e sensor de estresse e danos teciduais (VIANA, 2016).

Há diversos estudos demonstrando a participação do TRPA1 em processos dolorosos inflamatórios agudos resultantes de incisões cirúrgica, feridas e lesões térmicas ou processos inflamatórios crônicos, como a gota, artrite, doenças autoimunes e outras doenças (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; ANTONIAZZI et al., 2018; DA COSTA et al., 2010; FIALHO et al., 2020; SUGIYAMA; KANG; BRENNAN, 2017; TREVISAN et al., 2014). O TRPA1 também está envolvido na dor neuropática causada por lesão do nervo, neuropatia diabética e a neuropatia induzida por diversos quimioterápicos (paclitaxel, oxaliplatina e cisplatina) (ANDERSSON et al., 2015; DE LOGU et al., 2017; MATERAZZI et al., 2012; NASSINI et al., 2011). Assim, diversos antagonistas TRPA1 foram testados em diversas condições dolorosas agudas e crônicas em roedores, e apresentaram efeito antinociceptivo (BRUM et al., 2019; DE LOGU et al., 2017; FERNANDES et al., 2016; MOILANEN et al., 2012; TREVISAN et al., 2014).

Outro membro da família dos TRPs que têm chamado atenção como um alvo importante para a transmissão de estímulos dolorosos, é o TRPV4 (GARCIA-ELIAS et al., 2014; KUMAR et al., 2018; RAJASEKHAR; POOLE; VELDHUIS, 2017; SHIBASAKI, 2020). O TRPV4 foi descrito pela primeira vez nos anos 2000 e recebeu diferentes nomes antes da sua nomenclatura atual (GARCIA-ELIAS et al., 2014; LIEDTKE et al., 2000). Uma única subunidade do TRPV4 consiste em seis regiões TM1-TM6, sendo a porção NH<sub>2</sub>-terminal intracelular associada à região TM1, constituída por seis domínios de anquirina, e a porção COOH-terminal encontrada na região TM6. O domínio TM5-TM6 constitui a alça formada de poro, que permite o fluxo de íons para dentro da célula, enquanto o TM3-TM4 parece compor o local de ligação aos agonistas, em particular para os compostos derivados do forbol (GARCIA-ELIAS et al., 2014; VOETS et al., 2002) (**Figura 7**). Essas características estruturais são essenciais para a montagem e localização do TRPV4, pois contribuem para a ativação e

modulação desse receptor (YU et al., 2019). Além disso, o TRPV4 difere-se da sua subfamília vanilóide por apresentar um arranjo único de proteínas empacotadas no domínio TM1-TM4, que são importantes para interações proteína-proteína decisivas (EVERAERTS; NILIUS; OWSIANIK, 2010; INADA et al., 2012; PHELPS et al., 2008).

Inicialmente o TRPV4 foi descrito como um canal catiônico não seletivo permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$  (LIEDTKE et al., 2000), mas atualmente é reconhecido como um receptor ionotrópico polimodal permeável a diferentes íons, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (GARCIA-ELIAS et al., 2014; KUMAR et al., 2018). O TRPV4 é considerado um termo sensor ativado por temperaturas quentes não nocivas ( $\geq 24-27$  °C) (GÜLER et al., 2002; WATANABE et al., 2002b), e ao contrário de outros canais TRP-termo, o TRPV4 foi originalmente reconhecido como um canal “osmótico” ativado por turgescência celular induzida por hipotonicidade (LIEDTKE et al., 2000). Além disso, estímulos mecânicos físicos e fatores químicos endógenos e exógenos, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  (SURESH et al., 2015), endocanabinóides (anandamida), AA e seus metabólitos (WATANABE et al., 2003), e derivados do forbol, como 4 alfa-forbol 12,13-didecanoato (4 $\alpha$ -PDD) (WATANABE et al., 2002a) são ativadores bem estabelecidos do TRPV4 (GARCIA-ELIAS et al., 2014).

O padrão de expressão do TRPV4 é considerado amplo, pois pode ser encontrado no coração, artérias, pulmão, pele, ossos, cérebro, bexiga urinária, rim, intestino, fígado, pâncreas, trato reprodutivo feminino, medula espinhal, neurônios corticais, tálamo e cerebelo, e células do sistema imunológico (por exemplos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) (EVERAERTS; NILIUS; OWSIANIK, 2010; KUMAR et al., 2018). Além disso, esse canal também é encontrado em fibras sensoriais primárias, onde a proteína é amplamente expressa ao longo dos axônios em direção as terminações nervosas periféricas e neurônios do DRG, gânglio trigeminal e nodoso (CHUNG; JUNG; OH, 2011; GARCIA-ELIAS et al., 2014; KUMAR et al., 2018). Assim, sua extensa expressão por todo o corpo e a sua capacidade de interagir com diferentes moléculas, justifica como o TRPV4 desempenha funções fisiológicas e patológicas importantes (KUMAR et al., 2018; YU et al., 2019).

Diversos estudos vêm demonstrando a participação do TRPV4 em processos inflamatórios agudos resultantes de lesões cutâneas ou viscerais (ALESSANDRI-HABER et al., 2005, 2006; BRIERLEY et al., 2008; SIPE et al., 2008; TODAKA et al., 2004) ou processos inflamatórios crônicos, como artrites ou desordens temporomandibulares (CHEN et al., 2013; DENADAI-SOUZA et al., 2012; O’CONOR et al., 2013). O TRPV4 também está envolvido na dor neuropática causada por lesão do nervo, neuropatia diabética ou neuropatia induzida por diversos quimioterápicos (paclitaxel, vincristina e talidomida) (ALESSANDRI-HABER et al.,

2004, 2008; CHEN; YANG; WANG, 2011; DE LOGU et al., 2020; DIAS et al., 2019; DING et al., 2010; KUMAR et al., 2020; MATERAZZI et al., 2012; ZHANG et al., 2008). Conseqüentemente, a inibição farmacológica ou genética do TRPV4 apresenta efeitos antinociceptivos ou anti-inflamatórios em diversas condições dolorosas agudas e crônicas em roedores (DAI, 2016; RODRIGUES; RUVIARO; TREVISAN, 2022).

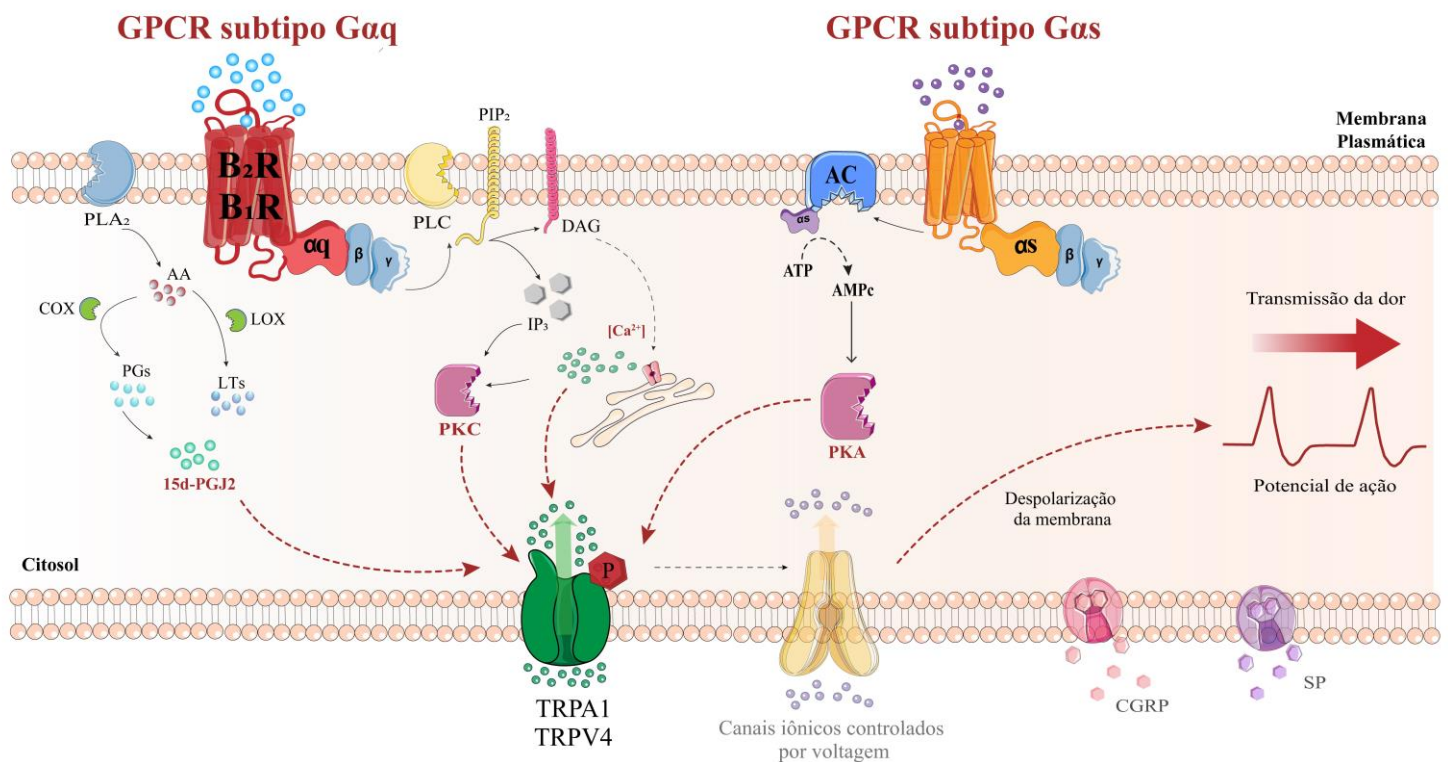
A família dos TRPs também é conhecida por ser modulada por vias “operadas por receptores”. Por exemplo, os GPCRs expressos em neurônios aferentes primários podem utilizar os TRPs, como o TRPA1 e o TRPV4, como uma proteína efetora para amplificar a transmissão nociceptiva (CHEN; YANG; WANG, 2011; COSTA et al., 2018; GRANT et al., 2007; IWATA et al., 2017; MEOTTI et al., 2017; PENG; POOLE; VELDHUIS, 2022; POOLE et al., 2013; SCHEFF et al., 2022; VELDHUIS et al., 2015). De fato, evidências *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os GPCRs e os TRPs estão interligados em uma complexa rede de sinalização intracelular, capazes de regular a sensação dolorosa, inflamação e outros processos fisiológicos (GEPPETTI et al., 2015; VELDHUIS et al., 2015).

#### 2.4.1.1. TRPA1 e TRPV4 e sua interação com as cininas

Os GPCRs e os TRPs são proteínas de superfície celular encontradas em neurônios sensoriais envolvidos na detecção de estímulos nocivos, irritantes e inflamatórios (PENG; POOLE; VELDHUIS, 2022; VELDHUIS et al., 2015). Atualmente, os TRPs são considerados uma das principais proteínas efetoras da sinalização dos GPCRs, pois o eixo GPCR-TRPs têm sido considerados vital para a transmissão da dor, coceira e inflamação neurogênica (BASBAUM et al., 2009; VELDHUIS et al., 2015). Após a ativação dos GPCRs, as vias intracelulares ativadas podem convergir diretamente para os TRPs, levando à alteração da atividade ou expressão do canal. Os eventos de sinalização dos GPCRs podem gerar mediadores que estimulam os TRPs (isto é, ativação do canal) ou melhorar suas respostas aos agonistas TRPs (isto é, sensibilização dos TRPs). Como resultado, os TRPs podem amplificar os efeitos dos GPCRs e mediar suas contribuições para a transmissão de processos dolorosos e inflamatórios (CLAPHAM, 2003; GEPPETTI et al., 2015).

A atividade do TRPA1 e do TRPV4 podem ser modulada por muitos GPCRs (subtipos Gαq ou Gαs), incluindo os receptores PAR<sub>2</sub>, glutamatérgicos, histaminas e cininas (B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R) através de cascatas de sinalização de segundos mensageiros (CENAC et al., 2010; CHEN; YANG; WANG, 2011; GRANT et al., 2007; IWATA et al., 2017; MEOTTI et al., 2017; VELDHUIS et al., 2015; ZHAO et al., 2014). Em síntese, a estimulação dos receptores B<sub>2</sub>R e

B<sub>1</sub>R de cininas (GPCR subtipo Gαq) ativam a PLC que, por sua vez, cliva o PIP<sub>2</sub> em DAG e IP<sub>3</sub>. O IP<sub>3</sub> atua como um segundo mensageiro capaz de mediar a liberação do Ca<sup>2+</sup> armazenado no retículo endoplasmático no citoplasma, enquanto o DAG atua como segundo mensageiro que ativa a PKC, e inicia uma cascata de fosforilação e ativa múltiplas proteínas alvo (**Figura 8**). A sinalização da proteína Gαq também estimula a PLA<sub>2</sub>, enzima responsável por mediar a hidrólise de fosfolípídeos de membrana e liberar ácidos graxos poliinsaturados, como o AA. As enzimas, COX e LOX posteriormente convertem o AA em prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).



**Figura 8 - Mecanismo de sensibilização intracelular dos Receptores de Potencial Transitório pelos Receptores acoplados a proteína G.** A ativação de Receptores Acoplados a Proteína G (GPCR) subtipo Gαq leva a ativação da fosfolipase C (PLC) que hidrolisa o PIP<sub>2</sub> em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub> promove a liberação de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) do retículo endoplasmático. Ambos Ca<sup>2+</sup> e DAG podem ativar a proteína quinase C (PKC). DAG pode ser hidrolisado pela DAG lipase, levando a formação do ácido araquidônico (AA). Além disso, a fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) pode hidrolisar os fosfolípídeos de membrana, gerando o AA. O AA formado sofre ação da ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), sendo convertido em inúmeros metabólitos. A ativação de GPCR subtipo Gαs, ativa a adenilato ciclase (AC) que converte a adenosina trifosfato (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). Uma vez formada a AMPC, ocorre ativação da proteína quinase A (PKA). A produção de segundos mensageiros dependentes de GPCRs subtipo Gαq e Gαs (Ca<sup>2+</sup>, PKC, metabólitos do AA e PKA) são agonistas intracelulares do TRPA1 e do TRPV4, que permitem à amplificação dos sintomas de dolorosos. Adaptado de Chen et al. (2011) e Andrade et al. (2012). Partes da Figura foram desenhadas usando imagens da Servier Medical Art da Servier, licenciadas sob uma licença Creative Commons Attribution 3.0 não portada.

O TRPA1 pode ser sensibilizado por mecanismos intracelulares dependentes da ativação de B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R (**Figura 8**) (BAUTISTA et al., 2006; CHOI; HWANG, 2018; MEOTTI et al., 2017; WANG et al., 2008a). De fato, estudos demonstram que a PKC dependente da ativação dos receptores de cininas é capaz de fosforilar diferentes resíduos de aminoácidos intracelulares do TRPA1 e modular a sua ativação (VELDHUIS et al., 2015). Além disso, a liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares e as substâncias metabolizadas durante a hidrólise do AA, como o 15d-PGJ<sub>2</sub>, são sensibilizadores bem estabelecidos do TRPA1 (**Figura 8**) (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; BAUTISTA et al., 2006; SCHMIDT et al., 2009; WANG et al., 2008b; WENG et al., 2012). Assim, esses mecanismos potencialmente interligados dependentes de receptores de cininas podem aumentar a atividade do TRPA1 e/ou o tráfego para a membrana, permitindo à amplificação dos sintomas de dor (SCHMIDT et al., 2009).

Além do TRPA1, os receptores de cininas podem modular a atividade do TRPV4 (COSTA et al., 2018). Estudos demonstraram que, uma vez acionadas as vias PLC e PKC, elas são capazes de modular o TRPV4 por fosforilação de diferentes aminoácidos, localizados na porção COOH-terminal, modulando a função deste canal (FAN; ZHANG; MCNAUGHTON, 2009). Especificamente, a PKC $\epsilon$ , uma isoforma dependente de Ca<sup>2+</sup> intracelular e DAG, altamente expressa em neurônios sensoriais apresenta um papel crítico na sensibilização intracelular do TRPV4 (**Figura 8**) (COSTA et al., 2018; FAN; ZHANG; MCNAUGHTON, 2009). Além disso, mediadores intracelulares secundários da ativação dos receptores de cininas, como o AA, e seus metabólitos são capazes de se ligar e ativar o TRPV4 (BERNA-ERRO et al., 2017; WATANABE et al., 2003).

Os receptores B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R e o TRPA1 e o TRPV4 são constitutivamente expressos em fibras aferentes primárias, e, portanto, estudos têm demonstrado que a interação entre esses receptores modulam a transmissão nociceptiva (JORDT et al., 2004; MA; HEAVENS, 2001; RODRIGUES; RUVIARO; TREVISAN, 2022; STORY et al., 2003; VAY; GU; MCNAUGHTON, 2012; WOTHERSPOON; WINTER, 2000). Dessa maneira, evidências *in vitro* e *in vivo* sugerem que os efeitos pró-algésicos das cininas podem ser mediados, pelo menos em parte, pela sensibilização intracelular do TRPA1 e do TRPV4, e contribuir para o desenvolvimento e manutenção de diferentes modelos de dor (BAUTISTA et al., 2006; MEOTTI et al., 2017; SCHMIDT et al., 2009; WANG et al., 2008b).

Os IAs fazem parte do tratamento endócrino adjuvante do câncer de mama positivo para receptores hormonais e seu uso está associado com o desenvolvimento de sintomas dolorosos, os quais afetam a qualidade de vida dos pacientes e interferem na adesão à terapia (GUPTA;

HENRY; LOPRINZI, 2020; LAROCHE et al., 2014; WAKS; WINER, 2019). Até o momento o envolvimento do TRPV4 e se as vias de ativação do B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R contribuem para a sensibilização dos canais TRPA1 e o TRPV4 na dor induzida pelos IAs, como o anastrozol, são desconhecidos. Embora a contribuição individual do TRPA1 e dos receptores de cininas no modelo de dor induzida por IA já tenha sido esclarecida (BRUSCO et al., 2023; FUSI et al., 2014), é plausível sugerirmos que esses receptores possam estar atuando em conjunto, convergindo em uma via nociceptiva comum e sustentando os sintomas dolorosos associados ao uso do IAs. Se nossa hipótese for confirmada, o tratamento imediato e direcionado dos sintomas álgicos associados ao uso dos IAs poderá contribuir para restabelecer a qualidade de vida dos sobreviventes do câncer de mama e melhorar à adesão dos pacientes à terapia, contribuindo para o controle da doença.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento do TRPV4 e se a ativação dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> para cininas contribuem para a sensibilização dos canais TRPA1 e TRPV4 no modelo de dor induzido pelo anastrozol.

#### 3.2 Objetivos Específicos

##### 3.2.1 Artigo Científico 1:

- Investigar se o tratamento sistêmico com anastrozol induz comportamentos nociceptivos, alodínia mecânica e perda de força muscular, em um protocolo de tratamento repetido.
- Avaliar se doses subnociceptivas locais de agonistas dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> e do TRPA1 são capazes de potencializar os comportamentos nociceptivos induzido por anastrozol;
- Investigar a possível interação entre os receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> e do TRPA1 no modelo de dor induzido por anastrozol, utilizando uma série de experimentos com agonistas e antagonistas desses receptores;
- Confirmar a possível interação entre os receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> e do TRPA1 no modelo de dor induzido por anastrozol utilizando um protocolo de dessensibilização *in vivo*;
- Confirmar se as vias de sinalização, PLC, PKC e PKA dependentes da ativação dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> sensibilizam o TRPA1 e contribuem para o modelo de dor induzido por anastrozol.

##### 3.2.2 Artigo Científico 2:

- Investigar o envolvimento do canal TRPV4 no modelo de dor induzido por anastrozol, utilizando agonistas e antagonistas desse receptor;
- Avaliar se doses subnociceptivas locais de agonistas dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> e do TRPV4 são capazes de promover e potencializar os comportamentos nociceptivos induzido por anastrozol;
- Investigar a possível interação entre os receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> e do canal TRPV4 no modelo de dor induzido por anastrozol, utilizando uma série de experimentos com agonistas e antagonistas desses receptores;

- Confirmar se a PLC, PKC e PKC $\epsilon$  formadas pela ativação dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> sensibilizam o canal TRPV4 e contribuem para o modelo de dor induzido por anastrozol.

## 4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

### 4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I



Article

# Kinin B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> Receptors Activation Sensitize the TRPA1 Channel Contributing to Anastrozole-Induced Pain Symptoms

Maria Fernanda Pessano Fialho<sup>1</sup>, Evelynne Silva Brum<sup>1</sup>, Gabriela Becker<sup>1</sup>, Indiará Brusco<sup>1</sup> and Sara Marchesan Oliveira<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Biological Sciences, Biochemical Toxicology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biochemical and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil

\* Correspondence: saramarchesan@hotmail.com or saramarchesan@ufsm.br; Tel.: +55-55-3220-8053; Fax: +55-55-3220-8756

**Abstract:** Aromatase inhibitors (AIs) cause symptoms of musculoskeletal pain, and some mechanisms have been proposed to explain them. However, signaling pathways downstream from kinin B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) and B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) receptor activation and their possible sensitizing of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) remain unknown. The interaction between the kinin receptor and the TRPA1 channel in male C57BL/6 mice treated with anastrozole (an AI) was evaluated. PLC/PKC and PKA inhibitors were used to evaluate the signaling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation and their effect on TRPA1 sensitization. Anastrozole caused mechanical allodynia and muscle strength loss in mice. B<sub>2</sub>R (Bradykinin), B<sub>1</sub>R (DABk), or TRPA1 (AITC) agonists induced overt nociceptive behavior and enhanced and prolonged the painful parameters in anastrozole-treated mice. All painful symptoms were reduced by B<sub>2</sub>R (Icatibant), B<sub>1</sub>R (DALBk), or TRPA1 (A967079) antagonists. We observed the interaction between B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and the TRPA1 channel in anastrozole-induced musculoskeletal pain, which was dependent on the activation of the PLC/PKC and PKA signaling pathways. TRPA1 seems to be sensitized by mechanisms dependent on the activation of PLC/PKC, and PKA due to kinin receptors stimulation in anastrozole-treated animals. Thus, regulating this signaling pathway could contribute to alleviating AIs-related pain symptoms, patients' adherence to therapy, and disease control.

**Keywords:** nociception; muscle strength loss; musculoskeletal pain; adjuvant endocrine therapy; PLC/PKC pathways



**Citation:** Fialho, M.F.P.; Brum, E.S.; Becker, G.; Brusco, I.; Oliveira, S.M. Kinin B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> Receptors Activation Sensitize the TRPA1 Channel Contributing to Anastrozole-Induced Pain Symptoms. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1136. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041136>

Academic Editor: Vincenzo Casolaro

Received: 31 January 2023

Revised: 25 March 2023

Accepted: 30 March 2023

Published: 3 April 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cancer incidence is increasing each year, causing high morbidity and mortality rates. Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer, with an estimated more than 2.3 million new cases (11.7%) per year [1]. Most breast cancer survivors carry a burden of sequelae after diagnosis and treatment, with pain being one of the most common symptoms [1,2]. The causes of pain are varied and might be related to the adjuvant endocrine treatment prescribed after the cancer treatment [2,3].

The third-generation aromatase inhibitors (AIs) are considered first-line drugs in the adjuvant endocrine treatment for postmenopausal women diagnosed with hormone receptor-positive breast cancer, and the most prescribed is anastrozole, followed by letrozole and exemestane [4–6]. The AIs are recommended for at least five years after diagnosis or may be used after therapy with tamoxifen (subsequent 2–3 years) [3,5,7]. One-third of AIs users have reported adverse effects from treatment onset [6,8,9]. Painful musculoskeletal symptoms, characterized by morning stiffness, joint pain, myalgia, and decreased strength, seem to be preponderant daily symptoms in these patients [3,8]. Furthermore, this painful condition can include diffuse (22%), mixed (11%), or neuropathic (9%) pain [8–10]. The

persistent symptoms significantly impact patients' quality of life and treatment compliance, leading to at least a quarter of patients discontinuing therapy [8].

The genesis of AIs-related pain is unclear, but it can be attributed to factors such as oestrogen deprivation, previous hormone therapy and/or taxane-based chemotherapy, pre-existing arthralgia, or a surgical procedure after a cancer diagnosis (mastectomy) [3,9–12]. Therapeutic approaches that mitigate pain associated with inflammatory joint disorders are ineffective at alleviating AIs-induced pain [10]. Thus, elucidating this condition's underlying mechanisms and pathways in experimental models may have translational potential for developing novel targets to treat the pain symptoms associated with AIs use.

Some mechanisms have been proposed to explain AIs-related pain symptoms, among them the altered function of ion channels in sensory neurons, such as Transient Potential Receptor Ankyrin 1 (TRPA1) [13]. Indeed, the TRPA1 channel is emerging as one of the main mediators in several pain models, such as those induced by chemotherapeutic drugs or tumor-related pain [14–20]. Furthermore, evidence has suggested that kinins and their receptors, kinin B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) and B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) receptors, also play a critical role in peripheral neuropathy induced by chemotherapy and in pain caused by some cancers [21–24].

Notably, both kinin receptors are co-expressed with the TRPA1 channel on sensory neurons [25–29]. Evidence, both *in vitro* and *in vivo*, suggests that the pro-algesic effects of kinins can be mediated, at least partly, by intracellular sensitization of TRPA1 [30–33]. Indeed, signaling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation, including the PLC/PKC and PKA pathways, are known sensitizers of TRPA1 [30,34]. Thus, these intracellular mechanisms are part of a multifactorial complex that might control the activation of the TRPA1 channel.

Given the above, it is plausible to suggest that kinin receptors and TRPA1 may act together to sustain pain symptoms induced by AIs. However, until now, no study has demonstrated the signaling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation and their interaction with TRPA1 in AIs-induced pain, such as anastrozole. Herein, we present evidence of the crosstalk between the kinins B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and the TRPA1 channel and its contribution to anastrozole-related pain in mice.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Drugs and Reagents

All reagents were of analytical grade and, when not mentioned otherwise, were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Anastrozole was acquired from Sun Farmacêutica do Brasil Ltda. (Brasil) and dissolved in 0.5% carboxy methylcellulose (CMC). Bradykinin (Bk; B<sub>2</sub>R agonist), des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (DABk; B<sub>1</sub>R agonist), Icatibant (Icat; antagonist for B<sub>2</sub>R), and des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradykinin (DALBk; antagonist for B<sub>1</sub>R) were prepared as stock solutions in phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM). Allyl isothiocyanate (AITC, TRPA1 agonist) was dissolved in 10% DMSO. A967079 (A96, TRPA1 antagonist) was dissolved in 10% DMSO and 5% Tween 80 (final concentration administered). The stock solutions of U73122 (U731, a PLC inhibitor) and GF109203X (GF109, a PKC inhibitor) were prepared in 10% absolute ethanol, and the H89 solution (PKA inhibitor) was prepared in 1% DMSO. All the stock solutions were diluted to the desired concentration just before use. The final concentration of stock solutions containing ethanol or DMSO did not exceed 0.5% or 1%, respectively, and did not cause any detectable effect *per se*. Isotonic solution (0.9% NaCl) was used as vehicle to dilute reagents administered by the oral or intraperitoneal routes, while PBS (10 mM) was used to dilute reagents administered by the intraplantar route. All control groups (vehicles) received the vehicles in which the treatments were soluble. Oral and intraperitoneal treatments were administered in mice at a volume of 10 mL/kg, while intraplantar treatments did not exceed the volume of 20 µL per paw. The doses of the drugs used in this study were based on previous studies [18,33,35–38].



## 2.2. Animals

Male C57BL/6 mice (25–30 g) were used and maintained temperature-controlled ( $22 \pm 1$  °C) under a 12-h light/dark cycle and with standard laboratory chow and water ad libitum. The animals were habituated to the experimental room at least 1 h before the experiments. Experimental protocols followed ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals [39]. The experiments also were performed following the national and international legislation (guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation Control–CONCEA—and of the U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals–PHS Policy). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Santa Maria (CEUA, process numbers 2304280220/2020 and 3026220520/2020).

Once AIs caused incapacitating pain symptoms, an animal model was used. Using an intact organism is important to obtain an adequate response from these experimental models. In this context, male C57BL/6 mice were used based on their low oestrogen concentrations and previous studies involving AIs-associated pain [13,40]. The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the treatments. The group size used for each experiment was based on studies with protocols similar to ours [37,38,41], which were confirmed by power calculations (G\*Power version 3.1.9.7).

Allocation concealment was performed using a randomization procedure [<http://www.randomizer.org/> (accessed on 12 December 2021)] and according to the baseline thresholds before and after the treatment administrations. All experiments were also performed by experimenters blinded to the drug administration or the group to be tested.

## 2.3. Anastrozole-Induced Pain Model

The dose of anastrozole used to induce painful behaviors in mice was based on the human dose of 1 mg recommended by the Food and Drug Administration to treat breast cancer in postmenopausal women [4]. Thus, from the conversion factor from human to mouse indicated by the National Institute of Health [42] and previous studies [43,44], we have used the dose of 0.2 mg/kg to induce a pain model in mice. The experimental protocol consisted of administering anastrozole (0.2 mg/kg) by oral route (p.o.) or vehicle (control group, 10 mL/kg, p.o.; 0.5% CMC). The animals were subjected to behavior assessments after acute treatment (a single anastrozole administration) or prolonged treatment (anastrozole administration for 15 consecutive days). Treatments for pain are usually therapeutic; that is, they are administered after the onset of pain symptoms. Thus, all the experimental protocols were conducted according to this schedule: we first induced the painful symptoms with anastrozole administration, and then we performed antagonist or inhibitor treatments.

## 2.4. Study Design for Behavioral Assessment

Mechanical allodynia (von Frey test) and muscle strength (Grip test) were evaluated before (baseline, BL) and after the anastrozole or vehicle administration (time 0). Next, the animals were submitted to several treatment protocols (see more details below), and these behavioral parameters were evaluated several times (h) after treatments. In most behavioral protocols, overt nociceptive behavior was also evaluated.

### 2.4.1. Pain Induction by Anastrozole

We investigated whether anastrozole systemic treatment evokes mechanical allodynia and muscle strength loss on a repeated treatment protocol. For this, after evaluation of the baseline paw withdrawal threshold (PWT) and muscle strength of the animals, they were randomized into treatment groups. Mice received anastrozole (0.2 mg/kg, p.o.) or its vehicle (0.5% CMC, p.o.) once a day for 15 consecutive days, which corresponds to a 1-year time in humans [13]. The development of mechanical allodynia and muscle strength loss was evaluated at days 1, 3, 7, 10, 12, and 15 from 0.5 h up to 24 h after each treatment day

(following the protocol described in items “2.5.2 Mechanical threshold” and “2.5.3 Muscle strength”). The experimental design is represented in Figure 1A.

#### 2.4.2. Assessment of B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 Involvement in Anastrozole-Induced Pain

To confirm the contribution of B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 channels on mechanical allodynia and muscle strength loss induced by anastrozole, the mice received a single administration of Icatibant (100 nmol/kg, intraperitoneal, i.p., B<sub>2</sub>R antagonist) or DALBk (150 nmol/kg, i.p., B<sub>1</sub>R antagonist) or A967079 (100 mg/kg, p.o., TRPA1 channel antagonist) or their vehicles (10 mL/kg, i.p. or p.o.) at 3 h after anastrozole administration. After treatments, the PWT and muscle strength were evaluated at different time points (from 0.5 h to 5 h). The experimental design is represented in Supplementary Figure S1.

For the first time, it was investigated whether low doses of B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 channel agonists could enhance painful behaviors in anastrozole-treated mice. For this, the animals were previously treated with anastrozole or vehicles, and after 3 h, they received intraplantar (i.pl.) injections of Bk (1 nmol/paw, a B<sub>2</sub>R agonist), DABk (3 nmol/paw, a B<sub>1</sub>R agonist), or AITC (0.3 nmol/paw, a TRPA1 agonist), all in sub-nociceptive doses, or their vehicles (20 µL/paw, i.pl.). The overt nociceptive behavior was immediately evaluated following the protocol described in item “2.5.1 Overt nociceptive behavior”. PWT and muscle strength were evaluated from 0.5 to 24 h after the stimuli. The experimental design is represented in Figure 2A.

To validate the involvement of B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 channels on the behavioral parameters evaluated above, other animal groups received Icatibant (100 nmol/kg, intraperitoneal, i.p., B<sub>2</sub>R antagonist), DALBk (150 nmol/kg, i.p., B<sub>1</sub>R antagonist), or A967079 (100 mg/kg, p.o., TRPA1 channel antagonist) at 3 h after anastrozole. After 0.5 h, the same animals were treated with sub-nociceptive doses of their respective agonists, Bk, DABk, or AITC, by the intraplantar route, and the overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min. In sequence, PWT and muscle strength were assessed until treatments with the antagonists showed an effect. The experimental design is represented in Figure 3A.

#### 2.4.3. Interaction Assessment of the B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 in Anastrozole-Induced Painful Behaviors

We explored whether the interaction between both kinin receptors and TRPA1 might be essential to mediate the anastrozole-induced pain. The animals were previously treated with anastrozole or vehicle, and after 3 h, they received Icatibant, DALBk, or A967079. After 0.5 h, the B<sub>2</sub>R (Icatibant) or B<sub>1</sub>R (DALBk) antagonist-treated animals received the intraplantar injection of the TRPA1 agonist, AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.). The animal groups treated with the systemic TRPA1 (A967076) antagonist received the intraplantar injection of either B<sub>2</sub>R or B<sub>1</sub>R agonists (Bk or DABK, 1 or 3 nmol/paw, respectively). The overt nociceptive behavior was evaluated immediately after intraplantar agonist administration for 10 min. In sequence, PWT and muscle strength were assessed until treatments with the antagonists showed an effect. The experimental designs are represented in Figures 4A and 5A.

To confirm the results about the interaction between B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and TRPA1 in the pain symptoms induced by anastrozole, we use an *in vivo* desensitization protocol (following the protocol described in item “2.5.4 Desensitization protocol”). After 0.5 h of desensitization protocol, the animals received anastrozole or vehicle, and after 3 h, the desensitized animals received an intraplantar injection of AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.), and the overt nociceptive behavior was immediately evaluated. After that, PWT and muscle strength were assessed several times (h). The experimental design is represented in Figure 6A.

#### 2.4.4. Intracellular Pathways Dependent on Kinin Receptor Activation and TRPA1 Sensitization

We also examined the participation of both intracellular signaling pathways, mediated by PLC/PKC or PKA, in the anastrozole-induced pain. For this, animals previously treated (3 h before) with anastrozole or vehicle received intraplantar co-injection containing either an inhibitor of PLC (U73122, 30 pmol/paw, i.pl.), PKC (GF109203X, 1 or 3 nmol/paw,

i.pl.) or PKA (H89, 1 nmol/paw, i.pl.) plus Bk (1 nmol/paw, i.pl.) or DABK (3 nmol/paw, i.pl.). Immediately after intraplantar injection of agonists, overt nociceptive behavior was evaluated. Next, PWT and muscle strength were assessed until treatments with the inhibitors showed an effect. The experimental design is represented in Figure 7A.

Next, we evaluated whether signaling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation could be contributing to TRPA1 sensitization in this model. At 3 h after treatments with anastrozole or vehicle, the animals received intraplantar co-injection containing either inhibitors of PLC, PKC, or PKA plus AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.), and the overt nociceptive behavior was immediately evaluated. Next, PWT and muscle strength were assessed until treatments with the inhibitors showed an effect. The experimental design is represented in Figure 8A.

## 2.5. Behavioral Experiments

### 2.5.1. Overt Nociceptive Behavior

We evaluated the capacities of B<sub>2</sub>R (Bk), B<sub>1</sub>R (DABk), and TRPA1 (AITC) channel agonists in increasing the nociceptive response induced by anastrozole (all at sub-nociceptive doses). For this, the animals were individually placed in chambers (transparent glass cylinders of 20 cm diameter) and adapted for 10 min. Immediately after the intraplantar injection of agonists in the right hind paw, the animals were observed for 10 min. The amount of time spent (in seconds, s) licking and lifting the injected paw was considered indicative of overt nociceptive behavior [13,44].

### 2.5.2. Mechanical Allodynia

The assessment of mechanical allodynia was carried out using flexible nylon filaments (von Frey) of increasing stiffness (0.02–10 g) by the up-and-down method [45,46]. The von Frey test is widely used in preclinical and clinical settings for measuring pain [46,47]. The PWT was calculated from the resulting scores, as previously described [48]. The PWT was expressed in grams (g), and a significant decrease in the PWT compared with the baseline values was considered as mechanical allodynia.

### 2.5.3. Muscle Strength

The muscle strength test in mice was evaluated using a grip strength meter (Grip Strength meter EFF 305–Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) [49], a test used in preclinical and clinical settings for the study of musculoskeletal pain [50,51]. The test consists of the experimenter gently holding the mouse by the base of the tail, allowing the animal to grab the metal bar with the forelimbs and hindlimbs before being gently pulled until it releases its grip. The forelimbs and hindlimbs muscle strength, expressed in grams (g), was measured three times per mouse with at least 1 min between measurements.

### 2.5.4. Desensitization Protocol

Although the presence of B<sub>2</sub>R on nociceptive primary afferent neurons is well established, evidence also demonstrates that B<sub>1</sub>R is expressed in some small and medium diameter neurons and peptidergic and non-peptidergic C fibers [26,29,52,53]. In this sense, the desensitization protocol was performed on both kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R, based on and adapted from Ferreira et al. [35]. The mice received two repeated intraplantar injections of Bk (10 nmol/paw, i.pl.) or DABK (10 nmol/paw, i.pl.) with a 0.5 h interval between the injections.

## 2.6. Statistical Analysis

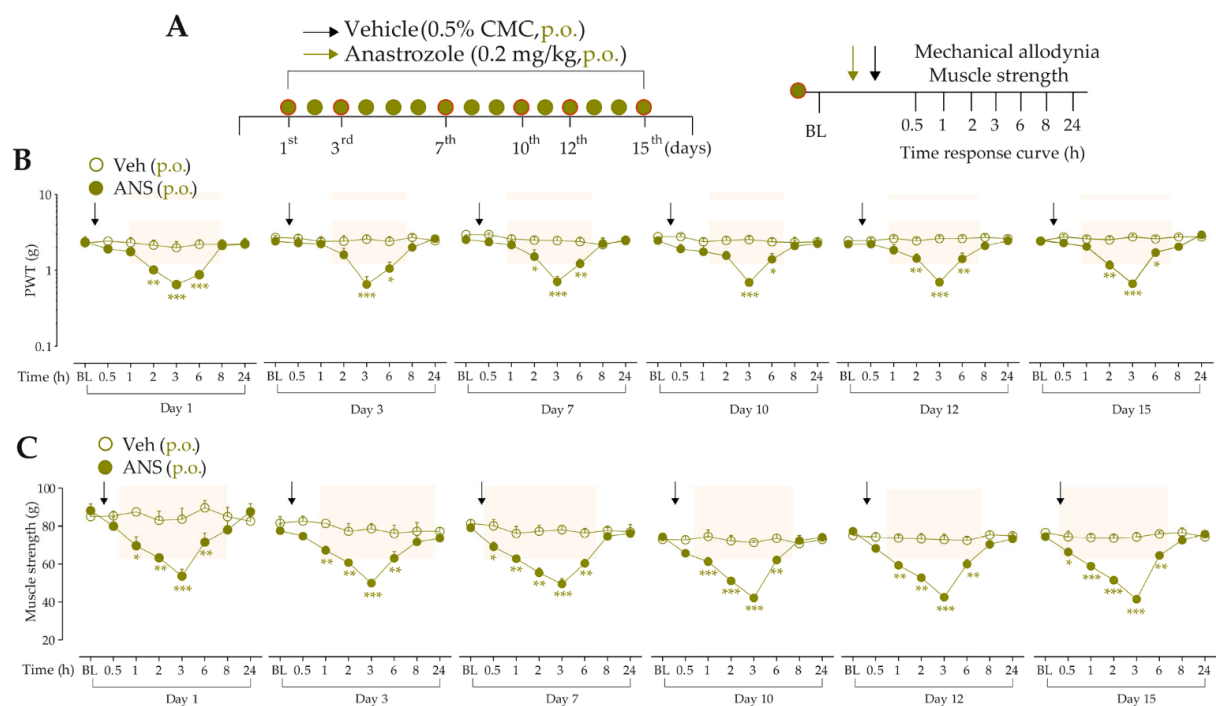
The results were expressed as the mean + Standard Error of the Mean (SEM), which were expressed as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of the data. To meet parametric assumptions, data of mechanical threshold were log-transformed before analyses. Parametric data were analyzed by Student's *t*-test or one- or two-way ANOVA

followed by Bonferroni's post hoc test, using the GraphPad Prism 8.0 software (San Diego, CA, USA). Post hoc tests were performed only when the F-value achieved the necessary level of statistical significance ( $p < 0.05$ ) and when there was no significant variance in homogeneity [54]. The percentages of maximum inhibition (Imax) were calculated for the maximally developed responses compared to baseline values or the control group.

### 3. Results

#### 3.1. Systemic Anastrozole Induces Prolonged Pain Symptoms in Mice

Mice daily treated with anastrozole developed mechanical allodynia (from 2 h up to 6 h) (Figure 1B) and presented reduced muscle strength (from 0.5 h up to 6 h) (Figure 1C) at days 1, 3, 7, 10, 12, and 15 after anastrozole treatment when compared to the vehicle group. The development of maximum mechanical allodynia and muscle strength loss occurred 3 h after oral anastrozole treatment, returning to basal levels 8 h after anastrozole. Based on this, the time of 3 h on the first day after anastrozole administration was chosen for subsequent experiments.



**Figure 1.** Repeated treatment with anastrozole induces prolonged nociceptive behaviors in mice (A) Male C57BL/6 mice were treated by the oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) once daily for fifteen days to mimic a 1-year time in humans. On the 1st, 3rd, 7th, 10th, 12th, and 15th days after treatments, a time curve (from 0.5 h up to 24 h) was performed to evaluate mechanical allodynia development and muscle strength loss (B,C). Baseline (BL) values were measured before anastrozole or vehicle administration. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. vehicle group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by a two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. The arrows indicate the administration of the anastrozole or vehicle. Veh: vehicle oral administration; ANS: anastrozole oral administration. The arrows indicate the administration of the anastrozole or vehicle.

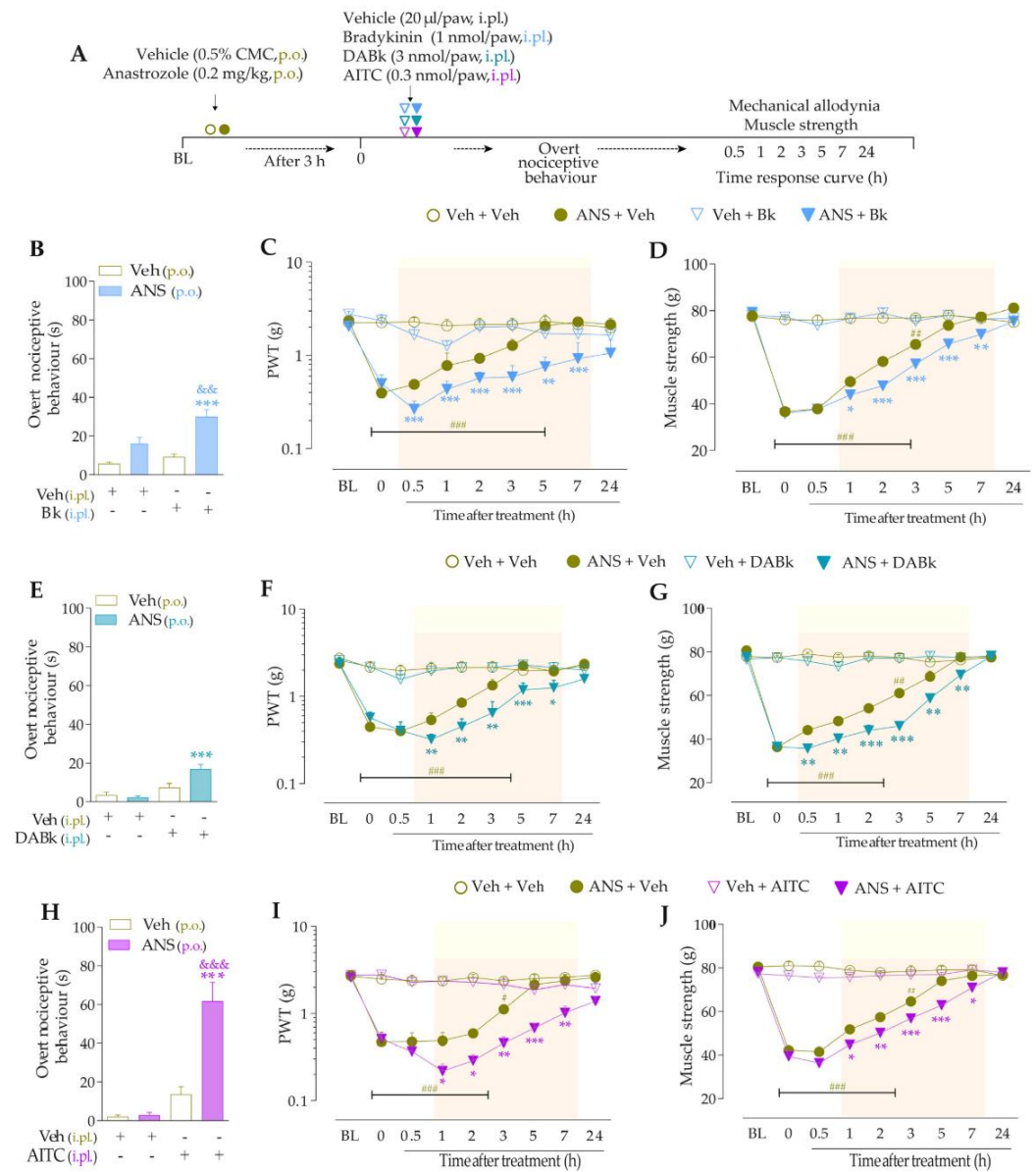


### 3.2. Kinin $B_2$ and $B_1$ Receptors and the TRPA1 Channel Contribute to Pain Induced by Anastrozole

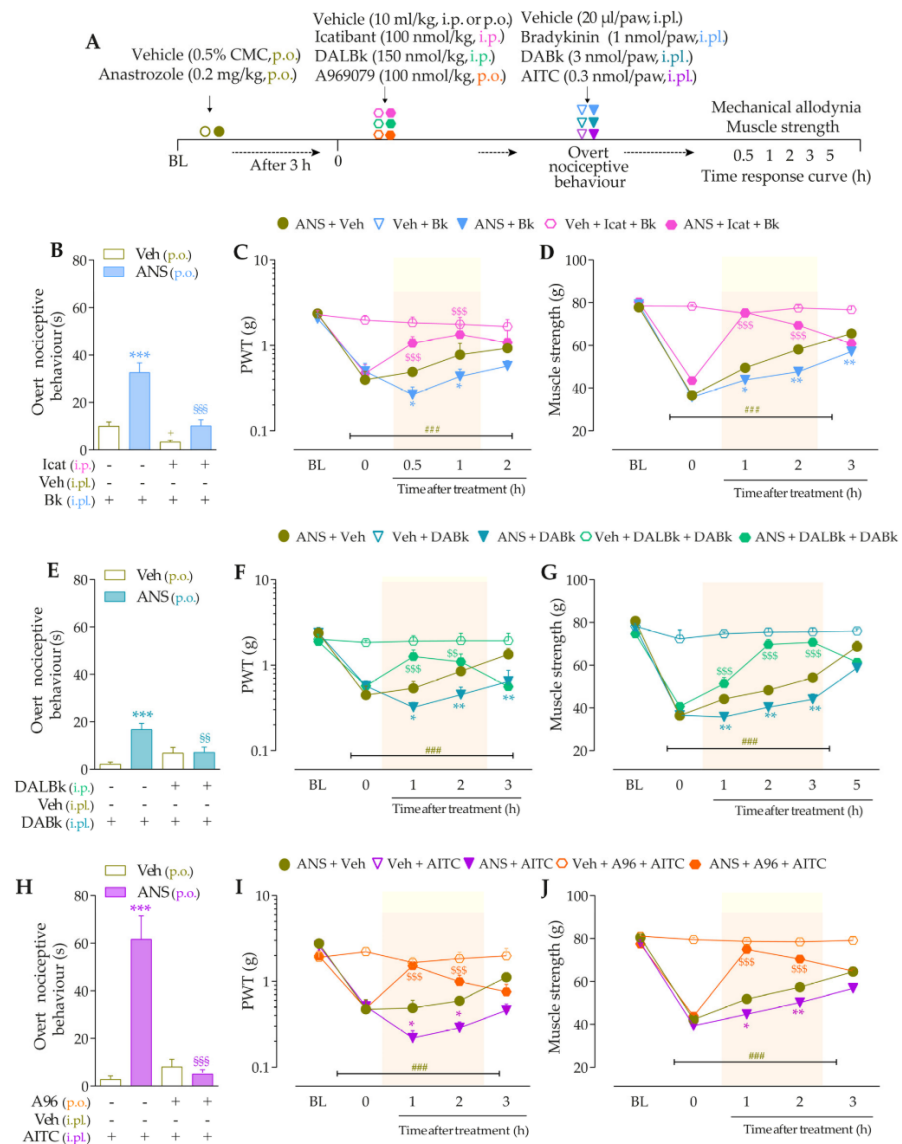
Corroborating other studies [13,44], Icatibant, DALBk, or A967076 reduced the mechanical allodynia and muscle strength loss in anastrozole-treated animals (Supplementary Figure S1). Icatibant (100 nmol/kg, i.p.) (Supplementary Figure S1B) or DALBk (150 nmol/kg, i.p.) (Supplementary Figure S1D) reduced the anastrozole-induced mechanical allodynia from 0.5 up to 2 h after their administration, with inhibitions of  $56 \pm 7\%$  and  $100\%$  at 1 h after their treatments, respectively. A967079 (100 mg/kg, p.o.) (Supplementary Figure S1F) reduced the mechanical allodynia induced by anastrozole from 0.5 up to 1 h after its administration, with inhibitions of  $47 \pm 10\%$  at 1 h. Icatibant (Supplementary Figure S1C), DALBk (Supplementary Figure S1E), or A967079 (Supplementary Figure S1G) also reduced the muscle strength loss induced by anastrozole from 0.5 up to 3 h after their administration, with inhibitions of  $89 \pm 6\%$ ,  $87 \pm 11\%$ , and  $92 \pm 5\%$  at 1 h, respectively.

The intraplantar (i.pl.) injection of Bk (1 nmol/paw) (Figure 2B), DABk (3 nmol/paw) (Figure 2E), or AITC (0.3 nmol/paw) (Figure 2H), all in sub-nociceptive doses, increased paw licking and lifting time in anastrozole-treated compared to vehicle-treated animals, an indication of overt nociceptive behavior. Anastrozole (0.2 mg/kg, p.o.) induced mechanical allodynia (Time 0, Figure 2C,F,I) and muscle strength loss (Time 0, Figure 2D,G,J) in mice at 3 h after its administration when compared to BL values. Intraplantar Bk, DABk, or AITC enhanced and prolonged the mechanical allodynia (Figure 2C,F,I) and muscle strength loss (Figure 2D,G,J) from 0.5 up to 7 h after its injection in anastrozole-treated animals when compared to the anastrozole plus vehicle group.

Icatibant (100 nmol/kg, i.p., 0.5 h prior) (Figure 3B), DALBk (150 nmol/kg, i.p., 0.5 h prior) (Figure 3E), or A967079 (100 mg/kg, p.o., 0.5 h prior) (Figure 3H) markedly prevented the Bk-, DABk-, or AITC- induced overt nociceptive behavior in anastrozole-treated mice with inhibition of  $68 \pm 7\%$ ,  $65 \pm 11\%$ , and  $91 \pm 3\%$ , respectively. Icatibant reduced the mechanical allodynia (from 0.5 h up to 1 h) (Figure 3C) and muscle strength loss (from 1 h up to 2 h) (Figure 3D) with inhibitions of  $55 \pm 23\%$  (at 1 h) and  $89 \pm 2\%$  (at 1 h), respectively, after its administration. DALBk reduced the mechanical allodynia (Figure 3F) and muscle strength loss (Figure 3G) from 1 h up to 2 h (inhibition of  $52 \pm 13\%$  at 1 h) and from 1 h up to 3 h (inhibition of  $79 \pm 6\%$  at 2 h), respectively, after its administration. A967079 reduced the mechanical allodynia (Figure 3I) and muscle strength loss (Figure 3J) from 1 h up to 2 h (inhibition of  $54 \pm 7\%$  and  $90 \pm 7\%$  at 1 h, respectively) after its administration. As expected, sub-nociceptive doses of the Bk, DABk, or AITC agonists did not induce overt nociceptive behavior, mechanical allodynia, or muscle strength loss in animals previously treated with vehicle (Figure 3).



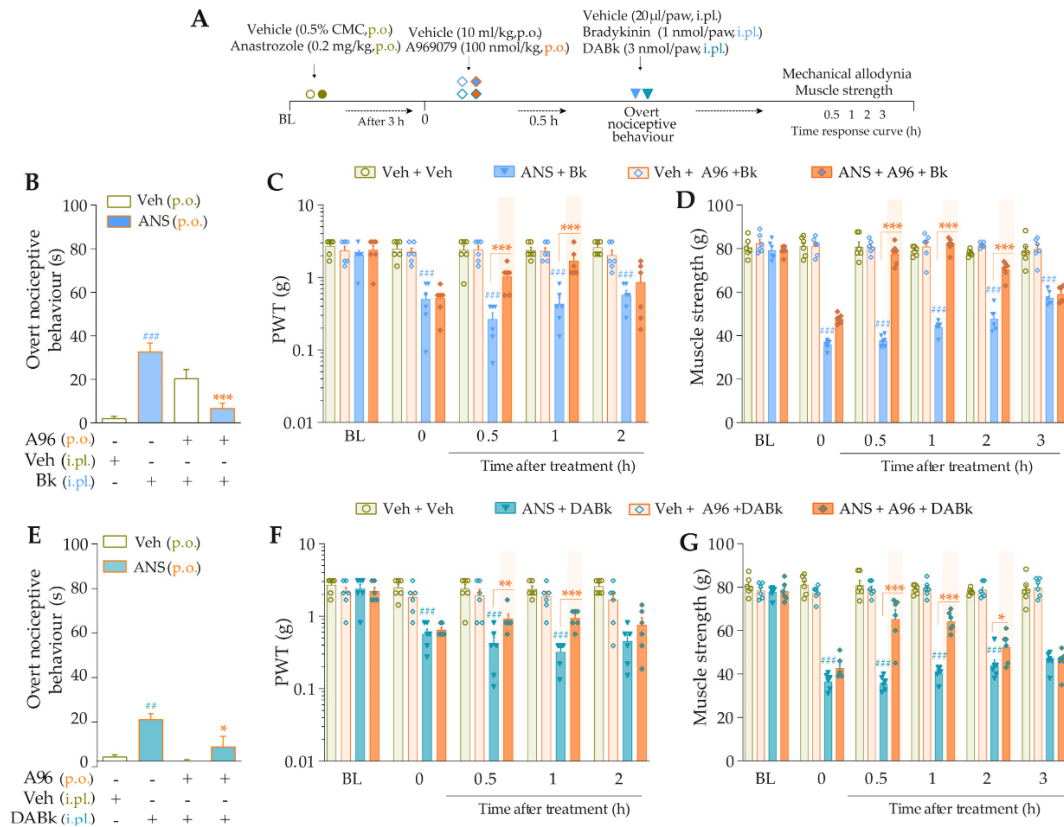
**Figure 2.** The nociceptive behaviors induced by anastrozole are enhanced and prolonged by local administration of  $B_2R$ ,  $B_1R$ , and TRPA1 agonists in mice. (A) Male C57BL/6 mice treated by oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) presented mechanical allodynia and muscle strength loss compared to their vehicle (0.5% CMC). At 3 h after anastrozole administration (Time 0), the vehicle (20 µL/paw, intraplantar, i.pl.) or sub-nociceptive doses of Bk (1 nmol/paw, i.pl.,  $B_1R$  agonist), DABk (3 nmol/paw, i.pl.,  $B_2R$  agonist), or AITC (0.3 nmol/paw, i.pl., TRPA1 agonist) were injected by the intraplantar route. The overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min (B,E,H); the PWT (C,F,I) and muscle strength (D,G,J) were assessed from 0.5 h up to 24 h after agonists' sub-nociceptive doses. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , and ###  $p < 0.001$  vs. Veh plus Veh group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. ANS plus Veh group. &&  $p < 0.01$  and &&&  $p < 0.001$  vs. Veh plus Bk/AITC group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Veh: intraplantar, intraperitoneal, or oral vehicle injections; ANS: anastrozole oral administration; Bk: bradykinin intraplantar treatment; PWT: paw withdrawal threshold.



**Figure 3.** The development of nociceptive behaviors induced by anastrozole is dependent on B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> receptors and the TRPA1 channel in mice. (A) Male C57BL/6 mice were treated by the oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviors. At 3 h after anastrozole administration (Time 0), the animals received a single administration of vehicle (10 mL/kg, intraperitoneal, i.p., or p.o.), Icatibant (100 nmol/kg, i.p.), DALBk (150 nmol/kg, i.p.), or A967079 (100 mg/kg, p.o.). After 0.5 h, vehicle (20 µL/paw, intraplantar, i.pl.) or sub-nociceptive doses of their respective agonists, Bk (1 nmol/paw, i.pl.), DABk (3 nmol/paw, i.pl.), or AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.), were injected via the intraplantar route. The overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min (B,E,H); the PWT (C,F,I) and muscle strength (D,G,J) were assessed from 0.5 h up to 5 h after agonists' sub-nociceptive doses or until treatments with the antagonists showed an effect. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ###  $p < 0.001$  vs. Veh plus Veh group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. ANS plus Veh group. \$\$  $p < 0.01$ , and \$\$\$  $p < 0.001$  vs. ANS plus Bk/DABk/AITC group. +  $p < 0.05$  vs. Veh plus Icat plus Bk group. \$\$  $p < 0.01$ , and \$\$\$  $p < 0.001$ . Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Veh: intraplantar, intraperitoneal, or oral vehicle injections; ANS: anastrozole oral administration; Bk: bradykinin intraplantar treatment; Icat: Icatibant intraperitoneal treatment; A96: A967079 oral treatment; PWT: paw withdrawal threshold.

### 3.3. Interaction of Kinin B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> Receptors and the TRPA1 Channel Sustain the Anastrozole-Induced Pain

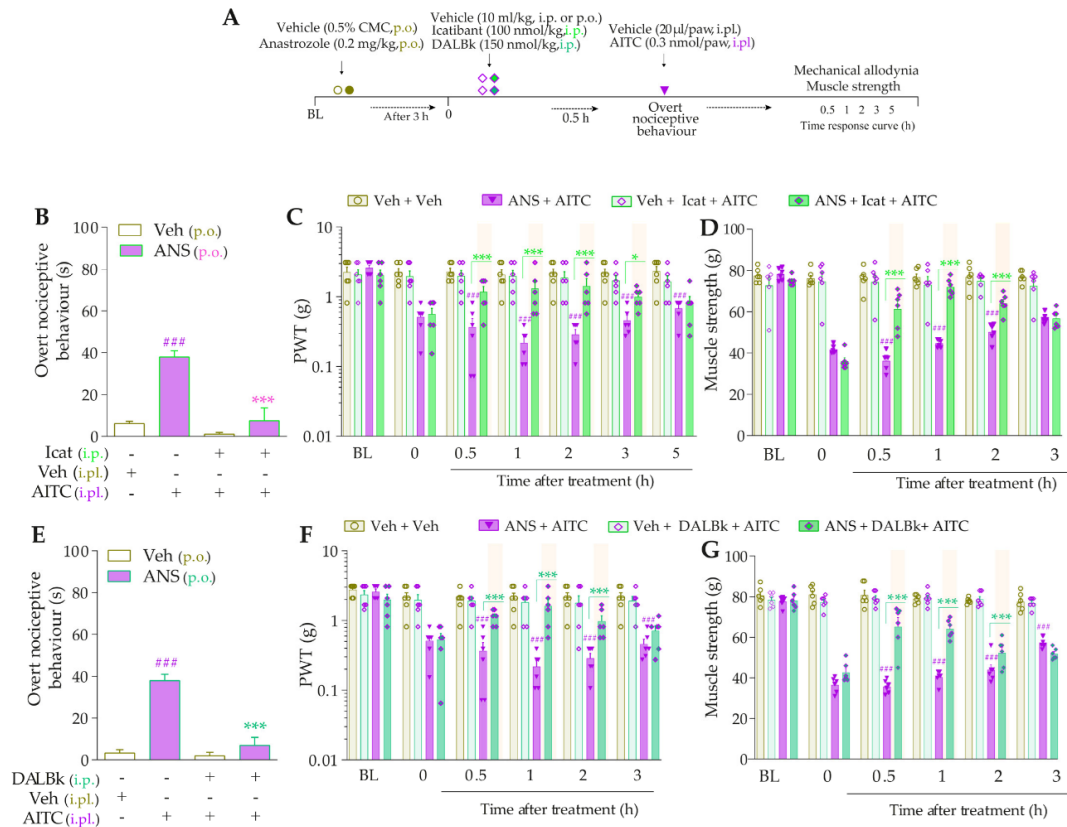
Intraplantar Bk (1 nmol/paw, i.pl.) and DABk (3 nmol/paw, i.pl.), at sub-nociceptive doses, induced significant overt nociceptive behavior (Figure 4B,E) and enhanced the mechanical allodynia (Figure 4C,F) and the muscle strength loss (Figure 4D,G) in anastrozole-treated animals compared to the vehicle plus vehicle group. A967079 (100 mg/kg, p.o., 0.5 h prior) markedly prevented the sensitizing effect induced by Bk (Figure 4B) and DABk (Figure 4E) in anastrozole-treated animals on the overt nociceptive behavior with inhibitions of  $79 \pm 7\%$  and  $66 \pm 26\%$ , respectively, compared to the anastrozole plus Bk or DABk groups. A967079 also prevented Bk- and DABk-induced responses on mechanical allodynia from 0.5 h up to 1 h for both agonists (inhibition of  $77 \pm 20\%$  and  $30 \pm 5\%$  at 1 h, respectively) (Figure 4C,F) and muscle strength loss from 0.5 h up to 2 h for both agonists (inhibition of 100% and  $65 \pm 11\%$  at 0.5 h, respectively) (Figure 4D,G).



**Figure 4.** TRPA1 channel contributes to the nociceptive behaviors induced by B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists in anastrozole-treated mice. (A) Male C57BL/6 mice were treated by the oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviors. At 3 h after anastrozole administration (Time 0), the animals received a single administration of vehicle (10 mL/kg, p.o.) or A967079 (100 mg/kg, p.o.). After 0.5 h, vehicle (20 µL/paw, intraplantar, i.pl.) or sub-nociceptive doses of agonists, Bk (1 nmol/paw, i.pl.) or DABk (3 nmol/paw, i.pl.), were injected by the intraplantar route. The overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min (B,E); the PWT (C,F) and strength muscle (D,G) were assessed until treatments with the antagonist showed an effect. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ##  $p < 0.01$  and ###  $p < 0.001$  vs. Veh plus Veh group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. ANS plus Bk/DABk group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Veh: intraplantar, intraperitoneal, or oral vehicle injections; ANS: oral administration of anastrozole; Bk: bradykinin intraplantar treatment; A96: A967079 oral treatment; PWT: paw withdrawal threshold.

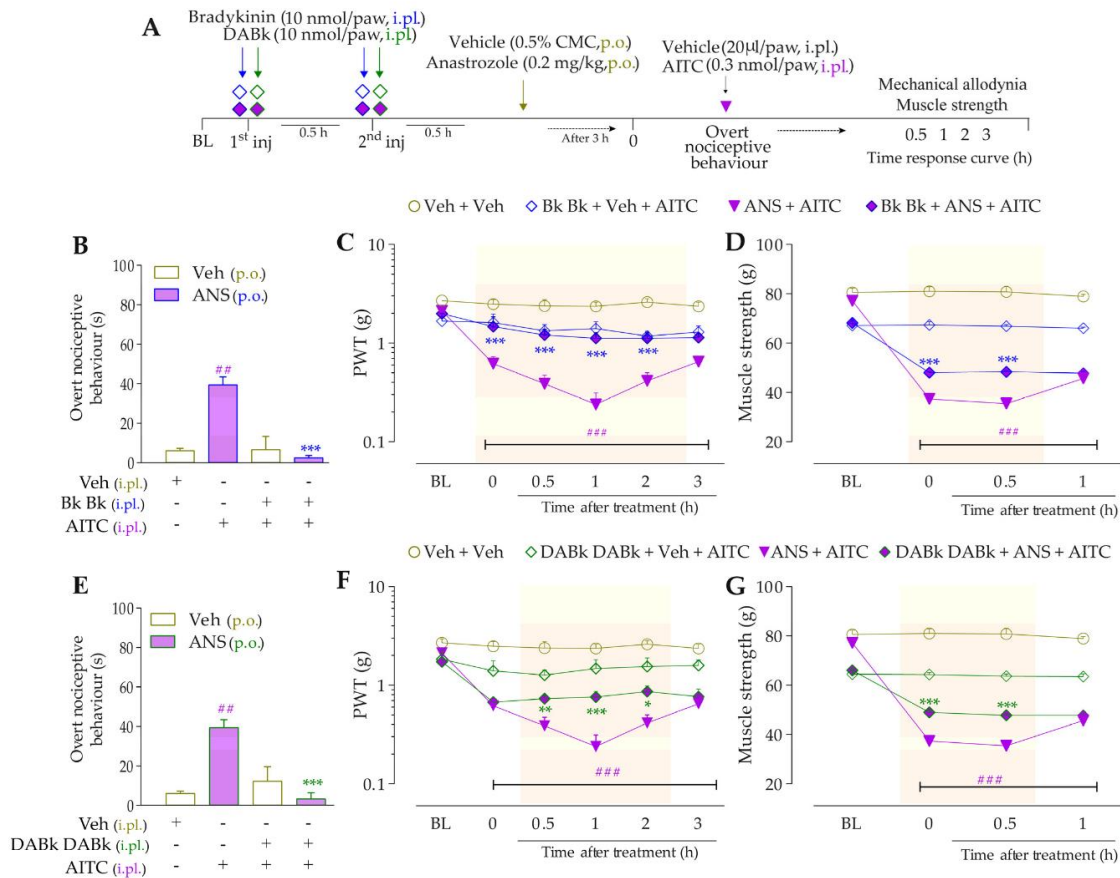


The sensitizing effect induced by TRPA1 agonist AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.) on overt nociceptive behavior, mechanical allodynia, and muscle strength loss was prevented by pre-treatment with B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R antagonists. Icatibant (100 nmol/kg, i.p., 0.5 h prior) markedly inhibited the responses induced by AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.) on the overt nociceptive behavior (Figure 5B; inhibition of 80 ± 16%), mechanical allodynia (Figure 5C), and muscle strength loss (Figure 5D) from 0.5 h up to 3 h (inhibition of 49 ± 17% at 2 h) and from 0.5 h up to 2 h (inhibition of 90 ± 7% at 1 h) after its administration, respectively. The sensitizing effect induced by AITC in anastrozole-treated animals also was prevented by the pre-treatment with DALBk (150 nmol/kg, i.p., 0.5 h prior) on the overt nociceptive behavior (Figure 5E; inhibition of 81 ± 10%), mechanical allodynia (Figure 5F), and muscle strength loss (Figure 5G) from 0.5 h up to 2 h (inhibition of 62 ± 18% at 1 h and inhibition of 99 ± 1% at 1 h, respectively). These results suggest the cooperation between kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and TRPA1 channel to mediate nociceptive parameters induced by anastrozole.



**Figure 5.** Kinin B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> receptors contribute to the nociceptive behaviors induced by the TRPA1 agonist in anastrozole-treated mice. (A) Male C57BL/6 mice were treated by the oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviors. At 3 h after anastrozole administration (Time 0), the animals received a single administration of Icatibant (150 nmol/kg, i.p.) or DALBk (100 nmol/kg, i.p.). After 0.5 h, vehicle (20 µL/paw, intraplantar, i.pl.) or AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.; sub-nociceptive dose) were injected by the intraplantar route. The overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min (B,E); the PWT (C,F) and strength muscle (D,G) were assessed until treatments with the antagonist showed an effect. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ###  $p < 0.001$  vs. Veh plus Veh group. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. ANS plus AITC group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Veh: intraplantar, intraperitoneal, or oral vehicle injections; ANS: oral administration of anastrozole; Icat: Icatibant intraperitoneal treatment; PWT: paw withdrawal threshold.

The desensitization protocol by intraplantar injection of Bk (Figure 6B) or DABk (Figure 6E) completely abrogated the AITC-induced overt nociceptive behaviors in anastrozole-treated mice (inhibitions of  $93 \pm 3\%$  and  $91 \pm 7\%$ , respectively) compared to anastrozole plus AITC-treated non-desensitized mice. In these same animals, the local desensitization with Bk and DABk also abolished the mechanical allodynia from 0.5 h up to 3 h (inhibition of  $47 \pm 10\%$  at 0.5 h and  $27 \pm 5\%$  at 1 h, respectively) (Figure 6C,F) and muscle strength loss from 0.5 h up to 1 h (inhibition of  $33 \pm 2\%$  and  $32 \pm 2\%$  at 0.5 h, respectively) (Figure 6D,G) after its injections, when compared to the non-desensitized group anastrozole plus AITC.



**Figure 6.** Kinin  $B_2$  and  $B_1$  receptors are required to stimulate TRPA1 and cause nociceptive behaviors in anastrozole-treated mice. (A) Male C57BL/6 mice received two repeated intraplantar injections of Bk (10 nmol/paw, intraplantar, i.pl.) or DABk (10 nmol/paw, i.pl.) with 0.5 h of the interval between the injections. After 0.5 h of the last administration, the animals were treated by the oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviors. After 3 h, the animals received a single injection of vehicle (20  $\mu$ L/paw, i.pl.) or AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.; sub-nociceptive dose). The overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min (B,E); the PWT (C,F) and strength muscle (D,G) were assessed until the desensitization protocol showed an effect. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ##  $p < 0.01$  and ###  $p < 0.001$  vs. Veh plus Veh group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. ANS plus AITC group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Veh: intraplantar or oral vehicle injections; ANS: oral administration of anastrozole; Bk: bradykinin intraplantar treatment; PWT: paw withdrawal threshold.

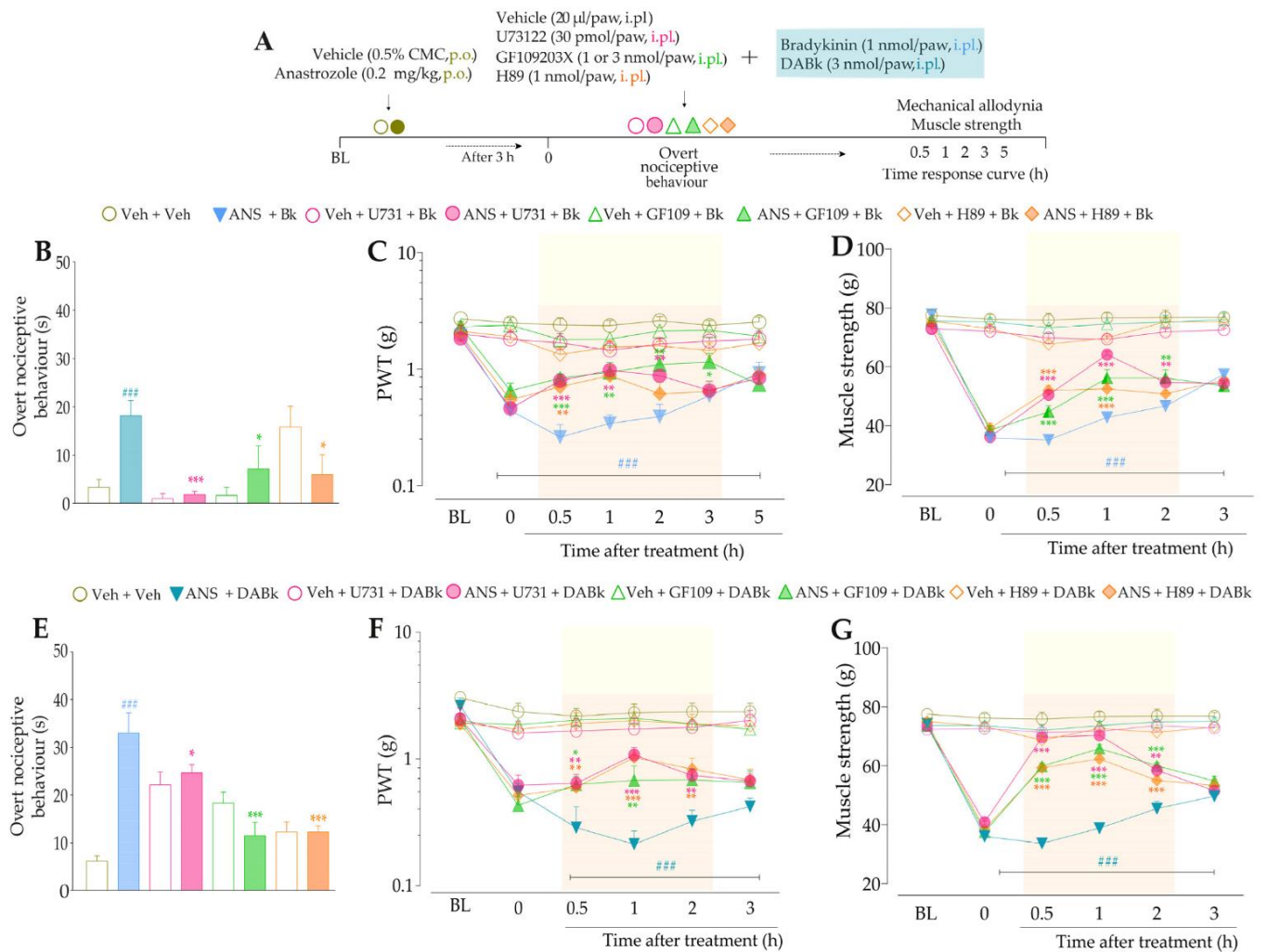
### 3.4. Intracellular Pathways Dependent on Kinin B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> Receptor Activation Cooperate to Sensitize TRPA1 in Anastrozole-Treated Mice

Firstly, we evaluated the activation of signaling pathways downstream from the B<sub>2</sub>R in the anastrozole-induced pain model. The local inhibition of PLC (U73122, 30 pmol/paw, i.pl.) or PKC (GF109203X, 1 nmol/paw, i.pl.) significantly attenuated the overt nociceptive behavior induced by a sub-nociceptive dose of Bk in animals treated with anastrozole (Figure 7B), with inhibitions of  $25 \pm 5\%$  and  $65 \pm 8\%$ , respectively. Moreover, the U73122 and GF109203X inhibitors reduced Bk-induced responses on mechanical allodynia (inhibition of  $42 \pm 9\%$  at 1 h and  $45 \pm 13\%$  at 2 h after its injections, respectively) (Figure 7C) and muscle strength loss (inhibition of  $60 \pm 3\%$  and  $38 \pm 8\%$  at 1 h after its injections, respectively) (Figure 7D) in anastrozole-treated mice. In addition, the local inhibition of PKA (H89, 1 nmol/paw, i.pl.) decreased the Bk-induced responses on the overt nociceptive behavior (inhibition of  $62 \pm 3\%$ ) (Figure 7B), mechanical allodynia (inhibition of  $36 \pm 10\%$  at 1 h after its injection) (Figure 7C), and muscle strength loss (inhibition of  $39 \pm 3\%$  at 0.5 h after its injection) (Figure 7D) in anastrozole-treated mice.

After that, we assessed the contribution of signaling pathways downstream from the B<sub>1</sub>R. The overt nociceptive behavior induced by a sub-nociceptive dose of DABk in animals treated with anastrozole was attenuated when DABk was co-injected with inhibitors of PLC (U73122) or PKA (H89), with inhibitions of  $60 \pm 23\%$  and  $67 \pm 23\%$ , respectively (Figure 7E). Furthermore, both inhibitors also reduced the responses induced by DABk on mechanical allodynia (inhibition of  $35 \pm 6\%$  and  $33 \pm 5\%$  at 1 h after its injections, respectively) (Figure 7F) and on muscle strength loss (inhibition of  $89 \pm 3\%$  and  $66 \pm 6\%$  at 1 h after its injections, respectively) (Figure 7G) in anastrozole-treated mice. The PKC inhibitor (GF109203X) at a dose of 3 but not 1 nmol/paw attenuated the overt nociceptive behavior (inhibition of  $89 \pm 4\%$ ) (Figure 7E), mechanical allodynia (inhibition of  $38 \pm 10\%$  at 1 h after its injection) (Figure 7F), and muscle strength loss (inhibition of  $76 \pm 4\%$  at 1 h after its injection) (Figure 7G) induced by a sub-nociceptive dose of DABk in anastrozole-treated animals.

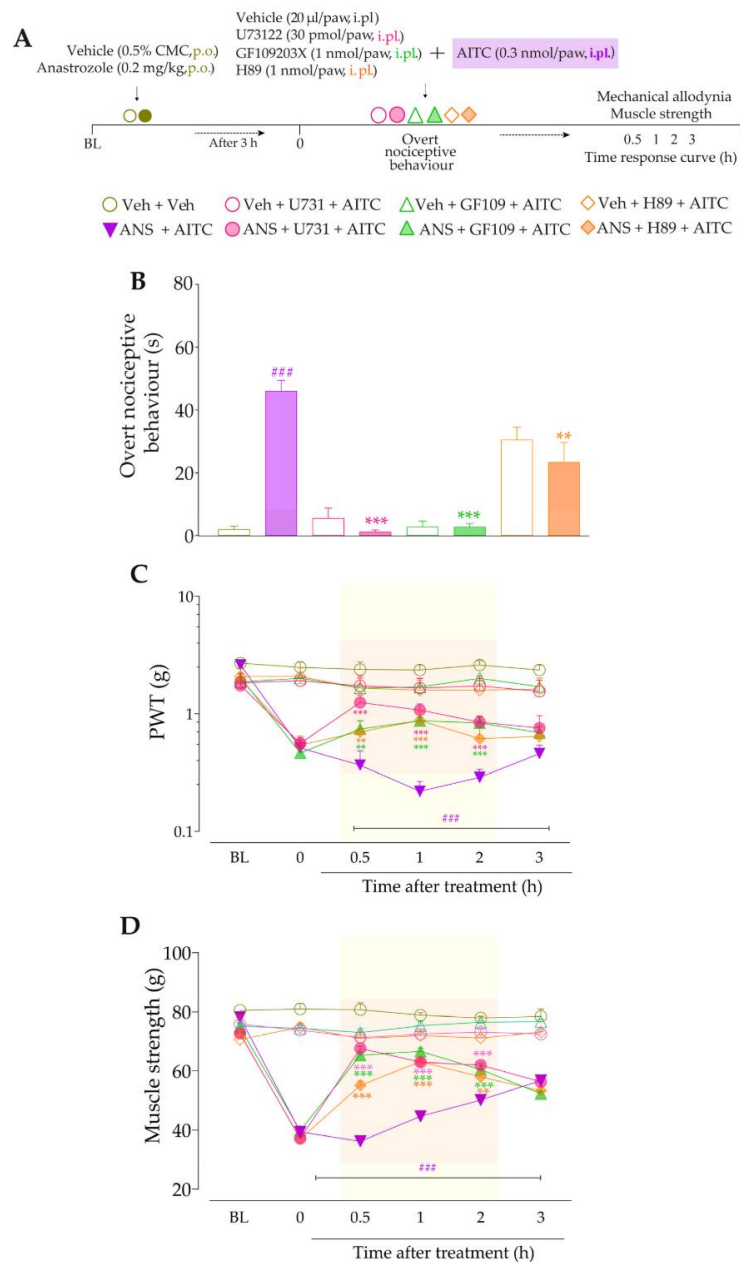
Next, we evaluated whether signaling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation could be contributing to TRPA1 activation in this model. The inhibition of PLC and PKC by U73122 and GF109203X, respectively, reduced the overt nociceptive behavior induced by a sub-nociceptive dose of AITC in animals treated with anastrozole compared to the anastrozole plus AITC group (Figure 8B), with inhibitions of  $94 \pm 3\%$  and  $97 \pm 2\%$ , respectively. Furthermore, both inhibitors, U73122 and GF109203X, reduced AITC-induced responses on overt nociceptive behavior (inhibition of  $49 \pm 1\%$ ) (Figure 8B), mechanical allodynia (inhibition of  $28 \pm 7\%$  at 1 h after its injection) (Figure 8C), and muscle strength loss (inhibition of  $52 \pm 7\%$  at 1 h after its injection) in previously anastrozole-treated mice (Figure 8D).





**Figure 7.** The signaling pathways downstream from the kinin  $B_2$  and  $B_1$  receptors are activated and contribute to the nociceptive behaviors induced by kinin agonists in anastrozole-treated mice. (A) Male C57BL/6 mice were treated by the oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviors. At 3 h after anastrozole administration (Time 0), the animals received the intraplantar (i.pl.) co-injection of U73122 (30 pmol/paw, i.pl., PLC inhibitor), GF109203X (1 or 3 nmol/paw, i.pl., PKC inhibitor), or H89 (1 nmol/paw, i.pl., PKA inhibitor), and a sub-nociceptive dose of Bk (1 nmol/paw, i.pl.) or DABk (3 nmol/paw, i.pl.). The overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min (B,E); the PWT (C,F) and strength muscle (D,G) were assessed until treatments with the inhibitors showed an effect. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ###  $p < 0.001$  vs. Veh plus Veh group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. ANS plus Bk group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test, except for the U73122 effect on overt nociceptive behavior induced by ANS plus Bk and the H89 effect on overt nociceptive behavior induced by ANS plus DABk, which were analyzed by Student's  $t$ -test. Veh: intraplantar or oral vehicle injections; ANS: oral administration of anastrozole to induce the pain model; Bk: bradykinin intraplantar treatment; U731: U73122, a PLC inhibitor; GF109: GF109203X, a PKC inhibitor; PWT: paw withdrawal threshold.





**Figure 8.** PLC/PKC and PKA signaling pathway inhibition attenuated the nociceptive behaviors induced by the TRPA1 agonist in anastrozole-treated mice. (A) Male C57BL/6 mice were treated by the oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviors. At 3 h after anastrozole administration (Time 0), the animals received the intraplantar (i.pl.) co-injection of U73122 (30 pmol/paw, i.pl., PLC inhibitor), GF109203X (1 nmol/paw, i.pl., PKC inhibitor), or H89 (1 nmol/paw, i.pl., PKA inhibitor), and a sub-nociceptive dose of AITC (0.3 nmol/paw, i.pl.). The overt nociceptive behavior was immediately evaluated for 10 min (B); the PWT (C) and strength muscle (D) were assessed until treatments with the inhibitors showed an effect. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration.  $### p < 0.001$  vs. Veh plus Veh group.  $** p < 0.01$ , and  $*** p < 0.001$  vs. ANS plus AITC group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group) and analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Veh: intraplantar or oral vehicle injections; ANS: oral administration of anastrozole; U731: U73122, a PLC inhibitor; GF109: GF109203X, a PKC inhibitor; PWT: paw withdrawal threshold.

#### 4. Discussion

AIs are the mainstay of endocrine treatment for postmenopausal women diagnosed with hormone receptor-positive breast cancer [3,7]. However, they cause musculoskeletal pain, leading to non-adherence or discontinuation of therapy [8]. Although the participation of the TRPA1 channel and kinins B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R in AI-induced pain is well characterized [13,44], the interaction between these receptors in the development and maintenance of pain remains unknown. In this study, single or repeated (for 15 days) anastrozole administration caused pain symptoms (mechanical allodynia and muscle strength loss) in mice. The local administration of B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, or TRPA1 agonists induced overt nociceptive behavior and enhanced and prolonged the pain parameters in anastrozole-treated mice. All painful behaviors mentioned above were attenuated by B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, or TRPA1 antagonists. The interaction between B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and the TRPA1 channel was confirmed using agonists and antagonists of these receptors and an *in vivo* desensitization protocol. Furthermore, we showed that signaling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation involving PLC, PKC, and PKA are crucial factors in sensitizing TRPA1 and contributing to sustaining anastrozole-induced pain symptoms.

In clinical practice, patients receive anastrozole for long periods, and many develop musculoskeletal pain that persists throughout the treatment [3,8]. In this study, we showed for the first time that anastrozole treatment for 15 days induced pain behavior in mice without causing desensitization, similar to other AIs (exemestane and letrozole) [13]. The maximum pain behavior occurred 3 h after anastrozole treatment, which is consistent with the peak plasma concentration of anastrozole in humans (2–4 h after administration) [55].

Local exposure to agonists of kinin receptors (B<sub>2</sub>R or B<sub>1</sub>R) and TRPA1 (at doses that generally do not cause nociception) is associated with immediate nociceptive responses lasting for a few minutes and more prolonged nociceptive behaviors in animals previously sensitized [13,38,40,56]. Although we have utilized sub-nociceptive doses of B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and TRPA1 agonists, it is worth mentioning that bradykinin (a B<sub>2</sub>R agonist) and AITC (a TRPA1 channel agonist) can evoke pain behaviors in a dose-dependent manner in naive animals [35,57,58]. However, even with increasing DABk doses (a B<sub>1</sub>R agonist), it does not induce painful behaviors in naive animals [23,35,59], only in animals previously sensitized by different pain models [23,57,59], such as after anastrozole treatment. Corroborating with these results, we showed for the first time that the intraplantar administration of B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, or TRPA1 agonists caused overt nociceptive behavior and enhanced the mechanical allodynia and loss of muscle strength of anastrozole-treated but not vehicle-treated mice, which were reduced by pre-treatment with their respective antagonists. In fact, systemic B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, or TRPA1 antagonists also reduced the mechanical allodynia and loss of muscle strength of AIs-treated mice [13,44].

Although AIs activate the TRPA1 channel, the AI concentration needed for its activation *in vitro* is higher than that in patient plasma [13], suggesting that additional factors interact to increase the sensitivity of TRPA1 to AIs. Indeed, previous studies have reported that TRPA1 endogenous agonists are pro-algesic mediators that contribute to sensitizing TRPA1 and generating AI-induced painful conditions [13,40]. Furthermore, PAR-2 activation also sensitizes TRPA1, causing AIs-induced pain [13]. Therefore, the current findings indicate that other pro-algesic factors or signaling pathways that might activate or sensitize TRPA1 may act along with AIs to trigger pain symptoms. In this sense, B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R activation could sensitize the TRPA1 channel once they are co-expressed in sensory neurons and participate in the painful stimulus transmission [25,27–29,60]. Once studies have shown that B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R interact with TRP channels, including TRPA1 [30,31,35,37,61], we hypothesized that B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation is a prerequisite for enhancing the sensitivity of TRPA1 to AIs.

Confirming this hypothesis, B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R antagonists prevented the sensitizing effect of the TRPA1 agonist on pain parameters in anastrozole-treated animals. Furthermore, the TRPA1 antagonist also prevented pain behaviors induced by B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R agonists, similar to other studies [33,62]. Our results are also consistent with previous studies showing that

the pharmacological inhibition or genetic deletion of TRPA1 reduces pain responses to intraplantar injections of B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists [30,33].

The repeated or continuous stimulation of G protein-coupled receptors (GPCRs) results in a desensitization process, i.e., a loss or reduction of their response [63]. Utilizing an in vivo desensitization protocol, we reinforced the interaction between B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and the TRPA1 channel in the pain symptoms induced by anastrozole. The intraplantar TRPA1 agonist injection in previously anastrozole-treated mice failed to cause pain-related behaviors in animals submitted to desensitization protocol by B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists. To date, there have been no studies performing the B<sub>1</sub>R desensitization protocol. However, both B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R receptors can be expressed in sensory neurons [29]. Once Ferreira et al. [35] demonstrated that repeated administration of Bk resulted in B<sub>2</sub>R desensitization, a GPCR, we adapted the experimental protocol for B<sub>1</sub>R desensitization. Together, these results suggest that the TRPA1 channel might be sensitized downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation, contributing to pain symptoms induced by anastrozole. However, the underlying pathways activated by kinin receptors and the putative sensitizers of TRPA1 involved in this process have not yet been elucidated. In this sense, we investigated the involvement of PLC/PKC- and PKA-dependent signaling pathways on TRPA1 sensitization from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation.

B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R stimulation leads to the activation of the PLC/PKC-dependent signaling pathway [64], resulting in increased cytosolic calcium (Ca<sup>2+</sup>) levels and diacylglycerol release. Diacylglycerol can activate PKC or be hydrolyzed by diacylglycerol lipase to generate 2-arachidonolglycerol, followed by arachidonic acid formation dependent on monoacylglycerol lipase [64,65]. The PLC/PKC pathway activation contributes to sensitizing sensory neurons, and therefore, it is critical for developing acute and chronic pain conditions [37,66–68]. Once PLC/PKC pathway inhibition reduces the painful behaviors [37,67–69], we evaluated the involvement of this signaling pathway dependent on B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation in anastrozole-treated mice. Our findings indicate that PLC and PKC activation sustains the sensitizing effect of B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists in anastrozole-treated animals once inhibition of their activity significantly attenuates the pain symptoms in animals. Consistent with these findings, previously published data has confirmed that activating the PLC/PKC signaling pathways dependent on kinin receptors is essential to assist hypersensitivity in several pain conditions in rodents [31,33,35,37,59,70].

Although less evident, some studies suggest that kinin receptors might sensitize nociceptors dependent on PKA activation [31,35,71]. Indeed, PKA signaling mediates different types of pathological pain [72–75], while its inhibition reduces the neural response [31,32] and pain behaviors [74,76,77]. Here, we identified that PKA activation seems to be critical in mediating the anastrozole-induced pain because its blockade reversed B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonist-induced sensitizing effects. It is plausible that kinin receptor activation leads to the activation of PKA by indirect mechanisms dependent on prostaglandin production. Arachidonic acid, formed by PLC/PKC signaling, is rapidly converted by cyclooxygenases to prostaglandins, which prostanoid receptors activate, stimulating cAMP production by adenylyl cyclase. cAMP activates PKA, which phosphorylates signaling proteins, including the TRPA1 channel, contributing to its activation [31,34,78]. Nonetheless, more studies are necessary to elucidate PKA activation followed by B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation.

The TRPA1 channel might be sensitized by intracellular mechanisms dependent on B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation [30,31,33,71]. The signaling molecules that activate TRPA1 downstream of PLC/PKC, or PKA are widely debated in the literature [30,32,34]. The substances metabolized during arachidonic acid hydrolysis, the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores, and TRPA1 phosphorylation by PKC and PKA are well-elucidated mechanisms [30–32,34]. These mechanisms are potentially linked and could enhance TRPA1 activity and/or trafficking to the membrane, allowing the amplification of pain symptoms [32]. We found that inhibition of the PLC/PKC and PKA pathways attenuated the overt nociceptive behavior and the sensitizing effect on pain symptoms induced by a TRPA1 agonist in anastrozole-treated animals. Our findings suggest that PLC/PKC and PKA may act downstream from



B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation to sensitize the TRPA1 channel, leading to painful anastrozole-induced symptoms. Since anastrozole action is peripherally restricted [79] and the agonists of the B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 channels and PLC/PKC and PKA signaling pathways inhibitors were locally administered, it is plausible that all the painful symptoms observed in this study are due to peripheral effects.

We reported that the B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation-dependent PLC/PKC and PKA intracellular signaling pathways seem to interact to sensitize the TRPA1 channel in anastrozole-induced pain. Thus, direct TRPA1 activation by anastrozole and indirect TRPA1 stimulation from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation appear to converge in a common nociceptive pathway. The interaction between kinin receptors and the TRPA1 channel suggests a novel paradigm to explain the development of the pain symptoms induced by anastrozole. Therefore, regulating the activation of signaling pathways downstream of B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R would be a promising alternative for developing drugs to treat AIs-related pain, such as anastrozole. The prompt and targeted treatment of pain symptoms might contribute to (i) re-establishing the quality of life of breast cancer survivors, (ii) improving adherence to AI therapy, and (iii) consequently contributing to disease control.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics15041136/s1>. Figure S1: The B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, and TRPA1 channels contribute to the development of painful behaviors induced by anastrozole in mice.

**Author Contributions:** Study concept and design: M.F.P.F., I.B. and S.M.O.; Acquisition of behaviors data: M.F.P.F., E.S.B. and G.B.; Analysis and interpretation of data: M.F.P.F., E.S.B., G.B. and S.M.O.; Drafting and revising the content of the manuscript: M.F.P.F., E.S.B., G.B., I.B. and S.M.O.; Study supervision: S.M.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Funding support for this project was provided in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001; by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS (process #21/2551-0001966-2); and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. CAPES/Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) (process #23038.002125/2021-85; Grant: #0036/2021). S.M.O. and E.S.B. are recipients of fellowships from CNPq (process #304985/2020-1 and #150611/2022-6, respectively), and M.F.P.F., G.B., and I.B. are recipients of fellowships from CAPES/PROEX (process #88882.182170/2018-01, #88887.568915/2020-00, and #88882.182148/2018-01, respectively).

**Institutional Review Board Statement:** The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Santa Maria (CEUA, process numbers 2304280220/2020 and 3026220520/2020).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

AI: Aromatase inhibitor; AITC, Allyl isothiocyanate; ANS, Anastrozole; B<sub>1</sub>R, Kinin B<sub>1</sub> receptor; B<sub>2</sub>R, Kinin B<sub>2</sub> receptor; Bk, bradykinin; BL, Baseline; Ca<sup>2+</sup>, calcium; CMC, Carboxy methylcellulose; DABk, Des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin; DAG, Diacylglycerol; DALBk, Des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradykinin; i.p., intraperitoneal; i.pl., intraplantar; Icat, Icatibant; Imax, Maximum inhibition; p.o., oral route; PWT, Paw Withdrawal Threshold; SEM, Standard Error Mean; TRP, Transient Receptor Potential; TRPA1, Transient Receptor Potential Ankyrin 1; Veh, Vehicle; A96, A967079; GF109, GF109203X; U73, U73122.

## References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef]
2. Bennett, M.; Kaasa, S.; Barke, A.; Korwisi, B.; Rief, W.; Treede, R.-D. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic cancer-related pain. *Pain* **2019**, *160*, 38–44. [CrossRef] [PubMed]

3. Tenti, S.; Correale, P.; Cheleschi, S.; Fioravanti, A.; Pirtoli, L. Aromatase Inhibitors—Induced Musculoskeletal Disorders: Current Knowledge on Clinical and Molecular Aspects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gibson, L.; Lawrence, D.; Dawson, C.; Bliss, J. Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, *2021*, CD003370. [[CrossRef](#)]
5. Nyrop, K.A.; Callahan, L.F.; Rini, C.; Altpeter, M.; Hackney, B.; DePue, A.; Wilson, A.; Schechter, A.; Muss, H.B. Aromatase inhibitor associated arthralgia: The importance of oncology provider-patient communication about side effects and potential management through physical activity. *Support. Care Cancer* **2016**, *24*, 2643–2650. [[CrossRef](#)]
6. Waks, A.G.; Winer, E.P. Breast Cancer Treatment. *JAMA* **2019**, *321*, 288. [[CrossRef](#)]
7. Burstein, H.J.; Lacchetti, C.; Anderson, H.; Buchholz, T.; Davidson, N.E.; Gelmon, K.A.; Giordano, S.H.; Hudis, C.A.; Solky, A.J.; Stearns, V.; et al. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor—Positive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 423–438. [[CrossRef](#)]
8. Henry, N.L.; Giles, J.T.; Ang, D.; Mohan, M.; Dadabhoj, D.; Robarge, J.; Hayden, J.; Lemler, S.; Shahverdi, K.; Powers, P.; et al. Prospective characterization of musculoskeletal symptoms in early stage breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *111*, 365–372. [[CrossRef](#)]
9. Laroche, F.; Coste, J.; Medkour, T.; Cottu, P.H.; Pierga, J.-Y.; Lotz, J.-P.; Beerblock, K.; Tournigand, C.; Declèves, X.; de Cremoux, P.; et al. Classification of and Risk Factors for Estrogen Deprivation Pain Syndromes Related to Aromatase Inhibitor Treatments in Women With Breast Cancer: A Prospective Multicenter Cohort Study. *J. Pain* **2014**, *15*, 293–303. [[CrossRef](#)]
10. Crew, K.D.; Greenlee, H.; Capodice, J.; Raptis, G.; Brafman, L.; Fuentes, D.; Sierra, A.; Hershman, D.L. Prevalence of Joint Symptoms in Postmenopausal Women Taking Aromatase Inhibitors for Early-Stage Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 3877–3883. [[CrossRef](#)]
11. Gaillard, S.; Stearns, V. Aromatase inhibitor-associated bone and musculoskeletal effects: New evidence defining etiology and strategies for management. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Schug, S.A.; Lavand'Homme, P.; Barke, A.; Korwisi, B.; Rief, W.; Treede, R.-D. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic postsurgical or posttraumatic pain. *Pain* **2019**, *160*, 45–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fusi, C.; Materazzi, S.; Benemei, S.; Coppi, E.; Trevisan, G.; Marone, I.M.; Minocci, D.; De Logu, F.; Tuccinardi, T.; Di Tommaso, M.R.; et al. Steroidal and non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nassini, R.; Gees, M.; Harrison, S.; De Siena, G.; Materazzi, S.; Moretto, N.; Failli, P.; Preti, D.; Marchetti, N.; Cavazzini, A.; et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* **2011**, *152*, 1621–1631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Materazzi, S.; Fusi, C.; Benemei, S.; Pedretti, P.; Patacchini, R.; Nilius, B.; Prenen, J.; Creminon, C.; Geppetti, P.; Nassini, R. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* **2012**, *463*, 561–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Trevisan, G.; Materazzi, S.; Fusi, C.; Altomare, A.; Aldini, G.; Lodovici, M.; Patacchini, R.; Geppetti, P. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3120–3131. [[CrossRef](#)]
17. Antoniazzi, C.; Nassini, R.; Rigo, F.K.; Milioli, A.M.; Bellinasso, F.; Camponogara, C.; Silva, C.R.; De Almeida, A.S.; Rossato, M.F.; De Logu, F.; et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 355–365. [[CrossRef](#)]
18. de Almeida, A.S.; Rigo, F.K.; De Prá, S.D.-T.; Milioli, A.M.; Pereira, G.C.; Lückemeyer, D.D.; Antoniazzi, C.T.; Kudsí, S.Q.; Araújo, D.M.P.A.; Oliveira, S.M.; et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma. *Pharmacol. Res.* **2020**, *152*, 104576. [[CrossRef](#)]
19. Brusco, I.; Puma, S.L.; Chiepe, K.B.; Brum, E.S.; Antoniazzi, C.T.D.; Almeida, A.S.; Camponogara, C.; Silva, C.R.; De Logu, F.; Andrade, V.M.; et al. Dacarbazine alone or associated with melanoma-bearing cancer pain model induces painful hypersensitivity by TRPA1 activation in mice. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 2797–2809. [[CrossRef](#)]
20. De Logu, F.; Marini, M.; Landini, L.; Souza Monteiro de Araujo, D.; Bartalucci, N.; Trevisan, G.; Gennaro Bruno, G.; Marangoni, M.; Schmidt, B.L.; Nigel, W.; et al. Peripheral Nerve Resident Macrophages and Schwann Cells Mediate Cancer-induced Pain. *Cancer Res.* **2021**, *81*, 3387–3401. [[CrossRef](#)]
21. Bujalska, M.; Makulska-Nowak, H. Bradykinin receptor antagonists and cyclooxygenase inhibitors in vincristine- and streptozotocin-induced hyperalgesia. *Pharmacol. Rep.* **2009**, *61*, 631–640. [[CrossRef](#)]
22. Bujalska, M.; Tatariewicz, J.; Gumulka, S.W. Effect of Bradykinin Receptor Antagonists on Vincristine- and Streptozotocin-Induced Hyperalgesia in a Rat Model of Chemotherapy-Induced and Diabetic Neuropathy. *Pharmacology* **2008**, *81*, 158–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Costa, R.; Motta, E.M.; Dutra, R.C.; Manjavachi, M.N.; Bento, A.F.; Malinsky, F.R.; Pesquero, J.B.; Calixto, J.B. Anti-nociceptive effect of kinin B 1 and B 2 receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 681–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Brusco, I.; Silva, C.R.; Trevisan, G.; Gewehr, C.D.C.V.; Rigo, F.K.; Tamiozzo, L.L.R.; Rossato, M.F.; Tonello, R.; Dalmolin, G.D.; Cabrini, D.D.A.; et al. Potentiation of Paclitaxel-Induced Pain Syndrome in Mice by Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition and Involvement of Kinins. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 7824–7837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Wotherspoon, G.; Winter, J. Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci. Lett.* **2000**, *294*, 175–178. [\[CrossRef\]](#)
26. Ca, Q.M.; Heavens, R. Basal expression of bradykinin B 1 receptor in the spinal cord in humans and rats. *Neuroreport* **2001**, *12*, 2311–2314.
27. Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Andersson, D.A.; Hwang, S.W.; et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **2003**, *112*, 819–829. [\[CrossRef\]](#)
28. Jordt, S.-E.; Bautista, D.M.; Chuang, H.-H.; McKemy, D.D.; Zygmunt, P.M.; Högestätt, E.D.; Meng, I.D.; Julius, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **2004**, *427*, 260–265. [\[CrossRef\]](#)
29. Moreau, M.E.; Garbacki, N.; Molinaro, G.; Brown, N.J.; Marceau, F.; Adam, A. The kallikrein-kinin system: Current and future pharmacological targets. *J. Pharmacol. Sci.* **2005**, *99*, 6–38. [\[CrossRef\]](#)
30. Bautista, D.M.; Jordt, S.-E.; Nikai, T.; Tsuruda, P.R.; Read, A.J.; Poblete, J.; Yamoah, E.N.; Basbaum, A.I.; Julius, D. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* **2006**, *124*, 1269–1282. [\[CrossRef\]](#)
31. Wang, S.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Cui, X.; Tominaga, M.; Noguchi, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: A molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* **2008**, *131*, 1241–1251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Schmidt, M.; Dubin, A.E.; Petrus, M.J.; Earley, T.J. Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane. *Neuron* **2009**, *64*, 498–509. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Meotti, F.C.; Figueiredo, C.P.; Manjavachi, M.; Calixto, J.B. The transient receptor potential ankyrin-1 mediates mechanical hyperalgesia induced by the activation of B1 receptor in mice. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *125*, 75–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Andrade, E.; Meotti, F.; Calixto, J. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *133*, 189–204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ferreira, J.; Da Silva, G.L.; Calixto, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B 2 kinin receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 787–794. [\[CrossRef\]](#)
36. Andrade, E.; Luiz, A.; Ferreira, J.; Calixto, J. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. *Neuroscience* **2008**, *152*, 511–520. [\[CrossRef\]](#)
37. Costa, R.; Bicca, M.A.; Manjavachi, M.N.; Segat, G.C.; Dias, F.C.; Fernandes, E.S.; Calixto, J.B. Kinin Receptors Sensitize TRPV4 Channel and Induce Mechanical Hyperalgesia: Relevance to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Mice. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 2150–2161. [\[CrossRef\]](#)
38. Brusco, I.; Justino, A.B.; Silva, C.R.; Fischer, S.; Cunha, T.M.; Scussel, R.; Machado-De-Ávila, R.A.; Ferreira, J.; Oliveira, S.M. Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *168*, 119–132. [\[CrossRef\]](#)
39. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **1983**, *16*, 109–110. [\[CrossRef\]](#)
40. De Logu, F.; Tonello, R.; Materazzi, S.; Nassini, R.; Fusi, C.; Coppi, E.; Puma, S.L.; Marone, I.M.; Sadofsky, L.R.; Morice, A.H.; et al. TRPA1 Mediates Aromatase Inhibitor-Evoked Pain by the Aromatase Substrate Androstenedione. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 7024–7035. [\[CrossRef\]](#)
41. Calixto, J.B.; Medeiros, R.; Fernandes, E.S.; Ferreira, J.; A Cabrini, D.; Campos, M.M. Kinin B 1 receptors: Key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143*, 803–818. [\[CrossRef\]](#)
42. Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **2008**, *22*, 659–661. [\[CrossRef\]](#)
43. Zameer, S.; Vohora, D. Effect of aromatase inhibitors on learning and memory and modulation of hippocampal dickkopf-1 and sclerostin in female mice. *Pharmacol. Rep.* **2017**, *69*, 1300–1307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Brusco, I.; Becker, G.; Palma, T.V.; Pillat, M.M.; Scussel, R.; Steiner, B.T.; Sampaio, T.B.; Ardisson-Araújo, D.M.P.; de Andrade, C.M.; Oliveira, M.S.; et al. Kinin B1 and B2 receptors mediate breast cancer pain associated with both the tumor and oncology therapy using aromatase inhibitors. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 1–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Chaplan, S.R.; Bach, F.W.; Pogrel, J.W.; Chung, J.M.; Yaksh, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* **1994**, *53*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)
46. Oliveira, S.; Silva, C.R.; Ferreira, J. Critical role of protease-activated receptor 2 activation by mast cell tryptase in the development of postoperative pain. *Anesthesiology* **2013**, *118*, 679–690. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Kostek, M.; Polaski, A.; Kolber, B.; Ramsey, A.; Kranjec, A.; Szucs, K. A Protocol of Manual Tests to Measure Sensation and Pain in Humans. *J. Vis. Exp.* **2016**, *118*, e54130. [\[CrossRef\]](#)
48. Dixon, W.J. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, *20*, 441–462. [\[CrossRef\]](#)
49. Brum, E.D.S.; Fialho, M.F.P.; Fischer, S.P.M.; Hartmann, D.D.; Gonçalves, D.F.; Scussel, R.; Machado-De-Ávila, R.A.; Corte, C.D.; Soares, F.A.A.; Oliveira, S.M. Relevance of Mitochondrial Dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 4202–4217. [\[CrossRef\]](#)
50. Montilla-García, Á.; Tejada, M.Á.; Perazzoli, G.; Entrena, J.M.; Portillo-Salido, E.; Fernández-Segura, E.; Cañizares, F.J.; Cobos, E.J. Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. *Neuropharmacology* **2017**, *125*, 231–242. [\[CrossRef\]](#)



51. Lintermans, A.; Van Calster, B.; Van Hoydonck, M.; Pans, S.; Verhaeghe, J.; Westhovens, R.; Henry, N.L.; Wildiers, H.; Paridaens, R.; Dieudonné, A.S.; et al. Aromatase inhibitor-induced loss of grip strength is body mass index dependent: Hypothesis-generating findings for its pathogenesis. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 1763–1769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ma, X.; He, D.; Ru, X.; Chen, Y.; Cai, Y.; Bruce, I.C.; Xia, Q.; Yao, X.; Jin, J. Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 349–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Silva, C.R.; Oliveira, S.M.; Hoffmeister, C.; Funck, V.; Guerra, G.P.; Trevisan, G.; Tonello, R.; Rossato, M.F.; Pesquero, J.B.; Bader, M.; et al. The role of kinin B 1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *75*, 260–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Curtis, M.J.; Alexander, S.; Cirino, G.; Docherty, J.R.; George, C.H.; Giembycz, M.A.; Hoyer, D.; Insel, P.A.; Izzo, A.A.; Ji, Y.; et al. Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 987–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yates, R.; Dowsett, M.; Fisher, G.; Selen, A.; Wyld, P. Arimidex (ZD1033): A selective, potent inhibitor of aromatase in post-menopausal female volunteers. *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 543–548. [[CrossRef](#)]
56. dos Santos, G.G.; Li, R.; Ng, M.P.E.; Lemes, J.B.P.; Vieira, W.F.; Nagy, I.; Tambeli, C.H.; Parada, C.A. CB 1 receptor-dependent desensitisation of TRPV1 channels contributes to the analgesic effect of dipyrone in sensitised primary sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 4615–4626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Paterson, K.J.; Zambreau, L.; Bennett, D.L.; McMahon, S.B. Characterisation and mechanisms of bradykinin-evoked pain in man using iontophoresis. *Pain* **2013**, *154*, 782–792. [[CrossRef](#)]
58. Perin-Martins, A.; Teixeira, J.M.; Tambeli, C.H.; Parada, C.A.; Fischer, L. Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated hyperalgesia and edema. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2013**, *18*, 62–74. [[CrossRef](#)]
59. Ferreira, J.; Trichês, K.M.; Medeiros, R.; Cabrini, D.A.; Mori, M.A.; Pesquero, J.B.; Bader, M.; Calixto, J.B. The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. *Neuropharmacology* **2008**, *54*, 597–604. [[CrossRef](#)]
60. Ma, Q. The expression of bradykinin B 1 receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience* **2001**, *107*, 665–673. [[CrossRef](#)]
61. Bandell, M.; Story, G.M.; Hwang, S.W.; Viswanath, V.; Eid, S.R.; Petrus, M.J.; Earley, T.J.; Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **2004**, *41*, 849–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yu, S.; Ouyang, A. TRPA1 in bradykinin-induced mechanical hypersensitivity of vagal C fibers in guinea pig esophagus. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2009**, *296*, 255–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Rajagopal, S.; Shenoy, S.K. GPCR Desensitization: Acute and Prolonged Phases. *Cell. Signal.* **2019**, *41*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Leeb-Lundberg, L.M.F.; Marceau, F.; Müller-Esterl, W.; Pettibone, D.J.; Zuraw, B. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: From Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 27–77. [[CrossRef](#)]
65. Nezhady, M.A.M.; Rivera, J.C.; Chemtob, S. Location Bias as Emerging Paradigm in GPCR Biology and Drug Discovery. *iScience* **2020**, *23*, 101643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Di Castro, A.; Drew, L.J.; Wood, J.N.; Cesare, P. Modulation of sensory neuron mechanotransduction by PKC- and nerve growth factor-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4699–4704. [[CrossRef](#)]
67. Velazquez, K.; Mohammad, H.; Sweitzer, S. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 578–589. [[CrossRef](#)]
68. Chen, H.-S.; Lei, J.; He, X.; Qu, F.; Wang, Y.; Wen, W.-W.; You, H.-J.; Arendt-Nielsen, L. Peripheral involvement of PKA and PKC in subcutaneous bee venom-induced persistent nociception, mechanical hyperalgesia, and inflammation in rats. *Pain* **2008**, *135*, 31–36. [[CrossRef](#)]
69. Li, X.; Yuan, J.; Yu, X.; Zhang, Q.; Qin, B. Effect of PKC/NF- $\kappa$ B on the Regulation of P2X<sub>3</sub> Receptor in Dorsal Root Ganglion in Rats with Sciatic Nerve Injury. *Pain Res. Manag.* **2020**, *2020*, 7104392. [[CrossRef](#)]
70. Meotti, F.; Campos, R.; da Silva, K.; Paszcuk, A.; Costa, R.; Calixto, J. Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B 1 and B 2 receptors and intracellular kinase pathways. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 1127–1139. [[CrossRef](#)]
71. Choi, S.-I.; Hwang, S.W. Depolarizing Effectors of Bradykinin Signaling in Nociceptor Excitation in Pain Perception. *Biomol. Ther.* **2018**, *26*, 255–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Chen, G.; Zhang, Y.-Q.; Qadri, Y.J.; Serhan, C.N.; Ji, R.-R. Review Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. *Neuron* **2018**, *100*, 1292–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Dutra, R.; Bicca, M.; Segat, G.; Silva, K.; Motta, E.; Pianowski, L.; Costa, R.; Calixto, J. The antinociceptive effects of the tetracyclic triterpene euphol in inflammatory and neuropathic pain models: The potential role of PKC $\epsilon$ . *Neuroscience* **2015**, *303*, 126–137. [[CrossRef](#)]
74. Fu, W.; Nelson, T.S.; Santos, D.F.; Doolen, S.; Gutierrez, J.J.; Na Ye, N.; Zhou, J.; Taylor, B.K. An NPY Y1 receptor antagonist unmasks latent sensitization and reveals the contribution of protein kinase A and Epac to chronic inflammatory pain. *Pain* **2019**, *160*, 1754–1765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Deng, Y.; Yang, L.; Xie, Q.; Yang, F.; Li, G.; Zhang, G.; Li, S.; Wu, Z.; Wang, J.; Kang, X. Protein Kinase A Is Involved in Neuropathic Pain by Activating the p38MAPK Pathway to Mediate Spinal Cord Cell Apoptosis. *Mediat. Inflamm.* **2020**, *2020*, 6420425-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Aley, K.O.; Levine, J.D. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 2181–2186. [[CrossRef](#)]
77. Yajima, Y.; Narita, M.; Shimamura, M.; Narita, M.; Kubota, C.; Suzuki, T. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. *Brain Res.* **2003**, *992*, 288–293. [[CrossRef](#)]
78. Meents, J.E.; Fischer, M.J.M.; McNaughton, P.A. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase, A. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170097. [[CrossRef](#)]
79. Miyajima, M.; Kusuhara, H.; Takahashi, K.; Takashima, T.; Hosoya, T.; Watanabe, Y.; Sugiyama, Y. Investigation of the effect of active efflux at the blood–brain barrier on the distribution of nonsteroidal aromatase inhibitors in the central nervous system. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 3309–3319. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## 4.2 ARTIGO CIENTÍFICO II

Molecular Neurobiology  
<https://doi.org/10.1007/s12035-023-03654-8>



## TRPV4 Activation and its Intracellular Modulation Mediated by Kinin Receptors Contribute to Painful Symptoms Induced by Anastrozole

Maria Fernanda Pessano Fialho<sup>1</sup> · Evelyne Silva Brum<sup>1</sup> · Gabriela Becker<sup>1</sup> · Sara Marchesan Oliveira<sup>1,2</sup>

Received: 24 May 2023 / Accepted: 12 September 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

### Abstract

Anastrozole, an aromatase inhibitor, induces painful musculoskeletal symptoms, which affect patients' quality of life and lead to therapy discontinuation. Efforts have been made to understand the mechanisms involved in these painful symptoms to manage them better. In this context, we explored the role of the Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4), a potential transducer of several nociceptive mechanisms, in anastrozole-induced musculoskeletal pain in mice. Besides, we evaluated the possible sensibilization of TRPV4 by signalling pathways downstream, PLC, PKC and PKC $\epsilon$  from kinin B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) and B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) receptors activation in anastrozole-induced pain. Anastrozole caused mechanical allodynia and muscle strength loss in mice. HC067047, TRPV4 antagonist, reduced the anastrozole-induced mechanical allodynia and muscle strength loss. In animals previously treated with anastrozole, the local administration of sub-nociceptive doses of the TRPV4 (4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution), B<sub>2</sub>R (Bradykinin) or B<sub>1</sub>R (DABk) agonists enhanced the anastrozole-induced pain behaviours. The sensitizing effects induced by local injection of the TRPV4, B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists in animals previously treated with anastrozole were reduced by pre-treatment with TRPV4 antagonist. Furthermore, inhibition of PLC, PKC or PKC $\epsilon$  attenuated the mechanical allodynia and muscle strength loss induced by TRPV4, B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists. The generation of painful conditions caused by anastrozole depends on direct TRPV4 activation or indirect, e.g., PLC, PKC and PKC $\epsilon$  pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation. Thus, the TRPV4 channels act as sensors of extracellular and intracellular changes, making them potential therapeutic targets for alleviating pain related to aromatase inhibitors use, such as anastrozole.

**Keywords** Musculoskeletal Pain · Aromatase Inhibitors · TRPs · Intracellular Pathways · Breast Cancer

### Abbreviations

AI	Aromatase inhibitor
B <sub>1</sub> R	B <sub>1</sub> Receptor
B <sub>2</sub> R	B <sub>2</sub> Receptor
Bk	Bradykinin
BL	Baseline
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CMC	Carboxymethylcellulose

DABk	Des-Arg <sup>9</sup> -bradykinin
DAG	Diacylglycerol
DALBk	Des-Arg <sup>9</sup> -[Leu <sup>8</sup> ]-bradykinin
i.p.	Intraperitoneal
Hypo	Hypotonic solution
i.pl.	Intraplantar
p.o.	Oral route
PWT	Paw Withdrawal Threshold
SEM	Standard Error of the Mean
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA1	Transient Receptor Potential Ankyrin 1
TRPV4	Transient Receptor Potential Vanilloid 4

✉ Sara Marchesan Oliveira  
[saramarchesan@ufsm.br](mailto:saramarchesan@ufsm.br)

<sup>1</sup> Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Centre of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Centre of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

## Introduction

Cancer is the second leading cause of death worldwide, with incidence rates overspreading in recent decades [1]. Breast cancer is the most common in women, estimated at more than 2.3 million new cases yearly [1, 2]. Due to advances in oncological therapies, many breast cancer patients survive for many years, and the majority are sequelae after diagnosis and oncologic treatments, with pain being a prevalent symptom [1, 3]. Causes of pain reported by breast cancer survivors might be caused by the tumour itself or its metastases or the treatment regimen (chemotherapy, radiation, and adjuvant endocrine therapies) affecting patients' quality of life and may lead to premature discontinuation of treatments [1, 3].

Adjuvant endocrine therapies, such as aromatase inhibitors (AI), represent the main pharmacologic approach for women diagnosed with hormone receptor-positive breast cancer and are prescribed for at least five years after cancer diagnosis [2, 4]. Anastrozole is the AI most prescribed (in 64% of cases) for breast cancer-diagnosed postmenopausal women [2, 5, 6]. Although well tolerated, AI are not entirely free of adverse events [2, 7, 8]. About 30–60% of AI users experience pain, mainly musculoskeletal symptoms, described as symmetrical joint pain, morning stiffness, myalgia, and decreased strength. Furthermore, in some cases, these painful symptoms resemble diffuse (22%), mixed (11%), or neuropathic (9%) types of pain which often determines incomplete treatment [7–9]. Also, drugs commonly used to treat pain caused by inflammatory joint disorders have poor or no effect in softening AI-induced pain [9, 10]. Therefore, pursuing new mechanisms and pathways involved in these pain processes that might manage pain intensity is indispensable.

Efforts have been made to understand the mechanisms involved in painful symptoms related to AI use to manage them better. Increasing interest has been given to receptors and ion channels expressed on sensory neurons as potential targets to explain the genesis of pain symptoms reported by AI users [11–13]. Indeed, studies have demonstrated that the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1), kinin B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) and B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) receptors contribute to the development and maintenance of AI-associated symptoms [11, 13]. Furthermore, signalling pathways dependent on B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation, PLC, PKC and PKA sensitize TRPA1, favouring anastrozole-induced painful symptoms [12]. Beyond that, current evidence does not exclude that pro-algesic factors additional might operate alone or together to induce AI use-related pain [11–14].

A potential pharmacological target that might be involved in AI-associated painful symptoms is another TRP family member, the TRP Vanilloid 4 (TRPV4), which is

co-localized with the TRPA1 channel in primary sensory neurons [15, 16]. The TRPV4 is a non-selective cationic channel that mediates the ions influx, such as calcium ions and is widely expressed in peripheral and central neuronal and non-neuronal tissues [17, 18]. TRPV4 can be activated by hypo-osmolarity, mechanical stimulus, and innocuous warm temperatures (27–35 °C). Endogenous (such as arachidonic acid and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)) or exogenous (such as 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD)) substances also activate the TRPV4 channel [16–21]. Furthermore, the TRPV4 is emerging as a major component in the nociceptive mechanisms in pain models strongly related to symptoms caused by AI, such as musculoskeletal and neuropathic pain [16, 22–29]. Although the activation mechanisms of TRPV4 may vary, its intracellular phosphorylation mediated by protein kinases is a predominant mechanism for its modulation and, thus, facilitates the development of painful conditions [16, 18, 30–32]. Indeed, signalling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation, including the PLC, PKC and PKC $\epsilon$  pathways, are known by phosphorylate and sensitise the TRPV4 [23, 32, 33]. Thus, the TRPV4 channels act as sensors of extracellular and intracellular changes, making them potential therapeutic targets for treating pathological pain.

It is plausible to suggest that TRPV4 and its sensibilization mediated by kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R may act together to sustain AI-induced pain symptoms. However, until now, no studies have demonstrated the TRPV4 involvement and its sensibilization by signalling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation in AI-induced pain, such as anastrozole. Herein, we provide evidence of TRPV4's contribution to the anastrozole-induced pain model. Furthermore, we showed that signalling pathways downstream, PLC, PKC and PKC $\epsilon$  from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation, contribute to TRPV4 sensitizing in this pain model.

## Materials and Methods

### Drugs and Reagents

All reagents utilized were analytical grade and, when not mentioned, were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Anastrozole was acquired from Sun Farmacêutica do Brasil Ltda (Brazil) and dissolved in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC). Bradykinin (Bk; B<sub>2</sub>R agonist), des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (DABk; B<sub>1</sub>R agonist), Icatibant (B<sub>2</sub>R antagonist) and des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradykinin (DALBk; B<sub>1</sub>R antagonist) were prepared as stock solutions in phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM). HC067047 (TRPV4 antagonist) was dissolved in 5% DMSO and 5% Tween 80 (final concentration administered). The stock

solutions of 4 $\alpha$ -Phorbol 12,13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD, TRPV4 agonist) were prepared in 100% DMSO, U73122 (PLC inhibitor) and GF109203X (PKC inhibitor) were prepared in 10% absolute ethanol and  $\epsilon$ V1–2 solution (PKC $\epsilon$  inhibitor) was prepared in PBS. All the stock solutions were diluted to the desired concentration just before use. The final concentration of all solutions containing ethanol or DMSO did not exceed 0.5% and 2%, respectively, and did not cause any detectable effect *per se*. The hypotonic solution (deionized water, TRPV4 agonist) was prepared before use. Isotonic solution (0.9% NaCl) was used as the vehicle of hypotonic solution and to dilute reagents administered by oral or intraperitoneal route. PBS (10 mM) was used to dilute reagents administered by the intraplantar route. All control groups (vehicles) received the vehicles in which the treatments were solubilized. Oral and intraperitoneal treatments were administered in mice in a volume of 10 mL/kg. The intraplantar injection did not exceed the volume of 20  $\mu$ L per paw, except when co-injected with the hypotonic solution (30  $\mu$ L per paw). The doses of the drugs used in this study were based on previous studies [13, 23, 34–36].

## Animals

Male C57BL/6 mice (25–30 g) were used and maintained at temperature-controlled ( $22 \pm 1$  °C) under a 12-h light / dark cycle and with standard laboratory chow and water *ad libitum*. The animals were habituated to the experimental room at least 1 h before the experiments. Experimental protocols followed ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals [37]. The experiments also were performed following the national and international legislation (guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation Control – CONCEA – and of the U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Santa Maria (process #3026220520/2020 and #4535190722/2022). The choice of the male sex was based on previous studies [11, 12, 14] and due to their low oestrogen concentrations since anastrozole is used in breast cancer-diagnosed postmenopausal women treatment [2, 4].

The number of animals and the intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the treatments. A group size of 6 animals was used for experiments with anastrozole AI based on power calculations (G\*Power version 3.1.9.7). Allocation concealment was performed using a randomization procedure (<http://www.randomizer.org/>) and according to the baseline thresholds before the treatment administrations. All

experiments were also performed by experimenters blinded to drug administration or the group to be tested.

## Anastrozole-Induced Pain Model

The dose of anastrozole used to induce painful behaviours in mice was based on the human dose of 1 mg recommended by the Food and Drug Administration to treat breast cancer-diagnosed postmenopausal women [5]. Thus, from the conversion factor from human to mouse indicated by the National Institute of Health [38] and according to previous studies [12, 13, 39], we have used the dose of 0.2 mg/kg to induce the pain model in mice. The experimental protocol consisted of administering anastrozole (0.2 mg/kg) by oral route (p.o.) or vehicle (control group, 10 mL/kg, p.o.; 0.5% CMC).

In clinical practice, anastrozole is used daily over long periods (from 5 up to 10 years). However, we observed recently that independent of the treatment anastrozole time (a single administration or during 15 consecutive days of treatment), the mice developed painful behaviours similarly on all days evaluated [12]. Based on that, we used single anastrozole administration in this study to assess the TRPV4 involvement in the anastrozole-induced pain model.

## Study Design for Behavioural Assessment

Since previous studies have shown that AIs do not cause stimuli-independent pain at any time after the treatment [11–13], we evaluate the stimuli-evoked pain (mechanical allodynia) and muscle strength. Mechanical allodynia (von Frey test) and muscle strength (Grip test) were evaluated before (baseline) and at 2 h after the anastrozole or vehicle administration (time 0, baseline 2). Next, the animals were submitted to several treatment protocols (see more details below), and these behavioural parameters were re-evaluated at various times after treatments. Furthermore, we had chosen the time (h) when agonists’ intraplantar treatment induced the maximum nociceptive effect in anastrozole-treated mice to evaluate the antagonist and inhibitors’ pharmacological effects.

## Assessment of TRPV4 Involvement in Anastrozole-Induced Pain

To evaluate the participation of TRPV4 on mechanical allodynia and muscle strength loss induced by anastrozole, the mice received a single administration of HC067047 (10 mg/kg, intraperitoneal, i.p., TRPV4 channel antagonist) or its vehicle (10 ml/kg, i.p.) at 2 h after anastrozole administration. The mechanical paw withdrawal threshold (PWT) and muscle strength were evaluated at different time points



(from 0.5 h up to 3 h) subsequently to treatments [(following the protocol described below (“Mechanical Allodynia” and “Muscle strength”)]. The experimental design is represented in Fig. 1A.

After, we investigated whether sub-nociceptive doses of TRPV4 channel agonists could sensitize the painful behaviours of the anastrozole-treated mice. For this, the animals were previously treated with anastrozole or vehicle. After 2 h of anastrozole or vehicle administration, the animals received intraplantar (i.pl.) injection of 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/paw, TRPV4 agonist) or hypotonic solution (deionized water, 20  $\mu$ L/paw, TRPV4 agonist), or their vehicles (20  $\mu$ L/paw, i.pl.). Mechanical PWT and muscle strength were evaluated from 0.5 up to 5 h after agonist injections. Other animal groups received HC067047 at 2 h after anastrozole. After 0.25 h of HC067047 treatment, the same animals were treated with sub-nociceptive doses of their agonists, 4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution by i.pl. route. After 1 h of agonist injections (time of the maximum nociception), the mechanical PWT and muscle strength loss were measured to evaluate the antinociceptive effect of the TRPV4 antagonist HC067047. The experimental designs are represented in Fig. 2A and Fig. 3A.

#### Interaction Assessment of the Kinin Receptors and TRPV4 in the Anastrozole-Induced Painful Behaviours

First, we investigated whether sub-nociceptive doses of kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists could enhance the painful behaviours of the anastrozole-treated mice. For this, the animals received intraplantar (i.pl.) injections of Bk (1 nmol/paw, B<sub>2</sub>R agonist) or DABk (3 nmol/paw, B<sub>1</sub>R agonist) or their vehicles (20  $\mu$ L/paw, i.pl.). Mechanical PWT and muscle strength were evaluated from 0.5 up to 5 h after the kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonist injections. The experimental design is represented in Fig. 4A.

After, we explored whether the interaction between kinin receptors, B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R, and TRPV4 might contribute to anastrozole-induced pain. For this, the animals were treated with anastrozole or vehicle. After 2 h of anastrozole or vehicle administration, mice received HC067047 (10 mg/kg, i.p. TRPV4 antagonist), or Icatibant (100 nmol/kg, i.p., B<sub>2</sub>R antagonist), or DALBk (150 nmol/kg, i.p., B<sub>1</sub>R antagonist) or their vehicles (10 mL/kg, i.p.). After 0.25 h of antagonists' treatments, the animal group treated with the systemic TRPV4 antagonist received the intraplantar injection of either B<sub>2</sub>R or B<sub>1</sub>R agonists (Bk or DABK, 1 or 3 nmol/paw, respectively). Further, kinin B<sub>2</sub>R or B<sub>1</sub>R antagonists-treated animals received the i.pl. injection of TRPV4 agonists, 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/paw) or hypotonic solution (20  $\mu$ L/

paw). After 1 h of agonists injections (time of the maximum nociception), the mechanical PWT and muscle strength loss were measured to evaluate the antinociceptive effects of the kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and TRPV4 antagonists. The experimental designs are represented in Fig. 4A and 5A.

#### Intracellular Pathways Dependent on Kinin Receptors Activation and TRPV4 Sensitization

We evaluated whether intracellular signalling pathways dependent on kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation mediate the anastrozole-induced pain. The animals were treated with anastrozole or vehicle. After 2 h of anastrozole or vehicle administration, these mice received intraplantar co-injection containing either inhibitor of PLC (U73122, 30 pmol/paw, i.pl.), PKC (GF109203X, 1 nmol/paw, i.pl.) or PKC $\epsilon$  ( $\epsilon$ V1-2, 10 nmol/paw, i.pl.) plus kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists, Bk (1 nmol/paw, i.pl.) or DABK (3 nmol/paw, i.pl.). At 1 h after intraplantar injections, the mechanical PWT and muscle strength were assessed. The experimental design is represented in Fig. 6A.

Next, we evaluated whether signalling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation could contribute to TRPV4 sensitization in this pain model. At 2 h after of anastrozole or vehicle administration, the animals received intraplantar co-injection containing either inhibitor of PLC, PKC or PKC $\epsilon$  plus TRPV4 agonists, 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/paw) or hypotonic solution (20  $\mu$ L/paw). At 1 h after intraplantar injections, the mechanical PWT and muscle strength were assessed. The experimental design is represented in Fig. 7A.

#### Behavioural Experiments

##### Mechanical Allodynia

The assessment of mechanical allodynia was carried out using flexible nylon filaments (von Frey) of increasing stiffness (0.02–10 g) by the Up-and-Down method [40, 41]. The von Frey test is widely used in pre-clinical and clinical settings for measuring pain [42, 43]. The PWT to the mechanical stimulus was calculated from the resulting scores as previously described [44]. The mechanical PWT was expressed in grams (g), and a significant decrease in the PWT compared with the baseline values or control group was considered mechanical allodynia.

##### Muscle Strength

The muscle strength test in mice was evaluated using a grip strength meter (Grip Strength meter EFF 305 – Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) [45], a test used in preclinical and clinical settings for the study of musculoskeletal pain

[46, 47]. The test consists of the experimenter gently holding the mouse by the base of the tail, allowing the animal to grab the metal bar with the forelimbs and hindlimbs before being gently pulled until it releases its grip. The forelimbs and hindlimbs muscle strength, expressed in grams (g), was measured 3 times per mouse with at least 1 min interval between measurements. A significant decrease in muscle strength compared with the baseline values or control group was considered muscle strength loss.

### Statistical Analyses

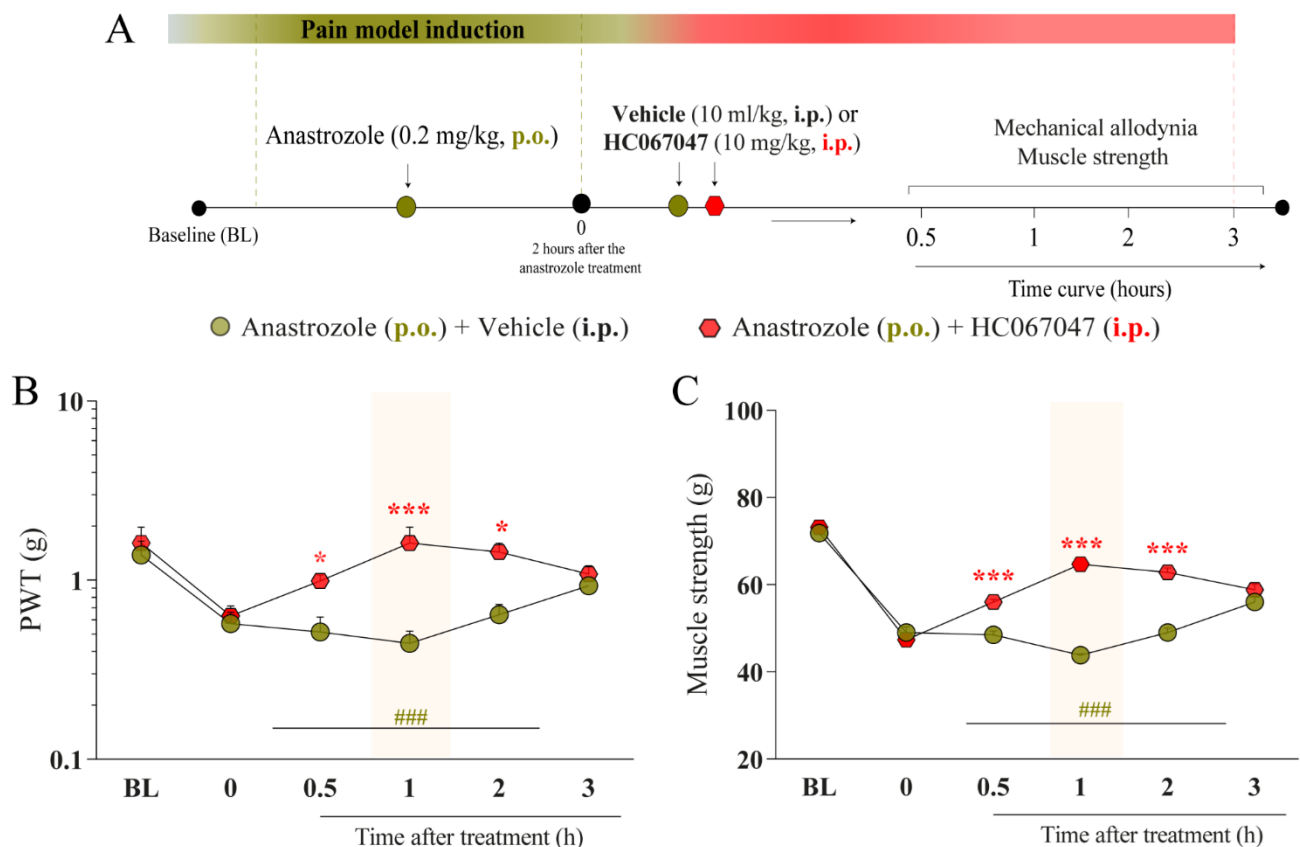
The results were expressed as the mean + standard error of the mean (SEM), which were expressed as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Parametric data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post hoc* test using the GraphPad Prism 8.0 software (San Diego, CA, U.S.A.). To meet parametric assumptions, mechanical

threshold data were log-transformed before analyses. The inhibition percentages were calculated for the maximal developed responses compared to baseline 1 values or the control group. P-values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered statistically significant.

## Results

### TRPV4 Channel Contributes to Pain Induced by Anastrozole

Mice treated with anastrozole (0.2 mg/kg, p.o.) developed mechanical allodynia and muscle strength loss at 2 h after administration (Time 0, Fig. 1B, and C) when compared to baseline values. The intraperitoneal (i.p.) treatment with TRPV4 antagonist HC067047 (10 mg/kg, i.p.) reduced the anastrozole-induced mechanical allodynia and muscle strength loss from 0.5 up to 2 h after its administration



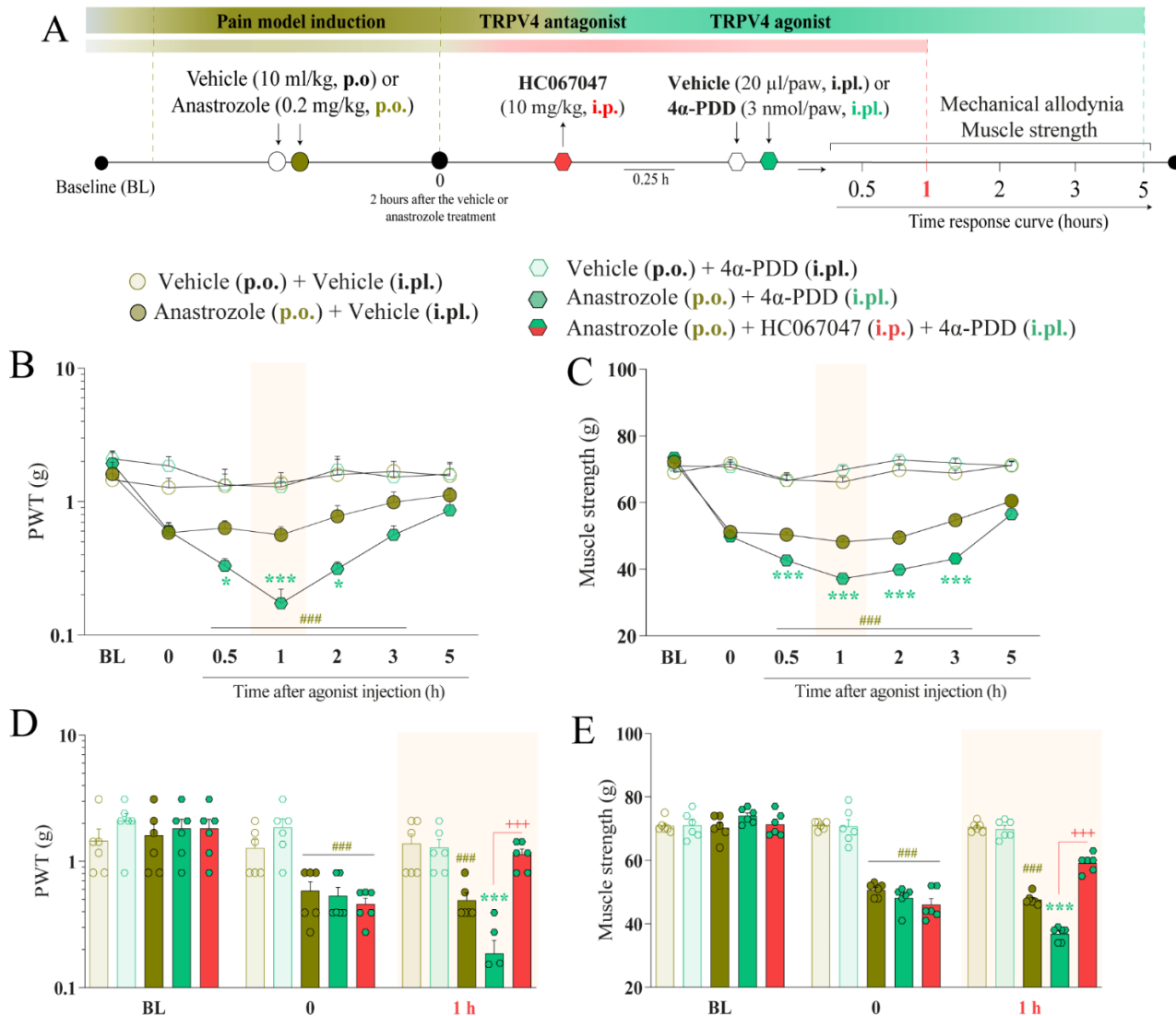
**Fig. 1** Anastrozole-induced painful behaviours are dependent on TRPV4 in mice. **(A)** Male C57BL/6 mice treated by oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) presented mechanical allodynia and muscle strength loss compared to baseline (BL) values. At 2 h after anastrozole administration (Time 0), the mice received a single intraperitoneal (i.p.) treatment of HC067047 (10 mg/kg, i.p., TRPV4 antagonist) or its vehicle (10 ml/kg, i.p.). The mechanical PWT **(B)** and strength

muscle **(C)** were evaluated again from 0.5 up to 3 h after antagonist treatment. Baseline (BL) values were measured before anastrozole administration. ### $p < 0.001$  vs. BL values. \* $p < 0.05$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Vehicle group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group; two independent experiments with  $n = 3$  mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold

(Fig. 1B and C), with inhibition of 100% and  $34 \pm 2\%$  at 1 h after treatment, respectively.

The intraplantar (i.pl.) injection of TRPV4 agonist,  $4\alpha$ -PDD (3 nmol/paw; sub-nociceptive dose) enhanced the mechanical allodynia (from 0.5 up to 2 h) and muscle strength loss (from 0.5 up to 3 h) in anastrozole-treated mice when compared to the anastrozole plus vehicle group

(Fig. 2B and C), with the maximum increase in the nociceptive response of 3.3- and 1.3-fold at 1 h after injections, respectively. HC067047 (0.25 h prior of  $4\alpha$ -PDD) reduced the mechanical allodynia and muscle strength loss (Fig. 2D and E) induced by  $4\alpha$ -PDD, with inhibition of  $55 \pm 7\%$  and  $60 \pm 3\%$  at 1 h after  $4\alpha$ -PDD injection, respectively (Fig. 2D and E).



**Fig. 2** TRPV4 agonist,  $4\alpha$ -PDD, enhanced the anastrozole-induced painful behaviours. Male C57BL/6 mice were treated oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviours. At 2 h after anastrozole administration (Time 0), the vehicle (20  $\mu$ l/paw, intraplantar, i.pl.), or the sub-nociceptive dose of  $4\alpha$ -PDD (3 nmol/paw, i.pl., TRPV4 agonist) were injected by intraplantar route. The mechanical PWT (**B**) and muscle strength (**C**) were assessed from 0.5 h up to 5 h after the agonist' injection. In another set of experiments, the anastrozole-treated mice received a single treatment of vehicle (10 ml/kg, intraperitoneal, i.p.) or HC067047 (10 mg/kg, i.p.). After 0.25 h of HC067047 treatment, vehicle (20  $\mu$ l/paw,

intraplantar, i.pl.) or the sub-nociceptive dose of  $4\alpha$ -PDD (3 nmol/paw, TRPV4 agonist) was injected by the intraplantar route. The mechanical PWT (**D**) and muscle strength (**E**) were assessed 1 h after agonist injection. Baseline (**BL**) values were measured before the anastrozole or vehicle administration.  $###p < 0.001$  vs. Vehicle plus Vehicle group.  $*p < 0.05$ , and  $***p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Vehicle group.  $+++p < 0.001$  vs. Anastrozole plus  $4\alpha$ -PDD group. Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /group; two independent experiments with  $n = 3$  mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold



Like 4 $\alpha$ -PDD, hypotonic solution (another TRPV4 agonist) also enhanced mechanical allodynia (from 0.5 h up to 1 h) and muscle strength loss (from 0.5 h up to 3 h) (Fig. 3B and C) in previously anastrozole-treated animals when compared to the anastrozole plus vehicle group, with the maximum increase in the nociceptive response of 3.4- and 1.3-fold at 1 h after agonist injection, respectively. HC067047, administered 0.25 h before TRPV4 agonist, reduced the hypotonic solution-induced mechanical allodynia and muscle strength loss in anastrozole-treated mice, and their respective local agonists, providing additional evidence of the involvement of TRPV4 in this pain model.

As expected, sub-nociceptive doses of the 4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution agonists did not alter the mechanical PWT and muscle strength loss in animals previously treated with vehicle (Fig. 2 and Fig. 3).

### Interaction Between Kinin Receptors and the TRPV4 Channel Contributes to Anastrozole-Induced Nociceptive Behaviours

The intraplantar injection of sub-nociceptive doses of Bk (1 nmol/paw, i.pl.) and DABk (3 nmol/paw, i.pl.) enhanced the mechanical allodynia (Fig. 4B, with the maximum increase in the nociceptive response of 1.8- and 1.7-fold at 1 h after injections, respectively), and muscle strength loss (Fig. 4C, with the maximum increase in the nociceptive response of 1.3- at 1 h after agonist injections) in anastrozole-treated mice. The pre-treatment with HC067047 (10 mg/kg, i.p., administered 0.25 h before Bk- and DABk-agonists) prevented the Bk- and DABk-induced responses on mechanical allodynia at 1 h after agonist injections, with inhibition of 32  $\pm$  3% and 20  $\pm$  4%, respectively (Fig. 4D). Furthermore, the pre-treatment with HC067047 also prevented the sensitizing effect induced by Bk and DABk in anastrozole-treated mice on muscle strength loss, with inhibition of 67  $\pm$  1% and 55  $\pm$  4% at 1 h after agonist injections, respectively (Fig. 4E).

Furthermore, the sensitizing effect of TRPV4 agonists, 4 $\alpha$ -PDD (3 nmol/paw) and hypotonic solution (deionized water) on mechanical allodynia and muscle strength loss were prevented by pre-treatment with kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R antagonists. Icatibant, a B<sub>2</sub>R antagonist (150 nmol/kg, i.p., administered 0.25 h before TRPV4 agonists), inhibited the responses induced by 4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution (Fig. 5B and C) on mechanical allodynia (with inhibition of 30  $\pm$  9% and 60  $\pm$  8% respectively) (Fig. 5B) and muscle strength loss (with inhibition of 26  $\pm$  3% and 68  $\pm$  6%,

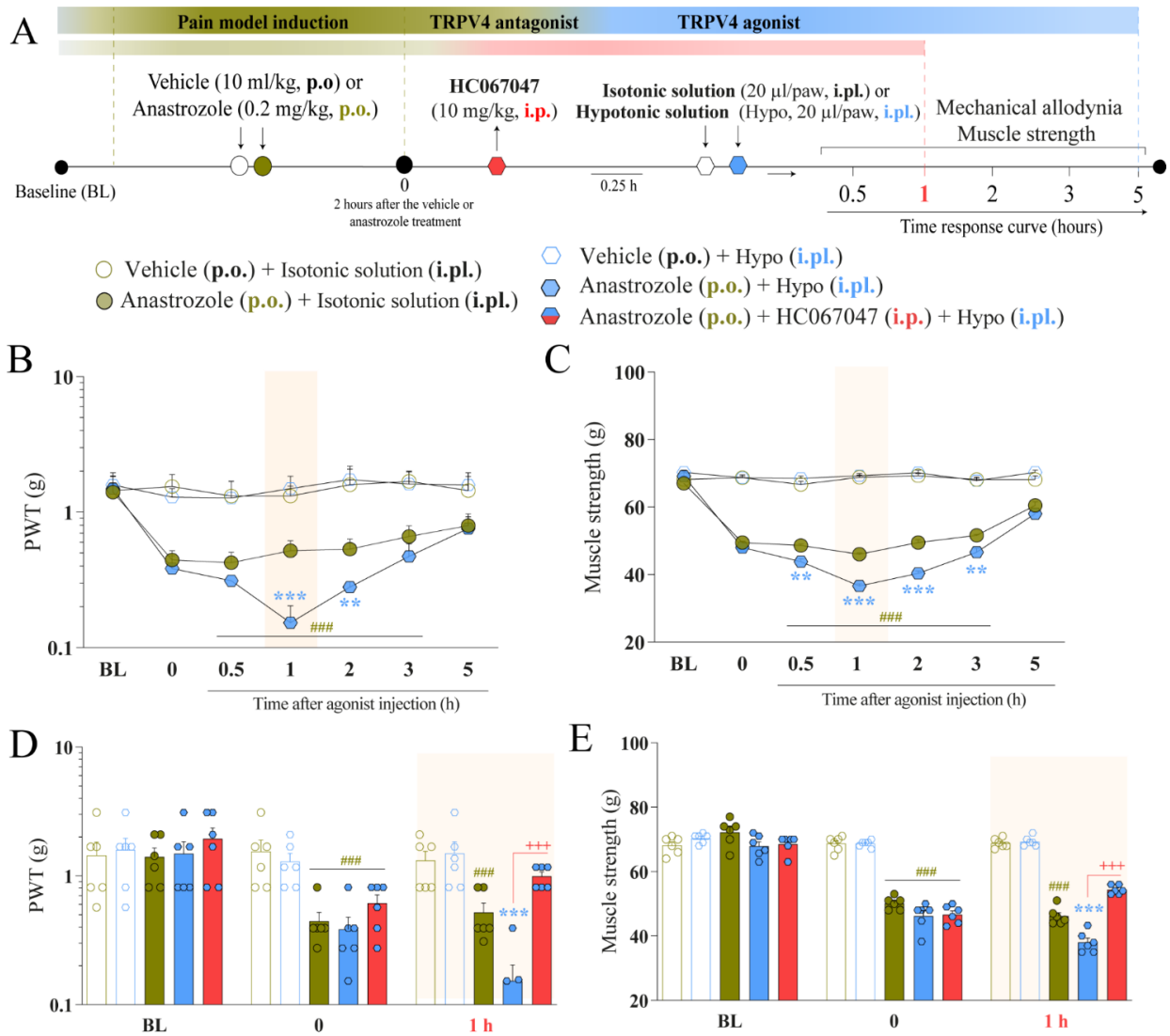
respectively) at 1 h after agonist injections, in previously anastrozole-treated mice (Fig. 5C).

DALBk, a kinin B<sub>1</sub>R antagonist, also prevented the sensitizing effects of 4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution (Fig. 5D and E) in anastrozole-treated mice on mechanical allodynia (with inhibition of 24  $\pm$  7% and 68  $\pm$  9%, respectively) (Fig. 5D) and muscle strength loss (with inhibition of 28  $\pm$  6% and 70  $\pm$  6%, respectively) (Fig. 5E) at 1 h after agonist injections. Altogether, these results suggest the cooperation between kinin B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> receptors and TRPV4 **Activation Cooperate in Sensitising the TRPV4 Channel in Anastrozole-Treated Mice**

Firstly, we confirmed the activation of signalling pathways downstream from kinin B<sub>2</sub>R on the anastrozole-induced pain model. The local inhibition of PLC (U73122, 30 pmol/paw, i.pl.) or PKC (GF109203X, 1 nmol/paw, i.pl.) reduced Bk-induced responses on mechanical allodynia (inhibition of 54  $\pm$  8% and 38  $\pm$  4% at 1 h after treatments, respectively) (Fig. 6B) and muscle strength loss (inhibition of 76  $\pm$  9% and 57  $\pm$  9% at 1 h after treatments, respectively) (Fig. 6C) in mice treated with anastrozole. Moreover, the inhibition of PKC $\epsilon$  ( $\epsilon$ V1-2, 10 nmol/paw, i.pl.) attenuated the Bk-induced responses on the mechanical allodynia and muscle strength loss (inhibition of 21  $\pm$  12% and 40  $\pm$  6% at 1 h after treatments, respectively) (Fig. 6B and C) in anastrozole-treated mice.

After, we assess the contribution of signalling pathways downstream from kinin B<sub>1</sub>R. The responses induced by DABk on mechanical allodynia (Fig. 6D) and muscle strength loss (Fig. 6E) were reduced by the inhibitors of PLC (U73122, inhibition of 38  $\pm$  8% and 87  $\pm$  8% at 1 h after treatment, respectively) or PKC (GF109203X, 26  $\pm$  6% and 58  $\pm$  8% at 1 h after treatment, respectively) in anastrozole-treated mice. In addition, the inhibitor of PKC $\epsilon$  ( $\epsilon$ V1-2) reduced DABk-induced responses on mechanical allodynia and muscle strength loss (Fig. 6D and E) (inhibition of 24  $\pm$  4% and 45  $\pm$  5% at 1 h after treatment, respectively) in anastrozole-treated mice.

After that, we evaluated whether signalling pathways downstream from kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation could contribute to TRPV4 activation in an anastrozole-induced pain model. The local treatment with PLC (U73122) and PKC (GF109203X) inhibitors reduced TRPV4 agonists (4 $\alpha$ -PDD and hypotonic solution)-induced responses on mechanical allodynia (inhibition of 26  $\pm$  4% and 31  $\pm$  5%, respectively and 44  $\pm$  8% and 50  $\pm$  10% at 1 h after treatments, respectively) (Fig. 7B and D) and muscle strength loss (inhibition



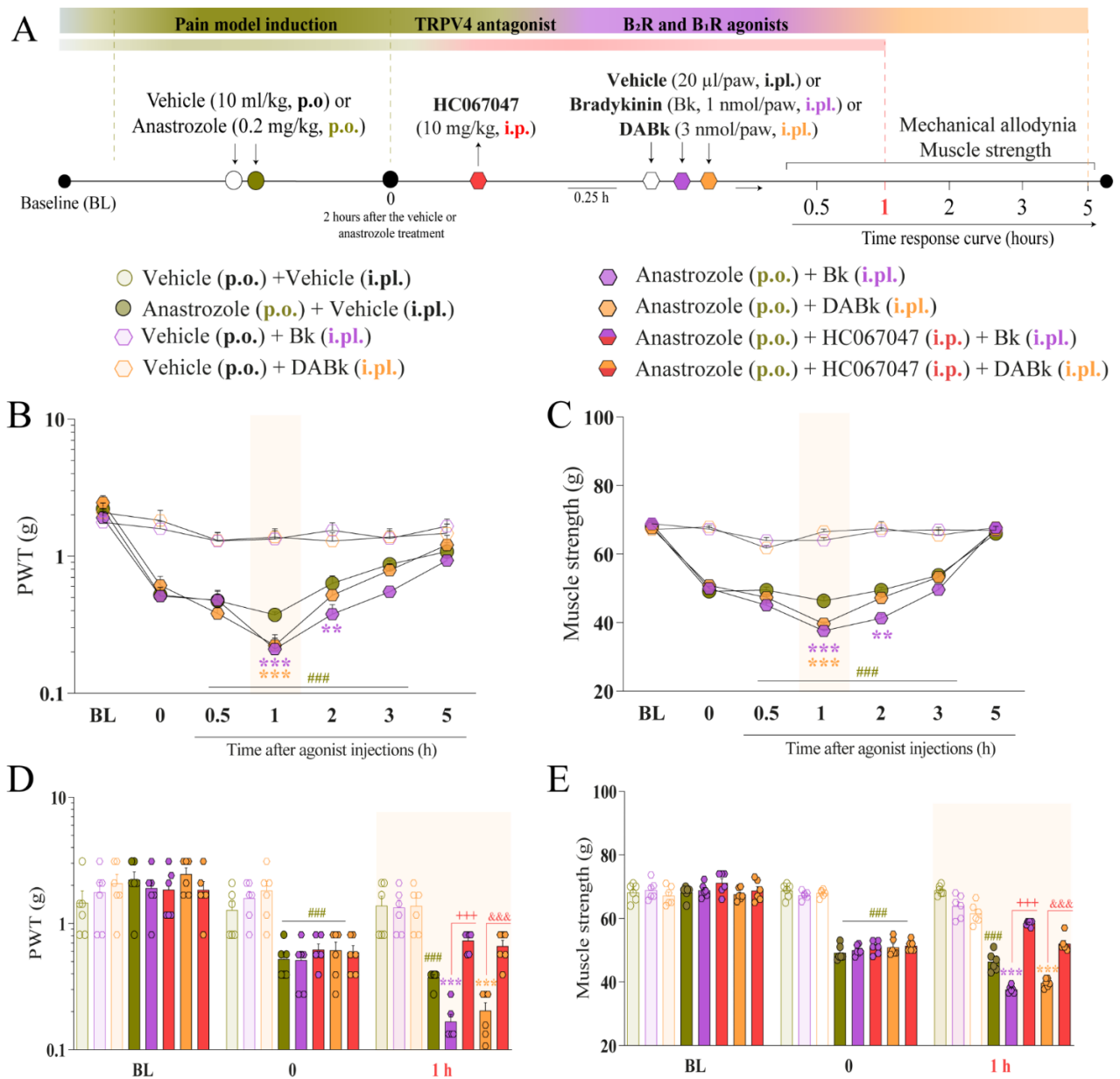
**Fig. 3** TRPV4 agonist, hypotonic solution, enhanced the anastrozole-induced painful behaviours. Male C57BL/6 mice were treated oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviours. At 2 h after anastrozole administration (Time 0), the isotonic solution (vehicle, 20  $\mu$ l/paw, intraplantar, i.pl.) or the hypotonic solution (deionized water, 20  $\mu$ l/paw, i.pl., TRPV4 agonist) were injected by intraplantar route. The mechanical PWT (**B**) and muscle strength (**C**) were assessed from 0.5 h up to 5 h after the agonist injection. In another set of experiments, the anastrozole-treated mice received a single treatment of vehicle (10 ml/kg, intraperitoneal, i.p.) or HC067047 (10 mg/kg, i.p.). After 0.25 h of HC067047 treatment,

the isotonic or hypotonic (TRPV4 agonist) solution was injected by the intraplantar route. The mechanical PWT (**D**) and muscle strength (**E**) were assessed 1 h after agonist injection. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ### $p < 0.001$  vs. Vehicle plus Vehicle group. \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Vehicle group. +++ $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Hypo group. Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /group; two independent experiments with  $n = 3$  mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold. Hypo: hypotonic solution

of  $66 \pm 2\%$  and  $51 \pm 5\%$ , respectively and  $57 \pm 4\%$  and  $44 \pm 6\%$  at 1 h after treatments, respectively) (Fig. 7C and E) in previously anastrozole-treated mice. Furthermore, the inhibition of PKC $\epsilon$  by  $\epsilon$ V1-2 attenuated the TRPV4 agonists-induced responses on mechanical allodynia and muscle strength loss (Fig. 7), with inhibition of  $22 \pm 4\%$  and

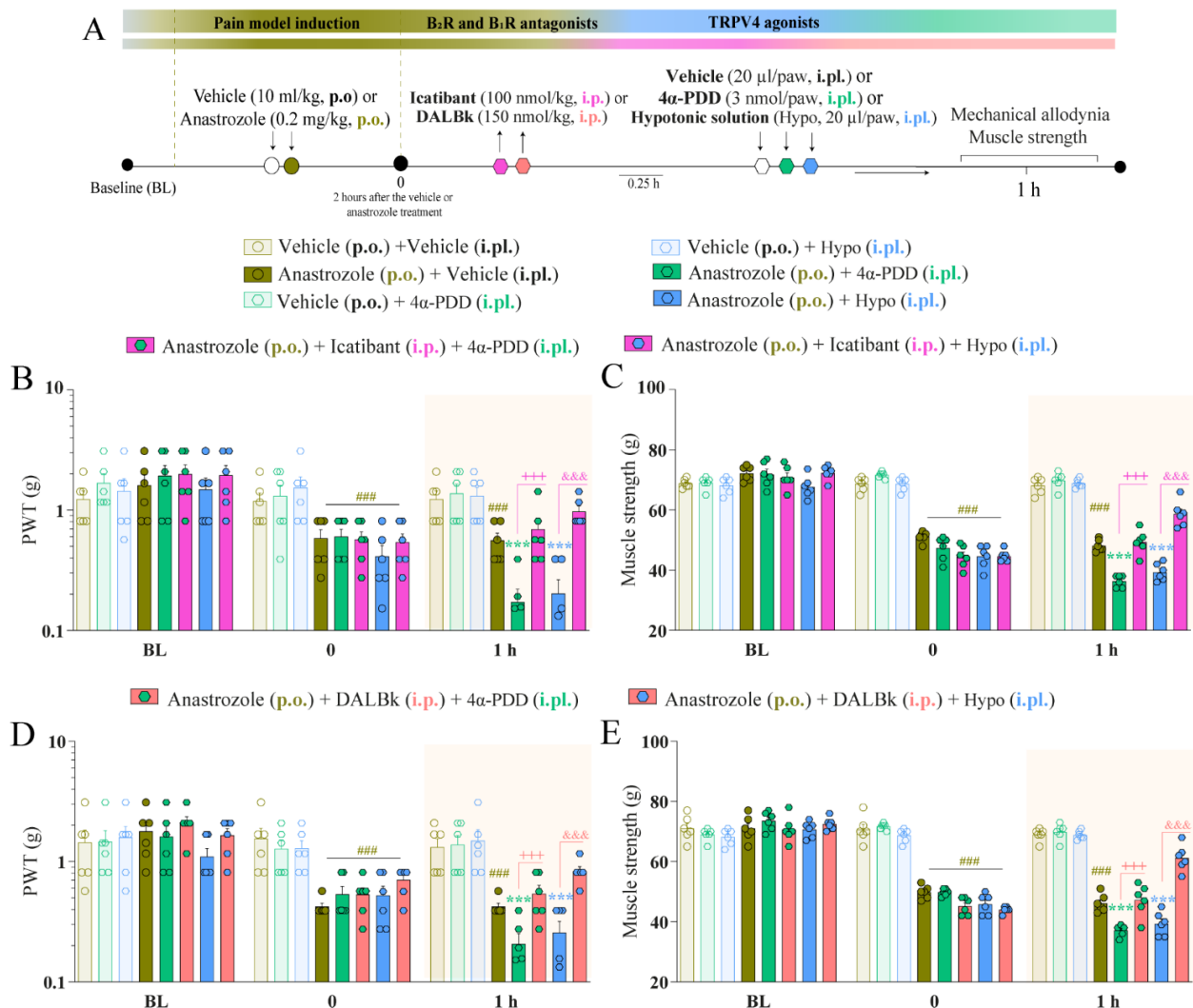
$49 \pm 10\%$  to 4 $\alpha$ -PDD and  $25 \pm 8\%$  and  $31 \pm 9\%$  to hypotonic solution at 1 h after treatments, respectively.





**Fig. 4** Kinin receptors activation sensitizes TRPV4 in the anastrozole-induced pain model in mice. **(A)** Male C57BL/6 mice were treated by oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviours. At 2 h after anastrozole administration (Time 0), the vehicle (20  $\mu$ l/paw, intraplantar, i.pl.) or sub-nociceptive doses of kinin agonists, Bk (1 nmol/paw, i.pl., B<sub>2</sub>R agonist) or DABk (3 nmol/paw, i.pl., B<sub>1</sub>R agonist) were injected by intraplantar route. The mechanical PWT **(B)** and muscle strength **(C)** were assessed from 0.5 h up to 5 h after agonist' sub-nociceptive doses. In another set of experiments, the anastrozole-treated mice received a single treatment of vehicle (10 ml/kg, intraperitoneal, i.p.) or HC067047 (10 mg/kg, i.p.). After 0.25 h of the vehicle or HC067047 treatment, the sub-noci-

ceptive doses of kinin agonists, Bk or DABk, were injected by intraplantar route. The mechanical PWT **(D)** and muscle strength **(E)** were assessed 1 h after agonist injections. Baseline (BL) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ### $p < 0.001$  vs. Vehicle plus Vehicle group. \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Vehicle group. +++ $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Bk group. &&& $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus DABk group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group; two independent experiments with  $n = 3$  mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold. Bk: Bradykinin



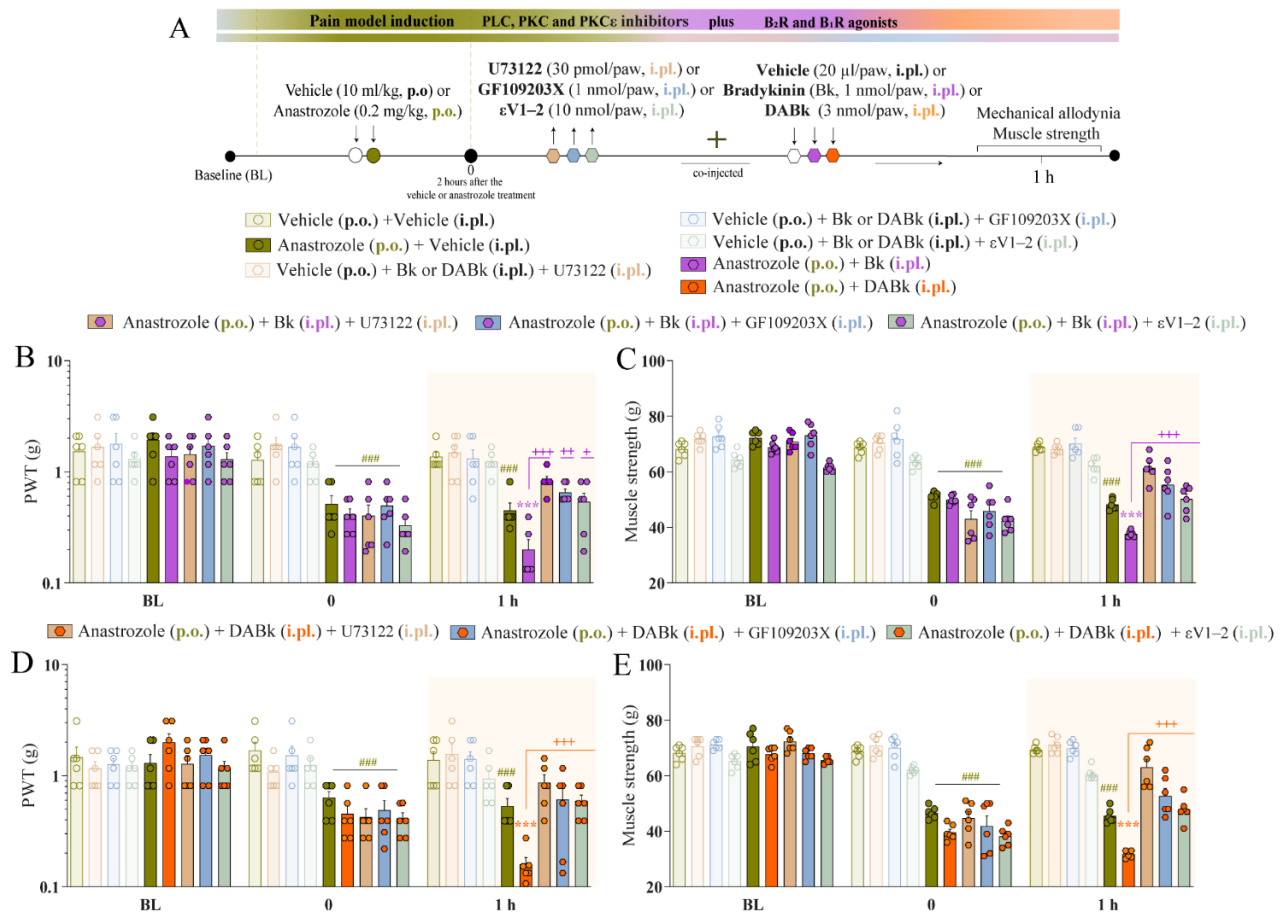
**Fig. 5** Kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R contribute to the nociceptive behaviours induced by the TRPV4 agonists in anastrozole-treated mice. (A) Male C57BL/6 mice were treated by oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviours. At 2 h after anastrozole administration (Time 0), the mice received a single treatment of vehicle (10 ml/kg, intraperitoneal, i.p.), Icatibant (100 nmol/kg, i.p., B<sub>2</sub>R antagonist) or DALBk (150 nmol/kg, i.p., B<sub>1</sub>R antagonist). After 0.25 h of the antagonists' treatment, vehicle (20 μl/paw, intraplantar, i.pl.) or a sub-nociceptive dose of TRPV4 channel agonists, 4α-PDD (3 nmol/paw, i.pl.) or hypotonic solution (deionized water, 20 μl/paw, i.pl.) were injected by intraplantar route.

The mechanical PWT (**B** and **D**) and muscle strength (**C** and **E**) were assessed 1 h after agonist injections. Baseline (**BL**) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. ###*p* < 0.001 vs. Vehicle plus Vehicle group. \*\*\**p* < 0.001 vs. Anastrozole plus Vehicle group. +++*p* < 0.001 vs. Anastrozole plus 4α-PDD. &&&*p* < 0.001 vs. Anastrozole plus Hypo solution group. Data were expressed as the mean ± SEM (n = 6/group; two independent experiments with n = 3 mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold. Hypo: hypotonic solution

## Discussion

The use of AI is associated with severe pain symptoms, mainly musculoskeletal, which limit patients' adherence to therapy. Although some mechanisms have been proposed to explain AI-related pain symptoms, the mechanisms and pathways behind pain remain poorly understood, making them difficult to predict and treat. In this study, using

TRPV4 antagonist and agonists, we demonstrated that the painful symptoms induced by anastrozole, an AI, are TRPV4 channel-dependent in mice. The local administration of kinin B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, or TRPV4 agonists enhanced the pain parameters in anastrozole-treated mice, which were prevented by the B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, or TRPV4 antagonists. Furthermore, we showed that signalling pathways downstream from B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation, PLC, PKC and PKCε, are



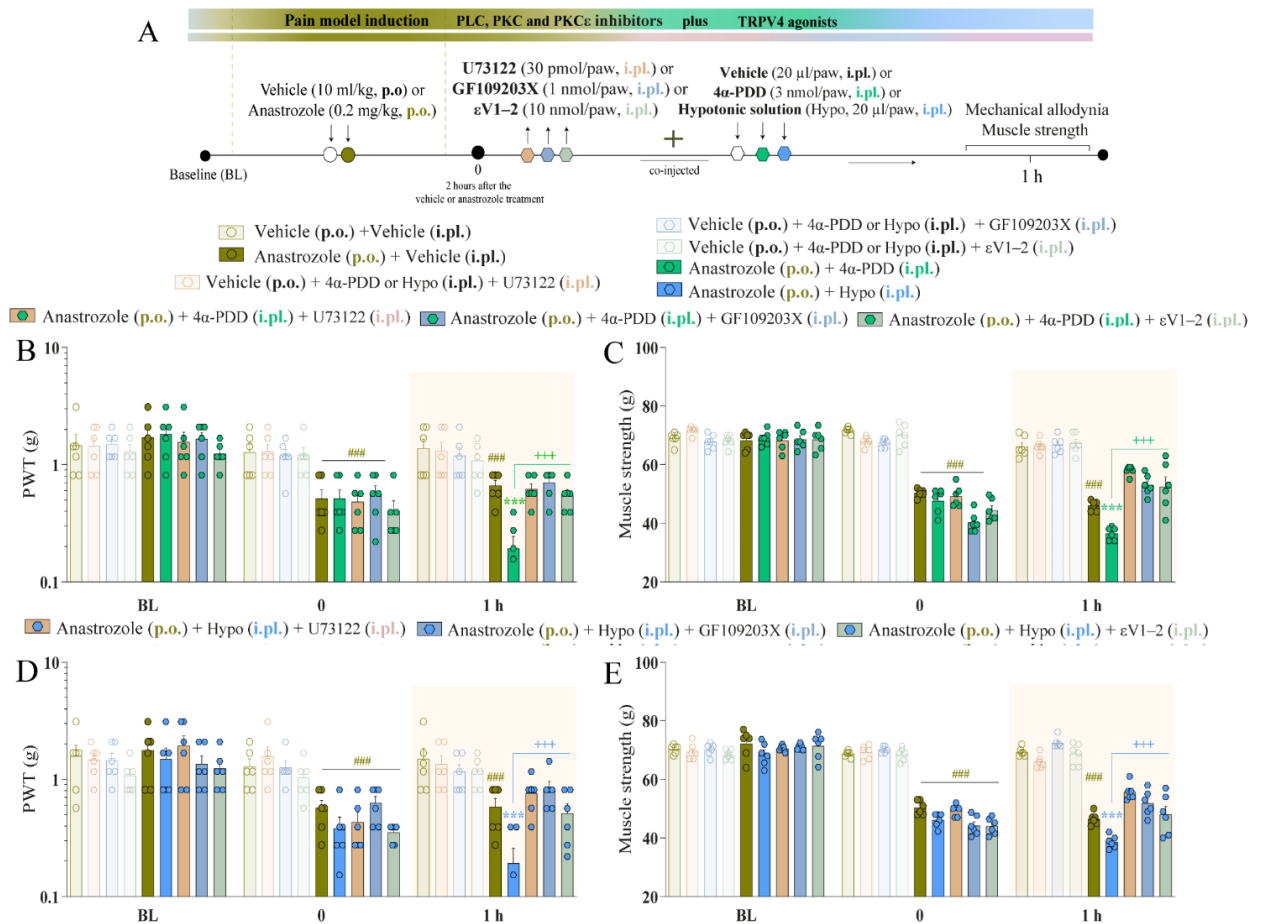
**Fig. 6** The signalling pathways downstream from the kinin  $B_2R$  and  $B_1R$ , PLC, PKC and PKC $\epsilon$  are activated and contribute to the nociceptive behaviours induced by kinin agonists in anastrozole-treated mice. **(A)** Male C57BL/6 mice were treated by oral route (p.o.) with anastrozole (0.2 mg/kg) or its vehicle (0.5% CMC) to induce painful behaviours. At 2 h after anastrozole administration (Time 0), the mice received the intraplantar (i.pl.) co-injection of U73122 (30 pmol/paw, i.pl., PLC inhibitor), GF109203X (1 nmol/paw, i.pl., PKC inhibitor) or  $\epsilon$ V1-2 (10 nmol/paw, i.pl., PKC $\epsilon$  inhibitor), plus sub-nociceptive doses of Bk (1 nmol/paw, i.pl.) or DABk (3 nmol/paw, i.pl.). After

1 h of the co-injections (inhibitors plus Bk- and DABk-agonists), the mechanical PWT (**B** and **D**) and muscle strength (**C** and **E**) were assessed. Baseline (**BL**) values were measured before the anastrozole or vehicle administration.  $###p < 0.001$  vs. Vehicle plus Vehicle group.  $***p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Vehicle group.  $^+p < 0.05$ ,  $^{++}p < 0.01$  and  $^{+++}p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Bk or DABk group. Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /group); two independent experiments with  $n = 3$  mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold. Bk: bradykinin

crucial to sensitizing the TRPV4 channel since the block of these signalling pathways attenuated the enhancement of  $B_2R$ ,  $B_1R$ , or TRPV4 agonists-induced pain symptoms in anastrozole-treated mice. Thus, direct TRPV4 activation or indirect, e.g., dependent on  $B_2R$  and  $B_1R$  activation, appear to converge in a similar nociceptive pathway and sustain the pain related to anastrozole use.

Among the potential targets capable of detecting and transducing painful stimuli from the periphery to centre structures is the TRPV4 channel, an osmotic, mechanical and warm (27–35 °C) stimuli sensor [19–21] involved in the development and maintenance of painful symptoms [18] in different pain models, such as musculoskeletal and neuropathic pain [16, 22–26]. Studies have suggested that

increased oxidative stress (e.g.,  $H_2O_2$  levels) might facilitate the development of AI-induced pain symptoms [11, 14]. The TRPV4 channel is considered one sensor for several reactive endogenous substances, as it carries cysteine residues corresponding to those found in other redox-sensitive TRP channels [48–50]. In this way, the TRPV4 channel might be the target of  $H_2O_2$  produced by AI use, contributing to painful symptoms. In our study, the TRPV4 antagonism reduced mice's anastrozole-induced mechanical allodynia and muscle strength loss. Our results agree with previous studies that demonstrated the involvement of the TRPV4 channel in mechanical hypersensitivity and reduction of muscle strength, including in painful conditions caused by chemotherapeutic drugs and joint disorders [22, 23, 26, 51–53].



the co-injections (inhibitors plus 4 $\alpha$ -PDD- or hypotonic solution-agonists), the mechanical PWT (**B** and **D**) and muscle strength (**C** and **E**) were assessed. Baseline (**BL**) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. #### $p < 0.001$  vs. Vehicle plus Vehicle group. \*\*\* $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Vehicle group. +++ $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus 4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group; two independent experiments with  $n = 3$  mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold.

the co-injections (inhibitors plus 4 $\alpha$ -PDD- or hypotonic solution-agonists), the mechanical PWT (**B** and **D**) and muscle strength (**C** and **E**) were assessed. Baseline (**BL**) values were measured before the anastrozole or vehicle administration. #### $p < 0.001$  vs. Vehicle plus Vehicle group. \*\*\* $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus Vehicle group. +++ $p < 0.001$  vs. Anastrozole plus 4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution group. Data were expressed as the mean + SEM ( $n = 6$ /group; two independent experiments with  $n = 3$  mice/each experiment) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. PWT: paw withdrawal threshold.

Thus, our findings indicate that anastrozole systemic treatment promotes painful symptoms in mice similar to those reported by AI users in a TRPV4-dependent manner.

Corroborating the above data, the intraplantar injection of TRPV4 agonists, 4 $\alpha$ -PDD or hypotonic solution, enhanced the mechanical allodynia and loss of muscle strength of anastrozole- but not vehicle-treated mice. The pre-treatment with TRPV4 antagonist, HC067047, attenuated the mechanical allodynia and muscle strength loss induced by TRPV4 agonists in previously anastrozole-treated mice. Similar to our results, hypersensitivity to sub-nociceptive doses of TRPs agonists has been observed in studies of pain [11, 14, 54, 55], including in the AI-induced pain model [11, 12, 14].

Indeed, the local administration of pro-algesic substances in sub-nociceptive doses in previously sensitized animals has been widely utilized to provide additional mechanistic insights [11, 12, 14, 36, 56]. Thus, we supply further evidence of the involvement of TRPV4 in the anastrozole-caused musculoskeletal pain model.

Due to the electrophilic and reactive properties of the AI, they directly stimulate TRPA1, which is co-localized with the TRPV4 channel in sensory neurons, where it is abundantly expressed [15, 16, 57] causing neurogenic inflammation and painful behaviours in mice [11]. Although this mechanism is essential to initiate painful stimuli dependent on AI, other underlying mechanisms contribute to triggering



such pain symptoms [11–14]. Indeed, our previous results demonstrated that intraplantar administration of kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists enhanced painful symptoms induced by anastrozole, which were prevented by their respective antagonists [12]. Thus, recent evidence has suggested that kinins and their B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> receptors play a critical role in AI-induced pain in mice, including anastrozole [12, 13]. Furthermore, we recently observed that the B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R-dependent intracellular signalling pathways PLC, PKC and PKA sensitize TRPA1 causing painful symptoms in previously anastrozole-treated mice [12]. Although current studies suggest some mechanisms and pathways involved in AI-induced pain [11, 13, 58], they do not rule out that additional factors may operate independently or together to contribute to AI-induced pain symptoms.

Notably, the pro-algesic effects of kinins and their receptors, B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R, may be mediated, at least in part, by the sensitisation of TRPs channels, such as TRPV4, which contribute to the transmission and maintenance of several painful conditions [23, 34, 35, 59]. Once we first observed the contribution of TRPV4 in the pain symptoms induced by anastrozole, we wondered if B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation contributes to indirect TRPV4 activation and enhance anastrozole-induced pain. In this sense, we showed that the TRPV4 antagonist HC-067047 prevented the enhancement of pain symptoms caused by B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists in anastrozole-treated mice. Our results agree with previous studies demonstrating that the indirect TRPV4 activation depends on kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation in an antineoplastic-induced also alleviated the enhanced pain behaviours induced by TRPV4 agonists in mice previously treated with anastrozole. These results suggest that TRPV4 modulation may also occur downstream to B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation contributing to anastrozole-induced pain behaviours. Our results are consistent with previous studies showing the TRPV4 intracellular modulation dependent on G protein-coupled receptors (GPCRs) activation and its contribution to sustaining different preclinical pain models [23, 53, 60, 61]. Therefore, it is plausible to suggest crosstalk between kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R and TRPV4 channels and their contribution to anastrozole-induced pain symptoms.

Kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R are expressed in important structures for pain modulation [62], and their stimulation activates PLC, which, in turn, breaks down membrane phospholipids into diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate. Inositol triphosphate increases cytosolic calcium (Ca<sup>2+</sup>) levels, which, together with DAG, activate protein kinases, such as PKC [62]. PKC modulate target proteins, such as TRPs, by phosphorylation, playing an essential role in painful processes [63]. Once PLC and PKC pathways have vital roles to play in painful behaviours [23, 31, 64, 65], we studied the

contribution of these signalling pathways downstream of the kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation in the anastrozole-induced pain model. Our findings confirm that PLC and PKC signalling pathways mediate the nociceptive effects of B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists in anastrozole-treated mice once its inhibition reduced pain behaviours. These results corroborate with previous data, demonstrating the substantial participation of PLC and PKC signalling mediated by kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R stimulation in sustaining different pain conditions in rodents, including caused by anastrozole [12, 23, 33, 35, 66, 67].

The PKCs represent a family of serine/threonine kinases implicated in various pathophysiological functions, and their isoforms are under investigation as potential therapeutics for treating acute and chronic pain conditions [31, 63]. The PKC $\epsilon$ , an isoform dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> and DAG, is highly expressed in sensory neurons, and when activated, it has a critical role in mediating the nociception [31, 68, 69]. Thus, we investigated whether PKC $\epsilon$  activation acts downstream to the kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R stimulation to contribute to anastrozole-induced pain behaviours. PKC $\epsilon$  activation seems critical in mediating the anastrozole-induced pain because its blockade reversed kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonist-induced nociceptive effects in anastrozole-treated mice. Consistent with these findings, it was shown that PKC $\epsilon$  mediates the pro-algesic response from kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation in other pain models [23, 33].

Since signalling pathways downstream of the kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation contribute to the anastrozole-induced could also sensitise the TRPV4 channel to sustain the nociceptive processes [23, 32, 53, 70]. Indeed, studies have demonstrated once the PLC and PKC pathways are triggered, they modulate the TRPV4 channel by phosphorylation in the residues of Ser<sup>162</sup>, Thr<sup>175</sup>, and Ser<sup>189</sup>, located in the C-terminal domain, enhancing the function of this channel [32]. Furthermore, studies also prove that TRPV4 activity is enhanced by intracellular phosphorylation of the PKC $\epsilon$  isoform [23, 71, 72]. In this way, we wonder if PLC, PKC, and PKC $\epsilon$  pathways could mediate TRPV4 sensitization in the anastrozole-induced pain model. In this sense, inhibition of the PLC, PKC and PKC $\epsilon$  pathways reduced the pain symptoms induced by TRPV4 agonists in anastrozole-treated mice. Indeed, one of the most studied pathways by which TRPV4 sustain nociceptive processes is its intracellular modulation dependent on GPCRs activation, such as kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R [23, 32, 53, 70]. Thus, our results suggest that kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R activation can lead the TRPV4 sensitization through PLC, PKC and PKC $\epsilon$  signalling pathways, and these findings support signalling pathways dependent on kinin receptors as an essential regulator of TRPV4 activity in the anastrozole-induced pain model.

Our study shows some limitations, as are not use other pharmacological (other TRPV4 channel antagonists) or genetic (TRPV4 gene silencing by siRNA treatment or TRPV4 knockout mice) tools to confirm the TRPV4 involvement in this pain model besides agonists and one selective antagonist TRPV4 channel. However, unprecedentedly, we demonstrate that the TRPV4 activation considerably contributes to painful symptoms related to anastrozole use, underscoring the paramount role of signalling pathways downstream of kinin B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R in developing the pain symptoms induced by the anastrozole. It is worth mentioning that the kinin B<sub>2</sub>R antagonist, Icatibant (Firazyr®), has been clinically available for treating hereditary angioedema since 2010, with good patient tolerability [73, 74]. However, clinical trials of the TRPV4 target are incomplete or not updated (NCT04292912; NCT02497937 and NCT03372603). Additionally, the role of TRPV4 in humans and its suitability as a therapeutic target is being tested in clinical studies of Phase II, being well-tolerated by patients without causing severe adverse effects (GSK2798745; clinicaltrials.gov NCT02119260) [75, 76]. Thus, regulating kinin receptors or the TRPV4 channel encourages targeted treatment to mitigate the potential impact of painful symptoms reported by AI users, such as anastrozole.

**Acknowledgements** We thank the Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry of the Federal University of Santa Maria, and we thank the Federal University of Santa Maria. We thank you for the financial support given by FAPERGS, CAPES/PROEX, and CNPq. We thank CNPq and CAPES for their fellowship support.

**Authors' Contributions** Study concept and design: M.F.P.F. and S.M.O. Acquisition of data: M.F.P.F., E.S.B., and G.B. Analysis and interpretation of data: M.F.P.F. and S.M.O. Drafting and revising the content of the manuscript: M.F.P.F., E.S.B., G.B., and S.M.O. Study supervision: S.M.O.

**Funding** This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001; by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS (Grant #21/2551-0001966-2) (Brazil); and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Brazil). CAPES/Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) (process #23038.002125/2021-85; Grant #0036/2021). S.M.O. and E.S.B. are recipients of fellowship from CNPq (Grants #304985/2020-1 and #150611/2022-6, respectively). M.F.P.F. and G.B. are recipient of fellowship from CAPES/PROEX (process number #88882.182170/2018-01 and #88887.568915/2020-00, respectively).

**Data Availability** All data generated in this study are included in this manuscript.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Ethics Approval** Not applicable.

**Consent to Participate** Not applicable.

**Consent for publication** Not applicable.

## References

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and Mortality Worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Waks AG, Winer EP (2019) Breast Cancer Treatment. *JAMA* 321:288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Bennett MI, Kaasa S, Barke A et al (2019) The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic cancer-related pain. *Pain* 160:38–44. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001363>
- Tenti S, Correale P, Cheleschi S et al (2020) Aromatase Inhibitors—Induced Musculoskeletal Disorders: current knowledge on clinical and molecular aspects. *Int J Mol Sci* 21:5625. <https://doi.org/10.3390/ijms21165625>
- Gibson L, Lawrence D, Dawson C, Bliss J (2009) Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003370.pub3>
- Nyrop KA, Callahan LF, Rini C et al (2016) Aromatase inhibitor associated arthralgia: the importance of oncology provider-patient communication about side effects and potential management through physical activity. *Support Care Cancer* 24:2643–2650. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-3065-2>
- Laroche F, Coste J, Medkour T et al (2014) Classification of and risk factors for Estrogen Deprivation Pain Syndromes related to aromatase inhibitor treatments in women with breast Cancer: a prospective Multicenter Cohort Study. *J Pain* 15:293–303. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.11.004>
- Henry NL, Giles JT, Ang D et al (2008) Prospective characterization of musculoskeletal symptoms in early stage breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 111:365–372. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9774-6>
- Crew KD, Greenlee H, Capodice J et al (2007) Prevalence of joint symptoms in Postmenopausal Women taking aromatase inhibitors for early-stage breast Cancer. *J Clin Oncol* 25:3877–3883. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.10.7573>
- Gupta A, Henry NL, Loprinzi CL (2020) Management of aromatase Inhibitor—Induced Musculoskeletal symptoms. *JCO Oncol Pract* 16:733–739. <https://doi.org/10.1200/OP.20.00113>
- Fusi C, Materazzi S, Benemei S et al (2014) Steroidal and non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1. *Nat Commun* 5:5736. <https://doi.org/10.1038/ncomms6736>
- Fialho MFP, Brum ES, Becker G et al (2023) Kinin B2 and B1 receptors activation sensitize the TRPA1 Channel contributing to Anastrozole-Induced Pain symptoms. *Pharmaceutics* 15:1136. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041136>
- Brusco I, Becker G, Palma TV et al (2023) Kinin B1 and B2 receptors mediate cancer pain associated with both the tumor and oncology therapy using aromatase inhibitors. *Sci Rep* 13:4418. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31535-6>
- De Logu F, Tonello R, Materazzi S et al (2016) TRPA1 mediates aromatase Inhibitor—Evoked Pain by the aromatase substrate androstenedione. *Cancer Res* 76:7024–7035. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1492>
- Vay L, Gu C, McNaughton PA (2012) The thermo-TRP ion channel family : properties and therapeutic implications. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>



16. Rodrigues P, Ruviaro NA, Trevisan G (2022) TRPV4 role in Neuropathic Pain Mechanisms in rodents. *Antioxid (Basel Switzerland)* 12:24. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12010024>
17. Kumar H, Lee SH, Kim KT et al (2018) TRPV4: a Sensor for Homeostasis and pathological events in the CNS. *Mol Neurobiol* 55:8695–8708. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0998-8>
18. Grace MS, Bonvini SJ, Belvisi MG, McIntyre P (2017) Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease. *Pharmacol Ther* 177:9–22. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.019>
19. Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA et al (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103:525–535. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00143-4)
20. Alessandri-Haber N, Joseph E, Dina OA et al (2005) TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* 118:70–79. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2005.07.016>
21. Watanabe H, Vriens J, Suh SH et al (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277:47044–47051. <https://doi.org/10.1074/JBC.M208277200>
22. Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ et al (2004) Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain in the rat. *J Neurosci* 24:4444–4452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0242-04.2004>
23. Costa R, Bicca MA, Manjavachi MN et al (2018) Kinin receptors sensitize TRPV4 Channel and induce mechanical hyperalgesia: relevance to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in mice. *Mol Neurobiol* 55:2150–2161. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0475-9>
24. McNulty AL, Leddy HA, Liedtke W, Guilak F (2015) TRPV4 as a therapeutic target for joint diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 388:437–450. <https://doi.org/10.1007/S00210-014-1078-X>
25. Guilak F, Leddy HA, Liedtke W (2010) Transient receptor potential vanilloid 4: the sixth sense of the musculoskeletal system? *Ann N Y Acad Sci* 1192:404–409. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05389.x>
26. Materazzi S, Fusi C, Benemei S et al (2012) TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 463:561–569. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1071-x>
27. Dias FC, Alves VS, Matias DO et al (2019) The selective TRPV4 channel antagonist HC-067047 attenuates mechanical allodynia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 856:172408. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172408>
28. Hu X, Du L, Liu S et al (2023) A TRPV4-dependent neuroimmune axis in the spinal cord promotes neuropathic pain. *J Clin Invest* 133. <https://doi.org/10.1172/JCI1161507>
29. Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK et al (2008) Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and src tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci* 28:1046–1057. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4497-07.2008>
30. Peng H, Lewandrowski U, Müller B et al (2010) Identification of a protein kinase C-dependent phosphorylation site involved in sensitization of TRPV4 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1721–1725. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.140>
31. Velázquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM (2007) Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res* 55:578. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2007.04.006>
32. Fan H-C, Zhang X, McNaughton PA (2009) Activation of the TRPV4 Ion Channel is enhanced by phosphorylation. *J Biol Chem* 284:27884–27891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.028803>
33. Meotti FC, Campos R, Da Silva KABS et al (2012) Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B 1 and B 2 receptors and intracellular kinase pathways. *Br J Pharmacol* 166:1127–1139. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01830.x>
34. Ferreira J, Da Silva GL, Calixto JB (2004) Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B 2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 141:787–794. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705546>
35. Meotti FC, Figueiredo CP, Manjavachi M, Calixto JB (2017) The transient receptor potential ankyrin-1 mediates mechanical hyperalgesia induced by the activation of B1 receptor in mice. *Biochem Pharmacol* 125:75–83. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.003>
36. Brusco I, Justino AB, Silva CR et al (2019) Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. *Biochem Pharmacol* 168:119–132. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.023>
37. Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)
38. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-95741sf>
39. Zameer S, Vohora D (2017) Effect of aromatase inhibitors on learning and memory and modulation of hippocampal dickkopf-1 and sclerostin in female mice. *Pharmacol Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.06.002>
40. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW et al (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)
41. Oliveira SM, Silva CR, Ferreira J (2013) Critical role of protease-activated receptor 2 activation by mast cell tryptase in the development of postoperative pain. *Anesthesiology* 118:679–690. <https://doi.org/10.1097/ALN.0B013E31827D415F>
42. Kostek M, Polaski A, Kolber B et al (2016) A protocol of Manual tests to measure Sensation and Pain in humans. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/54130>
43. Oliveira SM, Silva CR, Wentz AP et al (2014) Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1- tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol Biochem Behav* 124:396–404. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.07.005>
44. Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441–462
45. Brum EdaS, Fialho MFP, Fischer SPM et al (2020) Relevance of mitochondrial dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. *Mol Neurobiol* 57:4202–4217. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01996-1>
46. Lintermans A, van Calster B, van Hoydonck M et al (2011) Aromatase inhibitor-induced loss of grip strength is body mass index dependent: hypothesis-generating findings for its pathogenesis. *Ann Oncol* 22:1763–1769. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq699>
47. Montilla-García Á, Tejada MÁ, Perazzoli G et al (2017) Grip strength in mice with joint inflammation: a rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. *Neuropharmacology* 125:231–242. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.029>
48. Mori Y, Takahashi N, Polat OK et al (2016) Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. *Pflugers Arch* 468:85–97. <https://doi.org/10.1007/S00424-015-1716-2>
49. Suresh K, Servinsky L, Reyes J et al (2015) Hydrogen peroxide-induced calcium influx in lung microvascular endothelial cells involves TRPV4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309:L1467–L1477. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00275.2015>
50. De Logu F, Trevisan G, Marone IM et al (2020) Oxidative stress mediates thalidomide-induced pain by targeting peripheral TRPA1

- and central TRPV4. *BMC Biol* 18:197. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00935-9>
51. Hinata M, Imai S, Sanaki T et al (2018) Sensitization of transient receptor potential vanilloid 4 and increasing its endogenous ligand 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *Pain* 159:939–947. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001169>
  52. Richter F, von Segond G, Schaible HG (2019) Transient receptor potential vanilloid 4 ion channel in C-fibres is involved in mechanonociception of the normal and inflamed joint. *Sci Rep* 9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47342-x>
  53. Chen Y, Yang C, Wang ZJ (2011) Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience* 193:440–451. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.085>
  54. Rossato MF, Rigo FK, Oliveira SM et al (2018) Participation of transient receptor potential vanilloid 1 in paclitaxel-induced acute visceral and peripheral nociception in rodents. *Eur J Pharmacol* 828:42–51. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.03.033>
  55. Fischer SPM, Brusco I, Brum ES et al (2020) Involvement of TRPV1 and the efficacy of  $\alpha$ -spinasterol on experimental fibromyalgia symptoms in mice. *Neurochem Int* 134. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2020.104673>
  56. Brusco I, Justino AB, Silva CR et al (2021) Inhibitors of angiotensin I converting enzyme potentiate fibromyalgia-like pain symptoms via kinin receptors in mice. *Eur J Pharmacol* 895:173870. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173870>
  57. Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB (2012) TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther* 133:189–204. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.10.008>
  58. Trevisan G, Benemei S, Materazzi S et al (2016) TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 139:1–17. <https://doi.org/10.1093/brain/aww038>
  59. Talbot S, Dias JP, Lahjouji K et al (2012) Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B1 receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation* 9:16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-16>
  60. Zhao P, Lieu T, Barlow N et al (2014) Cathepsin S causes inflammatory pain via biased agonism of PAR2 and TRPV4. *J Biol Chem* 289:27215–27234. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599712>
  61. Zaccor NW, Sumner CJ, Snyder SH (2020) The nonselective cation channel TRPV4 inhibits angiotensin II receptors. *J Biol Chem* 295:9986–9997. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014325>
  62. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W et al (2005) International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacol Rev* 57:27–77. <https://doi.org/10.1124/pr.57.1.2>
  63. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV (2012) Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11:937–957. <https://doi.org/10.1038/NRD3871>
  64. Li X, Yuan J, Yu X et al (2020) Effect of PKC/NF- $\kappa$ B on the regulation of P2X<sub>3</sub> receptor in dorsal Root Ganglion in rats with sciatic nerve injury. *Pain Res Manag* 2020:1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/7104392>
  65. Chen H, Lei J, He X et al (2008) Peripheral involvement of PKA and PKC in subcutaneous bee venom-induced persistent nociception, mechanical hyperalgesia, and inflammation in rats. *Pain* 135:31–36. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.04.040>
  66. Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R et al (2008) The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. *Neuropharmacology* 54:597–604. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.11.008>
  67. Cheng S, Chen C, Yang H et al (2011) Role of Extracellular Signal-Regulated kinase in synaptic transmission and plasticity of a nociceptive input on capsular central amygdaloid neurons in normal and Acid-Induced muscle Pain mice. *J Neurosci* 31:2258–2270. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5564-10.2011>
  68. Cesare P, Dekker LV, Sardini A et al (1999) Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23:617–624. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80813-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80813-2)
  69. Khasar SG, Lin YH, Martin A et al (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase c  $\epsilon$  mutant mice. *Neuron* 24:253–260. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80837-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80837-5)
  70. Zhao P, Lieu TM, Barlow N et al (2015) Neutrophil elastase activates protease-activated receptor-2 (PAR2) and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) to cause inflammation and pain. *J Biol Chem* 290:13875–13887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642736>
  71. Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK et al (2006) A transient receptor potential vanilloid 4-Dependent mechanism of Hyperalgesia is engaged by concerted action of Inflammatory Mediators. *J Neurosci* 26:3864–3874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5385-05.2006>
  72. Nakano R, Kitanaka T, Namba S et al (2018) Protein kinase C $\epsilon$  regulates nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase, which contributes to bradykinin-induced cyclooxygenase-2 expression. *Sci Rep* 2018 8:1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26473-7>
  73. Bas, M (2012) Clinical efficacy of icatibant in the treatment of acute hereditary angioedema during the FAST-3 trial. *Expert Rev Clin Immunol* 8:707–717. <https://doi.org/10.1586/eci.12.67>
  74. Lumry WR, Farkas H, Moldovan D et al (2015) Icatibant for multiple Hereditary Angioedema attacks across the controlled and open-label extension phases of FAST-3. *Int Arch Allergy Immunol* 168:44–55. <https://doi.org/10.1159/000441060>
  75. Goyal N, Skrdla P, Schroyer R et al (2019) Clinical pharmacokinetics, Safety, and tolerability of a Novel, First-in-class TRPV4 Ion Channel inhibitor, GSK2798745, in healthy and heart failure subjects. *Am J Cardiovasc Drugs* 19:335–342. <https://doi.org/10.1007/s40256-018-00320-6>
  76. Brooks CA, Barton LS, Behm DJ et al (2019) Discovery of GSK2798745: a clinical candidate for inhibition of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4). *ACS Med Chem Lett* 10:1228–1233. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00274>
- Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.
- Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



## 5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, fornecemos evidências da contribuição das vias de sinalização a jusante da ativação dos receptores de cininas ( $B_2R$  e  $B_1R$ ) no modelo de dor induzido por anastrozol, um IA. Além disso, nossos resultados demonstram o envolvimento do canal TRPV4 e que a ativação dos receptores de cininas levam à sensibilização intracelular dos canais TRPA1 e TRPV4, contribuindo para sustentar os parâmetros dolorosos (alodínia mecânica e perda de força muscular) associados ao uso dos IAs.

Uma vez que os usuários dos IAs devem fazer uso do medicamento todos os dias durante longos períodos (5-10 anos) (HENRY et al., 2008; TENTI et al., 2020), primeiramente avaliamos se o tratamento com o anastrozol mantinha a capacidade de induzir os parâmetros dolorosos em camundongos após um protocolo de tratamento prolongado. O tratamento sistêmico com anastrozol (uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos) causou alodínia mecânica e perda de força muscular nos dias 1, 3, 7, 10, 12 e 15 (de 1 h a 6 h após o tratamento). Além disso, o efeito nociceptivo máximo dos parâmetros dolorosos ocorreu 3 horas após o tratamento com anastrozol, consistente com o pico de concentração plasmática do anastrozol em humanos (2-4 horas após a administração) (YATES et al., 1996). Assim, o anastrozol induz parâmetros dolorosos por um longo período de tempo sem causar dessensibilização, de maneira semelhante a outros IA (exemestano e letrozol) (FUSI et al., 2014). Quando os parâmetros dolorosos induzidos por anastrozol atingiu seu efeito máximo (3 horas após o tratamento), o tratamento com os antagonistas dos  $B_2R$ ,  $B_1R$  ou do canal TRPA1 transitoriamente reverteram os parâmetros dolorosos avaliados. Além disso, o envolvimento dos receptores de cininas e do TRPA1 foram confirmados após o protocolo de administração intraplantar de seus respectivos agonistas em doses subnociceptivas. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstram o papel crucial dos receptores de cininas e do canal TRPA1 nos sintomas dolorosos de origem musculoesquelética ou neuropática, os quais são muitas vezes associados aos sintomas induzidos pelos IAs (BRUSCO et al., 2019; MEOTTI et al., 2012; SOUZA et al., 2020).

As evidências atuais não descartam que outras vias pró-algésicas operem sozinhas ou em conjunto para sensibilizar o TRPA1 e contribuir para o desenvolvimento e manutenção dos sintomas dolorosos associados ao uso dos IAs (BRUSCO et al., 2023; DE LOGU et al., 2016; FUSI et al., 2014). Ambos os receptores de cininas ( $B_2R$  e  $B_1R$ ) são co-expressos com o TRPA1 em neurônios sensoriais, cuja ativação deles modula a transmissão de estímulos dolorosos (JORDT et al., 2004; MA; HEAVENS, 2001; STORY et al., 2003; WOTHERSPOON; WINTER, 2000). De fato, estudos vêm demonstrando que os  $B_2R$  e  $B_1R$  interagem com canais

TRPs, incluindo TRPA1 (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; COSTA et al., 2018; FERREIRA; DA SILVA; CALIXTO, 2004; WANG et al., 2008a). Em nosso estudo, os antagonistas dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R preveniram o efeito sensibilizante do agonista TRPA1 sobre os parâmetros dolorosos em animais tratados com anastrozol, consistente com estudos anteriores que demonstram que a inibição farmacológica ou deleção genética do TRPA1 reduz as respostas de dor às injeções intraplantar de agonistas dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R (BAUTISTA et al., 2006; MEOTTI et al., 2017).

Além disso, utilizando um protocolo de dessensibilização *in vivo*, reforçamos a interação entre B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R e o TRPA1 nos sintomas de dor induzidos pelo anastrozol. Até o momento da execução do nosso estudo, não se tinha estudos realizando o protocolo de dessensibilização B<sub>1</sub>R. No entanto, um estudo de Ferreira e colaboradores (2004) realizou o protocolo de dessensibilização do B<sub>2</sub>R utilizando bradicinina, e dessa forma adaptamos o protocolo experimental para a dessensibilização do B<sub>1</sub>R utilizando DABk.

O TRPA1 pode ser sensibilizado por mecanismos intracelulares dependentes da ativação de B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R (BAUTISTA et al., 2006; CHOI; HWANG, 2018; MEOTTI et al., 2017; WANG et al., 2008a), por exemplo por meio de substâncias metabolizadas durante a hidrólise do AA, a liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular e por fosforilação dependente da PKC e PKA (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; BAUTISTA et al., 2006; SCHMIDT et al., 2009; WANG et al., 2008a). Descobrimos que a inibição das vias PLC/PKC atenuou o comportamento nociceptivo espontâneo e o efeito sensibilizante sobre os sintomas de dor induzidos por um agonista TRPA1 em animais tratados com anastrozol. Corroborando com nossos resultados, estudos evidenciaram que a ativação das vias de sinalização PLC/PKC dependentes de receptores de cininas é essencial para auxiliar a hipersensibilidade em diversas condições dolorosas em roedores (COSTA et al., 2018; FERREIRA; DA SILVA; CALIXTO, 2004; MEOTTI et al., 2012, 2017; WANG et al., 2008a)

Nossos resultados também demonstraram que a ativação da PKA apresenta um papel crítico no modelo de dor induzido por anastrozol. Após a ativação de receptores de cininas, o AA formado pela sinalização PLC/PKC, é rapidamente convertido pelas COX em prostaglandinas, incluindo a PGE<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> interage com seus receptores EP2 e EP4 (GPCRs subtipo Gs) estimulando a produção de AMPc pela adenilil ciclase. A PKA ativada pelo AMPc fosforila várias proteínas de sinalização, incluindo o canal TRPA1 (CHEN; YANG; WANG, 2011; MEENTS; FISCHER; MCNAUGHTON, 2017; WANG et al., 2008a). Dessa maneira, é plausível sugerirmos que a contribuição da PKA no modelo de dor induzido por anastrozol pode

ser por meio de um mecanismo indireto da ativação dos receptores de cininas, porém mais estudos são necessários para elucidar essa via.

Entre os alvos potenciais capazes de detectar e transduzir estímulos dolorosos da periferia para estruturas centrais está o TRPV4, o qual é co-localizado com o TRPA1 em neurônios sensoriais (RODRIGUES; RUVIARO; TREVISAN, 2022; VAY; GU; MCNAUGHTON, 2012). O TRPV4 pode ser ativado por estímulos osmóticos, mecânicos e temperaturas quentes não nocivas ( $\geq 24-27$  °C) (GÜLER et al., 2002; WATANABE et al., 2002b) (ALESSANDRI-HABER et al., 2005; LIEDTKE et al., 2000; WATANABE et al., 2002b). A ativação desse receptor em neurônios sensoriais desencadeia diversas respostas celulares capazes de contribuir para diferentes condições dolorosas, como dor musculoesquelética e neuropática, fazendo desse receptor um alvo importante para os sintomas dolorosos associados ao uso dos IAs (ALESSANDRI-HABER et al., 2004; COSTA et al., 2018; GUILAK; LEDDY; LIEDTKE, 2010; MATERAZZI et al., 2012; MCNULTY et al., 2015; RODRIGUES; RUVIARO; TREVISAN, 2022). O antagonismo do TRPV4 reduziu a alodínia mecânica e a perda de força muscular induzida pelo tratamento com anastrozol em camundongos, corroborando com outros estudos que demonstram a participação desse receptor na hipersensibilidade mecânica e perda de força muscular (ALESSANDRI-HABER et al., 2004; CHEN; YANG; WANG, 2011; COSTA et al., 2018; HINATA et al., 2018; RICHTER; SEGOND VON BANCHET; SCHAIBLE, 2019). Além disso, utilizando um protocolo de administração intraplantar com agonistas TRPV4 em doses subnociceptivas fornecemos evidências adicionais do envolvimento do TRPV4 no modelo de dor causada pelo anastrozol.

A ativação de ambos os receptores de cininas em neurônios sensoriais podem mediar a sensibilização intracelular do canal TRPA1, bem como do canal TRPV4, e contribuir para o desenvolvimento e manutenção de diferentes modelos de dor (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; COSTA et al., 2018; FERREIRA; DA SILVA; CALIXTO, 2004; MEOTTI et al., 2017; WANG et al., 2008b). Conseqüentemente, demonstramos o envolvimento do canal TRPV4 nos sintomas dolorosos induzidos por anastrozol, e que a ativação dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R para cininas contribuem para a ativação indireta do TRPV4, contribuindo para tais sintomas dolorosos. O antagonista do TRPV4, HC067047, preveniu o aumento dos sintomas dolorosos causados pelos agonistas dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R. Adicionalmente, os antagonistas dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R também aliviaram o aumento dos comportamentos de dor induzidos pelos agonistas do TRPV4 em camundongos tratados com anastrozol. Nossos resultados concordam com estudos anteriores que demonstram que a ativação indireta do canal TRPV4

pode ser dependente da ativação dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R em um modelo de dor induzida por antineoplásico (COSTA et al., 2018). Além disso, nossos resultados confirmam que as vias de sinalização PLC, PKC e PKC $\epsilon$  dependentes da ativação dos receptores de cininas medeiam os parâmetros dolorosos observados em camundongos tratados com anastrozol, uma vez que sua inibição reduz os comportamentos de dor.

As PKCs representam uma família de serina/treonina quinases implicadas em várias funções fisiopatológicas, sendo a isoforma da PKC $\epsilon$  amplamente expressa em neurônios sensoriais, de maneira a exercer um papel crítico em processos dolorosos (CESARE et al., 1999; KHASAR et al., 1999; VELÁZQUEZ; MOHAMMAD; SWEITZER, 2007) (MOCHLY-ROSEN; DAS; GRIMES, 2012; VELÁZQUEZ; MOHAMMAD; SWEITZER, 2007). De fato, estudos vêm demonstrando que, uma vez acionadas as vias de sinalização a jusante da ativação dos receptores de cininas, PLC, PKC e PKC $\epsilon$ , elas podem modular o TRPV4 por fosforilação em diferentes resíduos de aminoácidos, localizados na porção COOH-terminal, melhorando a função deste canal (FAN; ZHANG; MCNAUGHTON, 2009). Assim, nossos resultados sugerem que a ativação dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R pode levar à sensibilização do TRPV4 através das vias de sinalização PLC, PKC e PKC $\epsilon$ , e esses achados apoiam essas vias dependentes dos receptores de cininas como um importante regulador da atividade do TRPV4 no modelo de dor induzida anastrozol.

Ao todo, nossos resultados demonstram que as vias de sinalização intracelulares dependentes da ativação dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R parecem interagir para sensibilizar o canal TRPA1 na dor induzida por anastrozol. Assim, a ativação direta do canal TRPA1 pelo anastrozol e a estimulação indireta do TRPA1 pela ativação de B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R parecem convergir para uma via nociceptiva comum. Além disso, demonstramos que a ativação do TRPV4 contribui para os sintomas dolorosos relacionados ao uso do anastrozol, e ressaltamos o papel primordial das vias de sinalização a jusante dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R no desenvolvimento dos sintomas de dor induzidos pelo anastrozol. A interação entre os receptores de cininas e o TRPA1 e TRPV4 sugere um novo paradigma para explicar o desenvolvimento dos sintomas de dor induzidos pelo anastrozol.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram o envolvimento do TRPV4 e que a ativação dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> para cininas contribuem para a sensibilização dos canais TRPA1 e TRPV4 no modelo de dor induzido pelo anastrozol. Assim, a regulação dos receptores de cininas ou dos canais TRPA1 e TRPV4 incentivam o tratamento direcionado para mitigar o impacto potencial dos sintomas dolorosos associados ao uso dos IAs. Vale ressaltar que o antagonista do B<sub>2</sub>R, Icatibanto (Firazyr<sup>®</sup>) é clinicamente disponível para o tratamento de angioedema hereditário, apresentando boa tolerabilidade pelos pacientes (BAS, 2012; LUMRY et al., 2015). Além disso, o papel do TRPA1 e do TRPV4 em humanos e o seu possível direcionamento como alvo terapêutico está sendo testado em estudos de fase clínica II, sendo bem tolerados pelos pacientes (BROOKS et al., 2019; GOYAL et al., 2019; MORAN; SZALLASI, 2018; SOUZA et al., 2020). Portanto, o tratamento direcionado dos sintomas de dolorosos associados ao uso dos AIs pode contribuir para restabelecer a qualidade de vida das pacientes após diagnóstico de câncer de mama, melhorar a adesão do regime terapêutico, e consequentemente contribuir para o controle da doença.

## 7. REFERÊNCIAS

ALESSANDRI-HABER, N. et al. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Is Essential in Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain in the Rat. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 18, p. 4444–4452, 2004.

ALESSANDRI-HABER, N. et al. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. **Pain**, v. 118, n. 1–2, p. 70–79, nov. 2005.

ALESSANDRI-HABER, N. et al. A Transient Receptor Potential Vanilloid 4-Dependent Mechanism of Hyperalgesia Is Engaged by Concerted Action of Inflammatory Mediators. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 14, p. 3864–3874, 5 abr. 2006.

ALESSANDRI-HABER, N. et al. Interaction of Transient Receptor Potential Vanilloid 4, Integrin, and Src Tyrosine Kinase in Mechanical Hyperalgesia. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 5, p. 1046–1057, 30 jan. 2008.

ALMEIDA, A. S. DE et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma. **Pharmacological Research**, v. 152, 2020.

ANDERSSON, D. A. et al. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2485–2494, mar. 2008.

ANDERSSON, D. A. et al. TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

ANDERSSON, D. A. et al. Streptozotocin stimulates the ion channel TRPA1 directly: Involvement of peroxynitrite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 24, p. 15185–15196, 2015.

ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 189–204, 2012.

ANEKAR, A. A.; HENDRIX, J. M.; CASCELLA, M. WHO Analgesic Ladder. In: **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2023. p. 284.

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, 15 jan. 2019.

ANTONIAZZI, C. T. DE D. et al. Topical treatment with a transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonist reduced nociception and inflammation in a thermal lesion model in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 125, n. August, p. 28–38, 2018.

AYDEDE, M.; SHRIVER, A. Recently introduced definition of “nociplastic pain” by the International Association for the Study of Pain needs better formulation. **Pain**, v. 159, n. 6, p. 1176–1177, 2018.

BACHY, I. et al. The transcription factor Cux2 marks development of an A-delta sublineage of TrkA sensory neurons. **Developmental Biology**, v. 360, n. 1, p. 77–86, 2011.

BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 849–857, 2004.

BANNISTER, K. et al. Neuropathic Pain: Mechanism-Based Therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 60, n. 1, p. 257–274, 6 jan. 2020.

BAS, M. Clinical efficacy of icatibant in the treatment of acute hereditary angioedema during the FAST-3 trial. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 8, n. 8, p. 707–717, 10 nov. 2012.

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

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. The perception of pain. **Principles of Neuroscience. In , E.R. Kandel, J. Schwartz, and T. Jessell, eds. (New York: Appleton and Lange)**, p. 472–491, 2000.

BASTUJI, H. et al. Thalamic Responses to Nociceptive-Specific Input in Humans: Functional Dichotomies and Thalamo-Cortical Connectivity. **Cerebral Cortex**, v. 26, n. 6, p. 2663–2676, jun. 2016.

BAUTISTA, D. M. et al. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. **Cell**, v. 124, n. 6, p. 1269–1282, mar. 2006.

BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: Bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**, v. 71, n. 3, p. 217–221, 2008.

BENNETT, D. L. H.; WOODS, C. G. Painful and painless channelopathies. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 6, p. 587–599, jun. 2014.

BENNETT, M. I. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic cancer-related pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 38–44, jan. 2019.

BERNA-ERRO, A. et al. Structural determinants of 5',6'-epoxyeicosatrienoic acid binding to and activation of TRPV4 channel. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10522, 5 set. 2017.

BESSAC, B. F. et al. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 5, p. 1899–910, maio 2008.

BESSOU, P.; PERL, E. R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **Journal of Neurophysiology**, v. 32, n. 6, p. 1025–1043, 1969.

BINGHAM, B. et al. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 5, n. 1, p. 28–37, 2009.

BLAIR, N. T. et al. Naturally produced defensive alkenal compounds activate TRPA1. **Chemical Senses**, v. 41, n. 4, p. 281–292, 2016.

BOURINET, E. et al. Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 81–140, 2014.

BRIERLEY, S. M. et al. Selective Role for TRPV4 Ion Channels in Visceral Sensory Pathways. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 2059–2069, jun. 2008.

BROOKS, C. A. et al. Discovery of GSK2798745: A Clinical Candidate for Inhibition of



Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4). **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 8, p. 1228–1233, 8 ago. 2019.

BRUM, E. DA S. et al. TRPA1 involvement in analgesia induced by *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction in mice. **Phytomedicine**, v. 54, p. 248–258, 2019.

BRUSCO, I. et al. Potentiation of Paclitaxel-Induced Pain Syndrome in Mice by Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition and Involvement of Kinins. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 7824–7837, 2017.

BRUSCO, I. et al. Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 168, n. April, p. 119–132, 2019.

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, n. 10, p. 2797–2809, 15 maio 2020.

BRUSCO, I. et al. Kinin B1 and B2 receptors mediate cancer pain associated with both the tumor and oncology therapy using aromatase inhibitors. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4418, 17 mar. 2023.

BUJALSKA, M.; TATARKIEWICZ, J.; GUMUŁKA, S. W. Effect of Bradykinin Receptor Antagonists on Vincristine- and Streptozotocin-Induced Hyperalgesia in a Rat Model of Chemotherapy-Induced and Diabetic Neuropathy. **Pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 158–163, 2008.

BUŁDYŚ, K. et al. What Do We Know about Nociceptive Pain? **Healthcare (Switzerland)**, v. 11, n. 12, p. 1794, 17 jun. 2023.

BURSTEIN, H. J. et al. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor – Positive Breast Cancer : ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. v. 37, n. 5, 2019.

CALIXTO, J. B. et al. Kinin B 1 receptors: Key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 7, p. 803–818, 2004.

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. D. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, n. 1–2, p. 1–34, abr. 2002.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 1997.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 487–517, 2001.

CATERINA, M. J.; PANG, Z. TRP channels in skin biology and pathophysiology. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, 2016.

CENAC, N. et al. Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. **Gut**, v. 59, n. 4, p. 481–488, 1 abr. 2010.

CESARE, P. et al. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, v. 23, n. 3, p. 617–624, 1999.

CHEN, J.; HACKOS, D. H. TRPA1 as a drug target - Promise and challenges. **Naunyn-**

**Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 4, p. 451–463, 2015.

CHEN, Y. et al. Temporomandibular joint pain: A critical role for Trpv4 in the trigeminal ganglion. **Pain**, v. 154, n. 8, p. 1295–1304, ago. 2013.

CHEN, Y.; YANG, C.; WANG, Z. J. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 193, p. 440–451, 2011.

CHO, C.; DEOL, H. K.; MARTIN, L. J. Bridging the Translational Divide in Pain Research: Biological, Psychological and Social Considerations. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. April, p. 1–15, 15 abr. 2021.

CHOI, J. E.; DI NARDO, A. Skin neurogenic inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 3, p. 249–259, 2018.

CHOI, S.-I.; HWANG, S. W. Depolarizing Effectors of Bradykinin Signaling in Nociceptor Excitation in Pain Perception. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 255–267, 1 maio 2018.

CHUNG, M.-K.; JUNG, S. J.; OH, S. B. Role of TRP Channels in Pain Sensation. In: [s.l.: s.n.]. p. 615–636.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, n. 6966, p. 517–524, dez. 2003.

COGHILL, R. C. The Distributed Nociceptive System: A Framework for Understanding Pain. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 10, p. 780–794, out. 2020.

COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. **The Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2082–2097, maio 2021.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17002, 16 fev. 2017.

COLVIN, L. A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: where are we now? **Pain**, v. 160, n. 1, p. S1–S10, maio 2019.

CORDERO-MORALES, J. F.; GRACHEVA, E. O.; JULIUS, D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 46, p. E1184–E1191, 15 nov. 2011.

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

COSTA, R. et al. Kinin Receptors Sensitize TRPV4 Channel and Induce Mechanical Hyperalgesia: Relevance to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 2150–2161, 2018.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 1–32, 1 jun.

2009.

CREW, K. D. et al. Prevalence of Joint Symptoms in Postmenopausal Women Taking Aromatase Inhibitors for Early-Stage Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 25, p. 3877–3883, 1 set. 2007.

CRUSH, J. et al. Misappropriation of the 1986 WHO analgesic ladder: the pitfalls of labelling opioids as weak or strong. **British Journal of Anaesthesia**, v. 129, n. 2, p. 137–142, ago. 2022.

CUOMO, A. et al. Multimodal approaches and tailored therapies for pain management: the trolley analgesic model. **Journal of Pain Research**, v. Volume 12, p. 711–714, fev. 2019.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DA COSTA, D. S. M. et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**, v. 148, n. 3, p. 431–437, 2010.

DAI, Y. TRPs and pain. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, p. 277–291, 2016.

DE LOGU, F. et al. TRPA1 Mediates Aromatase Inhibitor–Evoked Pain by the Aromatase Substrate Androstenedione. **Cancer Research**, v. 76, n. 23, p. 7024–7035, 1 dez. 2016.

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

DE LOGU, F. et al. Oxidative stress mediates thalidomide-induced pain by targeting peripheral TRPA1 and central TRPV4. **BMC Biology**, v. 18, n. 1, p. 197, 14 dez. 2020.

DE LOGU, F. et al. Peripheral Nerve Resident Macrophages and Schwann Cells Mediate Cancer-Induced Pain. **Cancer Research**, v. 81, n. 12, p. 3387–3401, 15 jun. 2021.

DENADAI-SOUZA, A. et al. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 6, p. 1848–1858, 25 jun. 2012.

DERDERIAN, C.; TADI, P. Physiology, Withdrawal Response. **StatPearls**, p. 1–5, 2019.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 284, p. 1–17, 6 set. 2017.

DEVOR, M. Neuropathic pain: Pathophysiological response of nerves to injury. In: **Wall & Melzack's Textbook of Pain**. [s.l: s.n.]. p. 861–888.

DIAS, F. C. et al. The selective TRPV4 channel antagonist HC-067047 attenuates mechanical allodynia in diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 856, n. May, p. 172408, ago. 2019.

DING, X.-L. et al. Involvement of TRPV4-NO-cGMP-PKG pathways in the development of thermal hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 194–201, mar. 2010.

DOERNER, J. F. et al. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13180–13189, 2007.

DRISSI, I.; WOODS, W. A.; WOODS, C. G. Understanding the genetic basis of congenital insensitivity to pain. **British Medical Bulletin**, v. 133, n. 1, p. 65–78, 15 maio 2020.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

DUM, R. P.; LEVINHAL, D. J.; STRICK, P. L. The Spinothalamic System Targets Motor and Sensory Areas in the Cerebral Cortex of Monkeys. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 45, p. 14223–14235, 11 nov. 2009.

DUTRA, R. C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 2, p. 192–207, fev. 2017.

DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, n. 3, p. 237–251, dez. 2007.

EBERHARDT, M. et al. H<sub>2</sub>S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

EHRENFELD, P. et al. Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 1, p. 117–124, 2 maio 2006.

EVERAERTS, W.; NILIUS, B.; OWSIANIK, G. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: From structure to disease. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, n. 1, p. 2–17, set. 2010.

FAJARDO, O. et al. TRPA1 channels: Novel targets of 1,4-dihydropyridines. **Channels**, v. 2, n. 6, p. 429–438, 2008.

FAN, H.-C.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Activation of the TRPV4 Ion Channel Is Enhanced by Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 41, p. 27884–27891, out. 2009.

FERNANDES, E. S. et al. Environmental cold exposure increases blood flow and affects pain sensitivity in the knee joints of CFA-induced arthritic mice in a TRPA1-dependent manner. **Arthritis Research and Therapy**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2016.

FERREIRA, J. et al. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1188–1197, 2002.

FERREIRA, J. et al. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 9, p. 2405–2412, 2005.

FERREIRA, J. et al. The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 3, p. 597–604, mar. 2008.

FERREIRA, J.; DA SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B 2 kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 5, p. 787–794, mar. 2004.

FIALHO, M. F. P. et al. Topical transient receptor potential ankyrin 1 antagonist treatment attenuates nociception and inflammation in an ultraviolet B radiation-induced burn model in

mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 97, n. 2, p. 135–142, 2020.

FIALHO, M. F. P. et al. Kinin B2 and B1 Receptors Activation Sensitize the TRPA1 Channel Contributing to Anastrozole-Induced Pain Symptoms. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1136, 3 abr. 2023a.

FIALHO, M. F. P. et al. TRPV4 Activation and its Intracellular Modulation Mediated by Kinin Receptors Contribute to Painful Symptoms Induced by Anastrozole. **Molecular Neurobiology**, 23 set. 2023b.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. ; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. **McMahon SB, Koltzenburg M, editors. Textbook of pain**, v. 5, p. 125–142, 2005.

FIELDS, H. L.; MALICK, A.; BURSTEIN, R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, n. 4, p. 1742–59, 1995.

FINNERUP, N. B.; KUNER, R.; JENSEN, T. S. Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 1, p. 259–301, 2021.

FIGLIORE, N. T. et al. Pain-resolving immune mechanisms in neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v. 19, n. 4, p. 199–220, 2023.

FITZCHARLES, M.-A. et al. Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. **The Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2098–2110, maio 2021.

FUJITA, M. et al. Roles of kinin B1 and B2 receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. **European Journal of Pain**, v. 14, n. 6, p. 588–594, 2010.

FUSI, C. et al. Steroidal and non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5736, 8 dez. 2014.

GAILLARD, S.; STEARNS, V. Aromatase inhibitor-associated bone and musculoskeletal effects: new evidence defining etiology and strategies for management. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 2, p. 205, 14 abr. 2011.

GARCIA-ELIAS, A. et al. The TRPV4 Channel. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l.: s.n.]. v. 222p. 293–319.

GEBHART, G. F.; BIELEFELDT, K. P. Physiology of visceral pain. **Comprehensive Physiology**, v. 6, p. 1609–1633, 2016.

GEPPETTI, P. et al. The concept of neurogenic inflammation. **BJU International, Supplement**, v. 101, p. 2–6, 2008.

GEPPETTI, P. et al. G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch. **Neuron**, v. 88, n. 4, p. 635–649, nov. 2015.

GIBSON, L. et al. Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2009.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 4, p. 532–545, 2015.

GOLD, M. S. Molecular Biology of Sensory Transduction. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone. 6. ed. [s.l: s.n.]. p. 31–32.

GOYAL, N. et al. Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of a Novel, First-in-Class TRPV4 Ion Channel Inhibitor, GSK2798745, in Healthy and Heart Failure Subjects. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 19, n. 3, p. 335–342, 14 jun. 2019.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–231, 2014.

GRANT, A. D. et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. **Journal of Physiology**, v. 578, n. 3, p. 715–733, 2007.

GRÖGER, M. et al. Release of bradykinin and expression of kinin B 2 receptors in the brain : role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 25, p. 978–989, 2005.

GUILAK, F.; LEDDY, H. A.; LIEDTKE, W. Transient receptor potential vanilloid 4: The sixth sense of the musculoskeletal system? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 404–409, abr. 2010.

GUIMARÃES, J. A. et al. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 24, p. 3157–3172, dez. 1973.

GÜLER, A. D. et al. Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6408–6414, 1 ago. 2002.

GUPTA, A.; HENRY, N. L.; LOPRINZI, C. L. Management of Aromatase Inhibitor–Induced Musculoskeletal Symptoms. **JCO Oncology Practice**, v. 16, n. 11, p. 733–739, nov. 2020.

HAMOOD, R. et al. Chronic pain and other symptoms among breast cancer survivors: prevalence, predictors, and effects on quality of life. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 1, p. 157–169, 2018.

HASHMI, J. A. et al. Shape shifting pain: chronification of back pain shifts brain representation from nociceptive to emotional circuits. **Brain**, v. 136, n. 9, p. 2751–2768, set. 2013.

HENRY, N. L. et al. Prospective characterization of musculoskeletal symptoms in early stage breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, n. 2, p. 365–372, 6 set. 2008.

HERSHMAN, D. L.; LOPRINZI, C.; SCHNEIDER, B. P. Symptoms: Aromatase Inhibitor Induced Arthralgias. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 862p. 89–100.

HINATA, M. et al. Sensitization of transient receptor potential vanilloid 4 and increasing its endogenous ligand 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis. **Pain**, v. 159, n. 5, p. 939–947, 2018.

HINMAN, A. et al. TRP channel activation by reversible covalent modification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19564–19568, dez. 2006.

- HIRAGA, S. et al. Neuroplasticity related to chronic pain and its modulation by microglia. **Inflammation and Regeneration**, v. 42, n. 1, p. 15, 3 dez. 2022.
- HO, J.; LEE, C. TRP channels in skin : from physiological implications to clinical significances. **Biophysics**, v. 11, n. 0, p. 17–24, 2015.
- HUGHES, D. I.; TODD, A. J. Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord. **Neurotherapeutics**, v. 17, n. 3, p. 874–885, jul. 2020.
- HWANG, S. W.; OH, U. Current concepts of nociception: Nociceptive molecular sensors in sensory neurons. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 20, n. 5, p. 427–434, 2007.
- INADA, H. et al. Structural and Biochemical Consequences of Disease-Causing Mutations in the Ankyrin Repeat Domain of the Human TRPV4 Channel. **Biochemistry**, v. 51, n. 31, p. 6195–6206, 7 ago. 2012.
- IWATA, K. et al. Sensitization of TRPV1 and TRPA1 via peripheral mGluR5 signaling contributes to thermal and mechanical hypersensitivity. **Pain**, v. 158, n. 9, p. 1754–1764, 2017.
- JANG, D. et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2719, 8 mar. 2021.
- JAQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7325–7333, 1999.
- JAYAKAR, S. et al. Developing nociceptor-selective treatments for acute and chronic pain. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 619, p. 1–17, 10 nov. 2021.
- JIANG, L. H.; GAMPER, N.; BEECH, D. J. Properties and Therapeutic Potential of Transient Receptor Potential Channels with Putative Roles in Adversity: Focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 724–736, 2011.
- JORDT, S. E. et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v. 427, n. 6971, p. 260–265, 2004.
- JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, n. 732, p. 355–384, 2013.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.
- KASHUBA, E. et al. The kinin–kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers**, v. 18, n. 4, p. 279–296, 1 jun. 2013.
- KHASAR, S. G. et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase c  $\epsilon$  mutant mice. **Neuron**, v. 24, n. 1, p. 253–260, 1 set. 1999.
- KOSEK, E. et al. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? **Pain**, v. 157, n. 7, p. 1382–1386, 30 jul. 2016.
- KREMEYER, B. et al. A Gain-of-Function Mutation in TRPA1 Causes Familial Episodic Pain Syndrome. **Neuron**, v. 66, n. 5, p. 671–680, 2010.



- KUMAR, H. et al. TRPV4: a Sensor for Homeostasis and Pathological Events in the CNS. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 11, p. 8695–8708, 2018.
- KUMAR, H. et al. Elevated TRPV4 Levels Contribute to Endothelial Damage and Scarring in Experimental Spinal Cord Injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 9, p. 1943–1955, 26 fev. 2020.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.
- KUNER, R.; FLOR, H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20–30, 2017.
- KUNER, R.; KUNER, T. Cellular circuits in the brain and their modulation in acute and chronic pain. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 1, p. 213–258, 2021.
- LAROCHE, F. et al. Classification of and Risk Factors for Estrogen Deprivation Pain Syndromes Related to Aromatase Inhibitor Treatments in Women With Breast Cancer: A Prospective Multicenter Cohort Study. **The Journal of Pain**, v. 15, n. 3, p. 293–303, mar. 2014.
- LARSSON, M. Ionotropic glutamate receptors in spinal nociceptive processing. **Molecular Neurobiology**, v. 40, n. 3, p. 260–288, 2009.
- LEEB-LUNDBERG, L. M. et al. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 27–77, 2005.
- LI, L. et al. The Functional Organization of Cutaneous Low-Threshold Mechanosensory Neurons. **Cell**, v. 147, n. 7, p. 1615–1627, dez. 2011.
- LIEDTKE, W. et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 525–535, 27 out. 2000.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.
- LOIBL, S. et al. Breast cancer. **The Lancet**, v. 397, n. 10286, p. 1750–1769, maio 2021.
- LUMRY, W. R. et al. Icatibant for Multiple Hereditary Angioedema Attacks across the Controlled and Open-Label Extension Phases of FAST-3. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 168, n. 1, p. 44–55, 2015.
- LUO, W. et al. A Hierarchical NGF Signaling Cascade Controls Ret-Dependent and Ret-Independent Events during Development of Nonpeptidergic DRG Neurons. **Neuron**, v. 54, n. 5, p. 739–754, jun. 2007.
- MA, Q.-P. The expression of bradykinin B1 receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. **Neuroscience**, v. 107, n. 4, p. 665–673, nov. 2001.
- MA, Q.-P.; HEAVENS, R. Basal expression of bradykinin B1 receptor in the spinal cord in humans and rats. **Neuroreport**, v. 12, n. 11, p. 2311–2314, ago. 2001.
- MA, Q.-P.; HILL, R.; SIRINATHSINGHJI, D. Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. **NeuroReport**, v. 11, n. 18, p. 4003–4005, dez. 2000.

- MACPHERSON, L. J. et al. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 541–545, 2007.
- MANTYH, P. W. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 797–809, out. 2006.
- MARCEAU, F. et al. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. **International Immunopharmacology**, v. 82, n. July 2019, p. 106305, maio 2020.
- MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 845–852, out. 2004.
- MATERAZZI, S. et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 463, n. 4, p. 561–569, 2012.
- MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R.-R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**, v. 33, n. 1, p. 131–139, 17 fev. 2019.
- MCANALLY, H.; BONNET, U.; KAYE, A. D. Gabapentinoid Benefit and Risk Stratification: Mechanisms Over Myth. **Pain and Therapy**, v. 9, n. 2, p. 441–452, 31 dez. 2020.
- MCCABE, C. . Pain mechanisms and the rheumatic diseases. **Musculoskeletal Care**, v. 2, n. 2, p. 75–89, 2004.
- MCNULTY, A. L. et al. TRPV4 as a therapeutic target for joint diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 388, n. 4, p. 437–450, 2015.
- MEACHAM, K. et al. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**, v. 21, n. 6, p. 28, 21 jun. 2017.
- MEENTS, J. E.; FISCHER, M. J. M.; MCNAUGHTON, P. A. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2017.
- MELLO, R. D.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.
- MEOTTI, F. C. et al. Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B 1 and B 2 receptors and intracellular kinase pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 1127–1139, 2012.
- MEOTTI, F. C. et al. The transient receptor potential ankyrin-1 mediates mechanical hyperalgesia induced by the activation of B1 receptor in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 125, p. 75–83, 2017.
- MEYER, R. A. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In **Wall and Melzack's Textbook of Pain**, S.B. McMahon and M. Koltzenburg, eds. (Philadelphia: Elsevier), p. 3–34, 2008.
- MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, jul. 2016.
- MINHAS, D.; CLAUW, D. J. Pain Mechanisms in Patients with Rheumatic Diseases. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 47, n. 2, p. 133–148, maio 2021.

MOCHLY-ROSEN, D.; DAS, K.; GRIMES, K. V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 12, p. 937–957, dez. 2012.

MOHAMMAD NEZHADY, M. A.; RIVERA, J. C.; CHEMTOB, S. Location Bias as Emerging Paradigm in GPCR Biology and Drug Discovery. **iScience**, v. 23, n. 10, p. 101643, out. 2020.

MOILANEN, L. J. et al. TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. **Scientific Reports**, v. 2, p. 2–7, 2012.

MOLLIVER, D. . et al. Presence or absence of TrKA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 361, n. 3, p. 404–416, 1995.

MOORE, R. A. et al. Single dose oral analgesics for acute postoperative pain in adults - an overview of Cochrane reviews. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 28 set. 2015.

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, n. 12, p. 2185–2203, 6 jun. 2018.

MOREAU, M. E. et al. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 6–38, 2005.

MOULIN, D. et al. Pharmacological Management of Chronic Neuropathic Pain – Consensus Statement and Guidelines from the Canadian Pain Society. **Pain Research and Management**, v. 12, n. 1, p. 13–21, 2007.

NABHOLTZ, J. M. A. Long-term safety of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 4, n. 1, p. 189–204, 2008.

NASSINI, R. et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. **Pain**, v. 152, n. 7, p. 1621–1631, 2011.

NEGRAES, P. D. et al. Roles of Kinins in the Nervous System. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 4, p. 613–623, 1 abr. 2015.

NILIOUS, B. et al. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. **Physiological Reviews**, v. 1, n. 87, p. 165–217, 2007.

NILIOUS, B. et al. Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets : From the Science of Basic Research to the Art of Medicine. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 3, p. 676–814, 2014.

NILIOUS, B.; APPENDINO, G.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential channel TRPA1: From gene to pathophysiology. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 464, n. 5, p. 425–458, 2012.

NILIOUS, B.; VOETS, T. The puzzle of TRPV4 channelopathies. **EMBO reports**, v. 14, n. 2, p. 152–163, 2013.

NYROP, K. A. et al. Aromatase inhibitor associated arthralgia: the importance of oncology provider-patient communication about side effects and potential management through physical activity. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 6, p. 2643–2650, 12 jun. 2016.

O'CONNOR, C. J. et al. Increased susceptibility of Trpv4 -deficient mice to obesity and obesity-induced osteoarthritis with very high-fat diet. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 2, p. 300–304, fev. 2013.

OLDENMENGER, W. H. et al. A systematic review on barriers hindering adequate cancer pain management and interventions to reduce them: A critical appraisal. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 8, p. 1370–1380, maio 2009.

ORHAN, M. E. et al. Pain treatment practice according to the WHO analgesic ladder in cancer patients: eight years experience of a single center. **Agri**, v. 20, n. 4, p. 37–43, 2008.

OSSIPOV, M.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 8, n. 2, p. 1751–4258, 2014.

PAN, Z. Z.; FIELDS, H. L. Endogenous Opioid-Mediated Inhibition Of Putative Pain-Modulating Neurons In Rat Rostral Ventromedial Medulla. **Neuroscience**, v. 74, n. 3, p. 855–862, 1996.

PANDELANI, F. F. et al. Chronic pain: its impact on the quality of life and gender. **Frontiers in Pain Research**, v. 4, 13 set. 2023.

PARICIO-MONTESINOS, R. et al. The Sensory Coding of Warm Perception. **Neuron**, v. 106, n. 5, p. 830- 841.e3, jun. 2020.

PARK, E. H.; HAN, H. C. Pain transmission and peripheral group III metabotropic glutamate receptors (mGluRs). In: **The Neurobiology, Physiology, and Psychology of Pain**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 227–238.

PENG, S.; POOLE, D. P.; VELDHUIS, N. A. Mini-review: Dissecting receptor-mediated stimulation of TRPV4 in nociceptive and inflammatory pathways. **Neuroscience Letters**, v. 770, n. October 2021, p. 136377, 2022.

PHELPS, C. B. et al. Structural Analyses of the Ankyrin Repeat Domain of TRPV6 and Related TRPV Ion Channels. **Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 2476–2484, 1 fev. 2008.

POGATZKI-ZAHN, E.; CHANDRASENA, C.; SCHUG, S. A. Nonopioid analgesics for postoperative pain management. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 27, n. 5, p. 513–519, out. 2014.

POOLE, D. P. et al. Protease-activated Receptor 2 (PAR2) Protein and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Protein Coupling Is Required for Sustained Inflammatory Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 8, p. 5790–5802, fev. 2013.

POPKIROV, S. et al. Functional pain disorders – more than nociplastic pain. **NeuroRehabilitation**, v. 47, n. 3, p. 343–353, 13 nov. 2020.

PRESCOTT, S. A.; RATTÉ, S. **Somatosensation and Pain**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

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

RAJASEKHAR, P.; POOLE, D. P.; VELDHUIS, N. A. **Role of Nonneuronal TRPV4 Signaling in Inflammatory Processes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 79

- RAMSEY, S. I.; DELLING, M.; CLAPHAM, D. . An introduction on TRP channels. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 2, p. 619–647, 2006.
- RICHTER, F.; SEGOND VON BANCHET, G.; SCHAIBLE, H. G. Transient Receptor Potential vanilloid 4 ion channel in C-fibres is involved in mechanonociception of the normal and inflamed joint. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- ROBARGE, J. D. et al. Aromatase inhibitors augment nociceptive behaviors in rats and enhance the excitability of sensory neurons. **Experimental Neurology**, v. 281, p. 53–65, 2016.
- ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; MAO, S.; ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> Cotransport and Intracellular Chloride Regulation in Rat Primary Sensory Neurons: Thermodynamic and Kinetic Aspects. **Journal of Neurophysiology**, v. 100, n. 1, p. 169–184, jul. 2008.
- RODRIGUES, P.; RUVIARO, N. A.; TREVISAN, G. TRPV4 Role in Neuropathic Pain Mechanisms in Rodents. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 1, p. 24, 22 dez. 2022.
- SALAS, R. et al. Activity correlations between on-like and off-like cells of the rostral ventromedial medulla and simultaneously recorded wide-dynamic-range neurons of the spinal dorsal horn in rats. **Brain Research**, v. 1652, p. 103–110, 2016.
- SCHAEFFER, P. et al. Detection of bradykinin B1 receptors in rat aortic smooth muscle cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 291–298, fev. 2001.
- SCHEFF, N. N. et al. Oral cancer induced TRPV1 sensitization is mediated by PAR2 signaling in primary afferent neurons innervating the cancer microenvironment. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.
- SCHMIDT, M. et al. Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane. **Neuron**, v. 64, n. 4, p. 498–509, nov. 2009.
- SCHOLZ, J. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 53–59, jan. 2019.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. S11, p. 1062–1067, 28 nov. 2002.
- SCHUG, S. A. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic postsurgical or posttraumatic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 45–52, 2019.
- SEAL, R. P. et al. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 651–655, 15 dez. 2009.
- SHIBASAKI, K. TRPV4 activation by thermal and mechanical stimuli in disease progression. **Laboratory Investigation**, v. 100, n. 2, p. 218–223, 2020.
- SHIERS, S. I. et al. Convergence of peptidergic and non-peptidergic protein markers in the human dorsal root ganglion and spinal dorsal horn. **Journal of Comparative Neurology**, v. 529, n. 10, p. cne.25122, 16 fev. 2021.
- SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 12 jan. 2023.
- SILVA, C. R. et al. The role of kinin B 1 receptor and the effect of angiotensin I-converting

enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 1, p. 260–268, jan. 2016.

SIPE, W. E. B. et al. Transient receptor potential vanilloid 4 mediates protease activated receptor 2-induced sensitization of colonic afferent nerves and visceral hyperalgesia. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 5, p. G1288–G1298, maio 2008.

SNEDDON, L. U. Comparative physiology of nociception and pain. **Physiology**, v. 33, n. 1, p. 63–73, 2018.

SORKIN, L. S.; TONY, L. Pharmacology and Treatment of Pain. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone. [s.l: s.n.]. p. 375–401.

SOUZA, D. et al. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 0, n. 0, 2020.

STAROBOVA, H.; VETTER, I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. May, p. 1–21, 31 maio 2017.

STORY, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 819–29, mar. 2003.

SUGIYAMA, D.; KANG, S.; BRENNAN, T. J. Muscle reactive oxygen species (ROS) contribute to post-incisional guarding via the TRPA1 receptor. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2017.

SUN, J. et al. Novel SCN9A missense mutations contribute to congenital insensitivity to pain: Unexpected correlation between electrophysiological characterization and clinical phenotype. **Molecular Pain**, v. 16, p. 174480692092388, 18 jan. 2020.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

SURA, L. et al. C-terminal acidic cluster is involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18067–18077, 2012.

SURESH, K. et al. Hydrogen peroxide-induced calcium influx in lung microvascular endothelial cells involves TRPV4. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 309, n. 12, p. L1467–L1477, 2015.

TENTI, S. et al. Aromatase Inhibitors—Induced Musculoskeletal Disorders: Current Knowledge on Clinical and Molecular Aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5625, 6 ago. 2020.

TODAKA, H. et al. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35133–35138, 2004.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 11 dez. 2010.

- TODD, A. J. Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. **Molecular Pain**, v. 13, p. 174480691769300, jan. 2017.
- TODD, A. J.; R.H., K. Neuroanatomical Substrates of Spinal Nociception. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone. 6. ed. [s.l: s.n.]. p. 77–93.
- TONG, C. K.; KAFTAN, E. J.; MACDERMOTT, A. B. Functional identification of NR2 subunits contributing to NMDA receptors on substance P receptor-expressing dorsal horn neurons. **Molecular Pain**, v. 4, p. 1–11, 2008.
- TORRANCE, N. et al. Neuropathic pain in the community: More under-treated than refractory? **Pain**, v. 154, n. 5, p. 690–699, maio 2013.
- TRACEY, W. D. Nociception. **Current Biology**, v. 27, n. 4, p. R129–R133, fev. 2017.
- TREVISAN, G. et al. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. **Cancer Research**, v. 73, n. 10, p. 3120–3131, 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.
- TREVISANI, M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **PNAS**, v. 104, n. 33, p. 13519–13524, 2007.
- VANDEWAUW, I. et al. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. **Nature**, v. 555, p. 662–666, 2018.
- VANEGAS, H.; BARBARO, N. M.; FIELDS, H. L. Tail-flick related activity in medullospinal neurons. **Brain Research**, v. 321, n. 1, p. 135–141, 1984.
- VARTIAINEN, N. et al. Thalamic pain: anatomical and physiological indices of prediction. **Brain**, v. 139, n. 3, p. 708–722, mar. 2016.
- VAY, L.; GU, C.; MCNAUGHTON, P. A. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. 2012.
- VELÁZQUEZ, K. T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S. M. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 55, n. 6, p. 578, jun. 2007.
- VELDHUIS, N. A. et al. The g protein–coupled receptor–transient receptor potential channel axis: Molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 1, p. 36–73, 2015.
- VENTAFRIDDA, V. et al. WHO guidelines for the use of analgesics in cancer pain. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 7, n. 1, p. 93–96, 1985.
- VIANA, F. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 15, p. 4151–4169, 2016.
- VIANA, F.; VOETS, T. Heat Pain and Cold Pain. In: **The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain**. [s.l.] Oxford University Press, 2019. p. 179–199.



VILLANUEVA, L.; NOSEDA, R. Trigeminal mechanisms of nociception. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone. 6. ed. [s.l: s.n.]. p. 793–802.

VILLARREAL, C. F. et al. The long-lasting sensitization of primary afferent nociceptors induced by inflammation involves prostanoid and dopaminergic systems in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 678–683, jan. 2013.

VOETS, T. et al. Molecular Determinants of Permeation through the Cation Channel TRPV4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 33704–33710, set. 2002.

VOLKERS, L.; MECHIOUKHI, Y.; COSTE, B. Piezo channels: from structure to function. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 467, n. 1, p. 95–99, 2014.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, p. i69–i85, dez. 2010.

VRIENS, J.; NILIUS, B.; VOETS, T. Peripheral thermosensation in mammals. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 9, p. 573–589, 23 set. 2014.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288, 22 jan. 2019.

WANG, M.; THYAGARAJAN, B. Pain pathways and potential new targets for pain relief. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 110–123, 1 fev. 2022.

WANG, S. et al. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: A molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, v. 131, n. 5, p. 1241–1251, 2008a.

WANG, Y. Y. et al. The Nociceptor Ion Channel TRPA1 Is Potentiated and Inactivated by Permeating Calcium Ions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 47, p. 32691–32703, nov. 2008b.

WAS, H. et al. Mechanisms of Chemotherapy-Induced Neurotoxicity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. March, p. 1–32, 28 mar. 2022.

WATANABE, H. et al. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13569–13577, 2002a.

WATANABE, H. et al. Heat-evoked Activation of TRPV4 Channels in a HEK293 Cell Expression System and in Native Mouse Aorta Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 47044–47051, 6 dez. 2002b.

WATANABE, H. et al. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 434–438, 2003.

WENG, Y. et al. Prostaglandin Metabolite Induces Inhibition of TRPA1 and Channel-Dependent Nociception. **Molecular Pain**, v. 8, n. 1, p. 1744-8069-8–75, 1 jan. 2012.

WERNER, M. F. P. et al. Peripheral kinin B1 and B2 receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 1, p. 48–57, 2007.

WHITE, J. P. M. et al. TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. **Physiological**

**Reviews**, v. 96, n. 3, p. 911–973, jul. 2016.

WHO, W. H. O. **Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019**.

WILD, V.; MESSLINGER, K.; FISCHER, M. J. M. Hydrogen sulfide determines HNO-induced stimulation of trigeminal afferents. **Neuroscience Letters**, v. 602, p. 104–109, 2015.

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

WOOLF, C. J. What is this thing called pain ? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 10–12, 2010.

WOOLF, C. J. Capturing Novel Non-opioid Pain Targets. **Biological Psychiatry**, v. 87, n. 1, p. 74–81, jan. 2020.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353–364, 2007.

WOTHERSPOON, G.; WINTER, J. Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. **Neuroscience Letters**, v. 294, n. 3, p. 175–178, 2000.

YATES, R. A. et al. Arimidex (ZD1033): A selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 4, p. 543–548, 1996.

YU, S. et al. Transient receptor potential ion-channel subfamily V member 4: a potential target for cancer treatment. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 7, 2019.

ZHANG, Y. et al. A transient receptor potential vanilloid 4 contributes to mechanical allodynia following chronic compression of dorsal root ganglion in rats. **Neuroscience Letters**, v. 432, n. 3, p. 222–227, 2008.

ZHAO, P. et al. Cathepsin S causes inflammatory pain via biased agonism of PAR2 and TRPV4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 39, p. 27215–27234, 2014.

ZURBORG, S. et al. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 277–279, 2007.

## 8. APÊNDICE I - ARTIGOS COMPLEMENTARES

Pharmacology & Therapeutics 230 (2022) 107959



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology & Therapeutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pharmthera](http://www.elsevier.com/locate/pharmthera)



### Animal models of fibromyalgia: What is the best choice?



Evelyne Silva Brum <sup>a,1</sup>, Gabriela Becker <sup>a,1</sup>, Maria Fernanda Pessano Fialho <sup>a,1</sup>, Sara Marchesan Oliveira <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Centre of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Centre of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

## European Journal of Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)


## Involvement of peripheral mast cells in a fibromyalgia model in mice

Evelyne da Silva Brum<sup>a,1</sup>, Maria Fernanda Pessano Fialho<sup>a,1</sup>, Gabriela Becker<sup>a</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>a,b</sup>, Sara Marchesan Oliveira<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Centre of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

REVIEW



## Could the fibromyalgia syndrome be triggered or enhanced by COVID-19?

Maria Fernanda Pessano Fialho<sup>1</sup> · Evelyne Silva Brum<sup>1</sup> · Sara Marchesan Oliveira<sup>1,2</sup> 

Received: 4 November 2022 / Accepted: 8 February 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

## 9. ANEXOS

### ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO USO DE ANIMAIS: PROJETO ANASTROZOL E TRPA1



Universidade Federal de Santa Maria

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

#### CERTIFICADO : EMENDA v24/12/2020

Certificamos que a EMENDA (versão de 24/12/2020) da proposta intitulada "Avaliação do envolvimento dos receptores B1 e B2 de cininas na sensibilização do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) induzida pelo inibidor da aromatase anastrozol", CEUA nº 2304280220 (ID 013345), sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira** - 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 vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) em 05/01/2021.

Pedido apresentado à CEUA: No presente projeto (número 2304280220/2020) consta a aprovação diferentes procedimentos experimentais para avaliar o envolvimento dos receptores B1 e B2 de cininas na sensibilização do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) induzida pelo inibidor da aromatase anastrozol. Entre estes procedimentos experimentais, estão diferentes parâmetros nociceptivos avaliados após a administração do anastrozol, agonistas e antagonistas dos receptores de cininas e do canal TRPA1. Contudo, venho, por meio deste, solicitar a alteração de protocolos experimentais aprovados previamente no presente projeto. Para realização do experimento piloto (segunda e terceira etapa) foi descrito que após a administração do anastrozol (segunda etapa) ou o tratamento com os antagonistas dos receptores de cininas e do canal TRPA1 (terceira etapa) iria ser verificado a alodínia mecânica, bem como a força muscular em diferentes tempos (0.5, 1, 2, 3, 6 e 24 h) ou até quando necessário para observar os efeitos dos tratamentos. Porém, ao submeter o restante do projeto (projeto completo) houve um equívoco na descrição dos protocolos experimentais (experimento 5, 6, 7, 8 e 9) e foi solicitado e aprovado apenas a avaliação da alodínia mecânica pelo teste de von Frey em diferentes tempos (0.5, 1, 2, 3, 6 e 24 h), e a avaliação da força muscular pelo Grip teste no tempo (h) em que o inibidor da aromatase, anastrozol (0,2 mg/kg, v.o.), causasse efeito nociceptivo máximo nos dias 1, 3, 7, 10, 12, 15, 16, 17 [...]. Dessa forma, gostaria que além de avaliar a alodínia mecânica em diferentes tempos nos experimentos 5, 6, 7, 8 e 9, também avaliar a força muscular através do Grip teste desses animais nos mesmos tempos que será avaliada a alodínia mecânica (0.5, 1, 2, 3, 6, 24 h, ou até quando necessário para observar os efeitos dos tratamentos).

Considerações da CEUA: A emenda está aprovada a partir desta solicitação da pesquisadora.

Término previsto: 12/2022

#### ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Machos	420	0

Santa Maria, 07 de março de 2024

Dra. Patrícia Bräunig  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

## ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO USO DE ANIMAIS: PROJETO ANASTROZOL E TRPV4



Universidade Federal de Santa Maria

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

### CERTIFICADO : EMENDA v25/02/2022

Certificamos que a EMENDA (versão de 25/02/2022) da proposta intitulada "Avaliação do envolvimento do receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4) no modelo de dor induzida pelo inibidor da aromatase anastrozol e sua possível sensibilização pelos receptores B1 e B2 de cininas", CEUA nº 3026220520 (ID 055162), sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira** - 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 vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) em 29/03/2022.

Pedido apresentado à CEUA: No presente projeto (CEUA Nº 3026220520) consta a aprovação de diferentes procedimentos experimentais para avaliar o envolvimento dos receptores B1 e B2 de cininas na sensibilização do receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4) induzida pelo inibidor da aromatase anastrozol. Este projeto foi separado em duas fases, as quais consistem na realização do experimento piloto (Etapas 1 e 2 e etapas 3 e 4) e na realização do projeto completo (Etapas 5 a 7). Como descrito no presente projeto, iríamos conduzir os experimentos do projeto piloto, e se caso os resultados fossem promissores, enviaríamos uma emenda ao CEUA, solicitando os demais animais para dar seguimento ao projeto completo. Assim, esta emenda tem como justificativa solicitar a autorização do CEUA para a realização do projeto completo, bem como alterarmos diferentes itens previamente aprovados no projeto completo, tais como: - Autorização para fecharmos o N experimental igual a 6 nas etapas 3 e 4 do experimento piloto e realizarmos todos os protocolos experimentais previamente aprovados no projeto completo (experimentos 5 ao 7) utilizando o tempo de 2 h após a administração do anastrozol. - Autorização para realizarmos a avaliação da força muscular pelo Grip teste em diferentes tempos (0,5, 1, 2, 3, 6 e 24 h) nos experimentos 5, 6 e 7 já previamente descritos e aprovados no presente projeto. - Solicitar a alteração da dose subnociceptiva do agonista do receptor B1 de cininas, DABK e do agonista do receptor TRPV4, 4?PDD de 1 nmol/pata para 3 nmol/pata

Considerações da CEUA: Emenda aprovada em seus aspectos éticos. -Autorizada a(s) alteração(ões) solicitadas pelo pesquisador responsável. Atenção: Toda e qualquer alteração a ser realizada no projeto deve ser informada à CEUA a partir do encaminhamento, no Sistema Ceuaonline, de emenda ou notificação. Alterações no projeto sem aviso prévio à CEUA são passíveis de sanções ao(s) pesquisador(es), de acordo com as normativas do CONCEA.

Término previsto: 12/2023

Origem: Biotério Central UFSM

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 7 a 8 semanas

Quantidade  
solicitada: 222

Linhagem: C57BL/6

Peso: 20 a 25 g

#### ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Machos	246	0

Santa Maria, 07 de março de 2024

Dra. Patrícia Bräunig  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria



## ANEXO C – LICENÇA DA PARA UTILIZAÇÃO DO CONTEÚDO DO ARTIGO CIENTÍFICO II

Order Date	25-Mar-2024	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1465864-1	Publisher Portion	HUMANA PRESS, INC. Chapter/article
ISSN	1559-1182		

### LICENSED CONTENT

Publication Title	Molecular neurobiology	Publication Type	e-Journal
Article Title	TRPV4 Activation and its Intracellular Modulation Mediated by Kinin Receptors Contribute to Painful Symptoms Induced by Anastrozole	Start Page	1627
		End Page	1642
		Issue	3
		Volume	61
		URL	<a href="http://journals.humanapress.com/JournalTOC.pasp?issn=0893-7648">http://journals.humanapress.com/JournalTOC.pasp?issn=0893-7648</a>
Date	01/01/1987		
Language	English		
Country	United States of America		
Rightsholder	Springer Nature BV		

### REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-16	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	16	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD

### NEW WORK DETAILS

Title	TRPV4 Activation and its Intracellular Modulation Mediated by Kinin Receptors Contribute to Painful Symptoms Induced by Anastrozole	Institution Name	Federal University of Santa Maria
		Expected Presentation Date	2024-04-11
Instructor Name	Maria Fernanda Pessano Fialho		

### ADDITIONAL DETAILS