



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Jonathan Paulo Agnes

Avaliação não clínica da atividade antitumoral e antinociceptiva do Beta-cariofileno em modelo murino de neuropatia induzida por oxaliplatina.

Florianópolis-SC

2023

Jonathan Paulo Agnes

Avaliação não clínica da atividade antitumoral e antinociceptiva do Beta-cariofileno em modelo murino de neuropatia induzida por oxaliplatina.

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Doutor em
Farmacologia

Orientador: Dr. Alfeu Zanotto Filho.

Florianópolis-SC

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Agnes, Jonathan Paulo

Avaliação não clínica da atividade antitumoral e antinociceptiva do Beta-cariofileno em modelo murino de neuropatia induzida por oxaliplatina. / Jonathan Paulo Agnes ; orientador, Alfeu Zanotto Filho, 2023.

89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Neuropatia induzida por quimioterapia. 3. Oxaliplatina. 4. Beta-cariofileno. 5. Câncer. I. Zanotto Filho, Alfeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Avaliação não clínica da atividade antitumoral e antinociceptiva do Beta-cariofileno em modelo murino de neuropatia induzida por oxaliplatina.

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 26/01/2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a, Dr^a Nara Lins Meira Quintão
Universidade do Vale do Itajaí

Prof^a, Dr^a. Morgana Duarte da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^o, Dr. Juliano Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho
Orientador

Dedico esse trabalho a minha mãe Soely, a minha irmã Daniani e ao meu pai Darci (em memória), que sempre me apoiaram, incentivaram e ajudaram em tudo que foi possível para realizar meus sonhos, como esse que se realiza a partir deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

De forma especial, agradeço aos meus pais, Darci (em memória) e Soely, por todos os valores de amor e humanidade ensinados, por toda a luta para que eu tivesse oportunidade para chegar até aqui. Por todas as vezes que abdicaram de si, para conduzir a realização dos meus sonhos; por todo amor dedicado a mim, muito obrigado, amo vocês.

A minha irmã Daniani, que foi fundamental nas minhas conquistas; agradeço pelo amor e cuidado dado a mim desde meu primeiro dia de vida, pelo apoio aos meus anseios de vida, por dividir os mais difíceis momentos que passamos, sempre segurando minhas mãos, assim como por todos momentos de alegria plena que passamos juntos.

Ao professor Alfeu, um dos grandes exemplos de cientistas que tenho, agradeço pela paciência e compreensão ao me orientar, pela acolhida desde o mestrado até aqui, por toda troca de conhecimento ao longo desses quase 6 anos de UFSC que me fizeram crescer muito profissionalmente. Foi uma honra poder aprender com alguém tão inteligente.

Aos colegas de laboratório Rosângela, Marina, Raquel, Marcelo, Helena, Karol, Bárbara e Guilherme, por todo auxílio durante os experimentos, pela amizade dentro e fora do laboratório, pelas palavras de força em momentos difíceis ao longo desses anos, que muito me ajudaram a seguir em frente e a acreditar em mim. Vocês foram muito importantes na conquista que está por vir.

Ao André, agradeço por todo amor, carinho e cuidado direcionados a mim nesses anos todos, sem você do meu lado esse caminho seria muito mais difícil. Obrigado por cada momento de risos, pela companhia e parceria no dia a dia, por nunca me deixar desacreditar na minha capacidade e sempre fazer de tudo que esteve ao seu alcance para diminuir minhas angústias, deixando os dias mais difíceis um pouco mais leves.

Minha gratidão a todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFSC pelo conhecimento passado nas aulas, laboratório ou conversas de corredor, que muito contribuíram para minha formação nessa etapa. Em especial agradeço aos professores Juliano Ferreira e Antonio de Pádua Carobrez por ceder materiais e laboratórios para realização de meus experimentos.

A todos os colegas da farmacologia, pelas conversas, troca de conhecimento, momentos de lazer e auxílio durante os experimentos e disciplinas.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, dos biotérios, da secretaria de pós-graduação e do restaurante universitário, que foram de grande importância em muitas situações ao longo desses 4 anos.

Agradeço a todas as pessoas e organizações que lutaram pela ciência nesses 4 anos difíceis onde a ciência e os cientistas foram desacreditados, mas que com muito esforço mostraram a importância da ciência para o desenvolvimento do país.

A CAPES e CNPq pelo fomento a pesquisa e pela bolsa que possibilitou a permanência na pós-graduação.

RESUMO

A neuropatia periférica induzida por oxaliplatina (NIOX) é uma importante morbidade associada ao tratamento do câncer. O manejo do paciente neuropático ainda é um desafio devido à dificuldade de diagnóstico e à falta de fármacos eficazes na redução dos sintomas da NIOX. A cronificação e severidade da NIOX, além de afetarem a qualidade de vida dos pacientes, podem levar a alterações no protocolo quimioterápico, favorecendo o surgimento de resistência a antitumorais e falha terapêutica. É sabido que, dentre os processos fisiopatológicos envolvidos na NIOX, os danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e a neuroinflamação são fundamentais para o surgimento das alterações nociceptivas. Dessa forma, estratégias farmacológicas que atuem reduzindo esses dois eventos podem ser úteis no controle da NIOX. Neste sentido, o β -cariofileno (BCP) é uma molécula promissora para o tratamento da NIOX, dado que apresenta atividade anti-inflamatória, na modulação redox e potencial efeito antitumoral. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos do BCP administrado por via oral, sobre a nocicepção e desenvolvimento de tumores em camundongos tratados com OXA. Os resultados demonstram que o tratamento, tanto em protocolo preventivo quanto terapêutico com BCP, reduziu a hiperalgesia mecânica, avaliada através do teste de von Frey; e a alodinia térmica ao frio, avaliada no teste da placa fria. Os efeitos antinociceptivos observados, ao menos em parte, são exercidos por receptores canabinoides tipo 2 (CB₂), dado que o antagonista CB₂ SR144528 inibe o efeito antinociceptivo mecânico do BCP. O efeito antinociceptivo observado no tratamento com BCP foi acompanhado pela redução da lipoperoxidação e produção de ERO, e da redução da neuroinflamação, estimada pela quantificação das citocinas inflamatórias TNF e IL-1 β em medula espinhal dos animais tratados com OXA. Também foi observado que o BCP interfere nas vias de sinalização de TRPA1 e TRPV1, reduzindo a nocicepção espontânea aguda, hiperalgesia ao frio e edema de pata de animais que receberam injeção intraplantar dos agonistas destes receptores, AITC ou capsaicina. Sobre o desenvolvimento de tumores, o BCP não alterou a eficácia antitumoral da OXA, assim como apresentou efeito antitumoral no modelo de melanoma B16F10. Em suma, os resultados demonstram que o BCP é um fitoquímico promissor para o tratamento da NIOX, com efeito antinociceptivo na neuropatia, e sem alterar a eficácia antitumoral da OXA.

Palavras-chave: Neuropatia; nocicepção; oxaliplatina; β -cariofileno; receptor CB₂.

ABSTRACT

Oxaliplatin-induced neuropathy (OIN) is an important morbidity associated with cancer treatment. Treatment of neuropathic patients remains challenging due to difficulty in diagnosis and lack of effective drugs to alleviate OIN symptoms. The chronicity and severity of OIN not only affect patients' quality of life, but may also lead changes in treatment protocol, which may promote tumor cell resistance to chemotherapy and reduce the efficacy of antitumor therapy. It is well known that among the pathophysiological processes involved in OIN, damage by reactive oxygen species (ROS) and neuroinflammation are fundamental to the development of nociceptive changes. Therefore, pharmacological strategies that reduce both of these processes, could be useful in controlling OIN. In this sense, the phytochemical β -caryophyllene (BCP) is a promising molecule for the treatment of OIN, owing to its anti-inflammatory effect, redox modulation, and potential antitumor activity. In this work, we investigated the effects of BCP on nociception and tumor development in OXA-treated mice model. We found that preventive and therapeutic treatment with BCP reduced mechanical hyperalgesia, assessed by the von Frey test, and cold allodynia, as assessed by the cold plate test. The antinociceptive effects are exerted in part by cannabinoid receptor type 2 (CB₂), given that the CB₂ antagonist SR144528 inhibited the mechanical antinociceptive effect of BCP. The antinociceptive effect observed with BCP treatment is accompanied by reduction of lipoperoxidation and ROS production, as well as to decreased of neuroinflammation in the spinal cord. BCP also seems to interfere with TRPA1 and TRPV1 signaling by reducing acute spontaneous nociception, cold hyperalgesia, and paw edema in animals treated with intraplantar injection of TRPV1 e TRPA1 agonists, capsaicin or AITC. Regarding tumor development, BCP did not alter the antitumor efficacy of OXA, and also showed an antitumor effect in the B16F10 melanoma model. The results indicate that BCP is a promising phytochemical for the treatment of OIN through inhibition of mechanical hyperalgesia and cold allodynia without altering the antitumor effect of OXA.

Keywords: Neuropathy; nociception; oxaliplatin; β -caryophyllene; CB₂ receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos envolvidos na NIOX.....	19
Figura 2. Estrutura do BCP e metabólitos gerados em coelhos após administração oral.....	23
Figura 3. Vias de sinalização envolvidas na ativação de CB ₂	25
Desenho experimental 1.....	33
Desenho experimental 2.....	33
Figura 4. Avaliação nociceptiva do efeito do tratamento concomitante de OXA com BCP administrado uma ou duas vezes ao dia (protocolo preventivo).....	41
Figura 5. Avaliação nociceptiva do efeito do tratamento BCP a curto e longo prazo, administrado após a indução da neuropatia por OXA.....	42
Figura 6. Avaliação do efeito do tratamento com o antagonista CB ₂ SR144528 sobre os efeitos antinociceptivos do BCP no modelo de NIOX.....	44
Figura 7. Avaliação nociceptiva do efeito do agonista CB ₂ GW405833 em modelo de NIOX.....	45
Figura 8. Avaliação do efeito do tratamento com o antagonista PPAR _γ GW9662 sobre os efeitos antinociceptivos do BCP no modelo de NIOX.....	46
Figura 9. Avaliação dos efeitos do BCP sobre a hiperalgesia e edema da pata em um modelo de nocicepção aguda induzida por algógenos.....	48
Figura 10. Avaliação de danos oxidativos em tecidos de animais tratados com BCP em modelo de NIOX.....	50/51
Figura 11. Mensuração dos níveis de IL-1 β e TNF- α em medula espinhal de animais tratados com BCP em modelo de NIOX.....	52
Figura 12. Avaliação da toxicologia macroscópica de órgãos e de marcadores de dano hepático, renal e muscular.....	53/54
Figura 13. Hematologia de animais tratados com BCP em modelo de NIOX.....	55
Figura 14. Avaliação da interação do BCP com OXA sobre o desenvolvimento do adenocarcinoma mamário de Ehrlich.....	56
Figura 15. Efeito antitumoral do BCP em modelo de melanoma murino B16F10.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE – 4-hidroxinonenal

AINE – Anti-inflamatório não esteroidal

AITC – Alil isotiocianato

ALT – Alanina aminotransferase

AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP – Adenosina trifosfato

BCP – β -cariofileno

BSA – Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)

CB₁ – receptor canabinoide tipo 1

CB₂ – receptor canabinoide tipo 2

CBD – Canabidiol

CK – Creatina quinase

CLAE - Cromatografia Líquida de alta eficiência

CONCEA - Conselho Nacional de Experimentação Animal

CTCAE - Common Terminology Criteria for Adverse Events (Critérios Comuns de Terminologia para Eventos Adversos)

DNA- Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleíco)

DRG – Dorsal root ganglia (gânglio da raiz dorsal)

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetracético)

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FAL – Fosfatase alcalina

HIV – Human immunodeficiency vírus (vírus da imunodeficiência humana)

i.p – Intraperitoneal

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL10 – Interleucina 10

IL6 – Interleucina 6

MAPK - Mitogen-activated protein kinase (proteína quinase ativada por mitógeno)

MDA – Malondialdeído

NIOX – Neuropatia periférica induzida por oxaliplatina

NIQ – Neuropatia induzida por quimioterapia

OXA – Oxaliplatina

PBS - Phosphate-buffered saline (Salina tamponada com fosfato)

PGE2 – Prostaglandina E2

PKA – Proteína quinase A

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PPAR γ – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gamma

RIPA - Radioimmunoprecipitation assay buffer (Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação)

SNC – Sistema nervoso central

TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

THC – Delta 9 – tetrahydrocannabinol

TNF– Fator de necrose tumoral

TRPA1- Receptor de potencial transitório com domínios tipo anquirina 1

TRPM8 - Receptor de potencial transitório tipo melastatina 8

TRPV1 – Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1

v.o – Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 TERAPÊUTICA DO CÂNCER E OS EFEITOS ADVERSOS DA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL.....	13
1.2 NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS: ASPECTOS CLÍNICOS.....	14
1.3 FISIOPATOLOGIA DA NEUROPATIA INDUZIDA POR OXALIPLATINA.....	18
1.4 BETA-CARIOFILENO: ORIGEM, EFEITOS BIOLÓGICOS E MECANISMOS DE AÇÃO.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. HIPÓTESE.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 OBJETIVO GERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1 ANIMAIS.....	29
5.2 FÁRMACOS.....	30
5.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	31
5.3.1 Implantes tumorais.....	31
5.3.1.1 <i>Modelo de adenocarcinoma de Ehrlich em camundongos Swiss.....</i>	<i>31</i>
5.3.1.2 <i>Modelo de Melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6.....</i>	<i>31</i>
5.3.2 Indução da NIOX e protocolos de tratamento com BCP.....	32
5.3.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	34
5.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS.....	34
5.4.1 Avaliação da nocicepção mecânica (von Frey).....	34
5.4.2 Avaliação da nocicepção térmica ao frio (placa fria).....	35
5.4.3 Avaliação da nocicepção térmica ao calor (Hargreaves).....	35
5.4.4 Rotarod.....	35
5.4.5 Avaliação do comportamento de construção de ninho.....	35

5.4.6 Teste de nocicepção aguda e edema de pata induzidos por algóge- nos.....	36
5.5 ANÁLISES DE DANOS OXIDATIVOS E EROS.....	36
5.5.1 Processamento dos tecidos.....	36
5.5.2 Dosagem de proteína.....	37
5.5.3 Análise de produtos de lipoperoxidação (TBARS).....	37
5.5.4 Análise <i>ex vivo</i> da produção de ERO (DCFH-DA diclorofluoresceína dia- cetato).....	37
5.6 ANÁLISE DE CITOCINAS E 4-HIDROXINONENAL EM MEDULA ESPI- NHAL.....	38
5.7 HEMATOLOGIA E MARCADORES DE DANO HEPÁTICO, RENAL E MUSCU- LAR.....	39
5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
6 RESULTADOS.....	40
6.1 O TRATAMENTO COM BCP PREVINE O SURGIMENTO DA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDAS POR OXALIPLATINA.....	40
6.2 O TRATAMENTO COM BCP REVERTE A HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA POR OXA.....	41
6.3 O TRATAMENTO COM ANTAGONISTA CB ₂ (SR144528) INIBE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO MECÂNICO DO BCP EM ANIMAIS COM NIOX.....	43
6.4 O TRATAMENTO COM O AGONISTA CB ₂ GW-405833 REVERTE A HIPERAL- GESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA POR OXA.....	45
6.5 O TRATAMENTO COM ANTAGONISTA PPAR γ (GW9662) INIBE PARCIALMENTE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO MECÂNICO DO BCP EM ANIMAIS COM NIOX.....	46
6.6 O TRATAMENTO COM BCP REDUZ A NOCICEPÇÃO ESPONTÂNEA AGUDA, HIPERALGESIA AO FRIO E REDUZ O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ALGÓGENOS.....	47

6.7	O TRATAMENTO COM BCP REDUZ MARCADORES DE DANO OXIDATIVO E ERO EM MEDULA ESPINHAL.....	49
6.8	O TRATAMENTO COM BCP DIMINUI OS NÍVEIS DE IL-1 β E TNF EM MEDULA ESPINHAL DE ANIMAIS TRATADOS COM OXA.....	51
6.9	O TRATAMENTO COM BCP NÃO ALTERA O PESO DO FÍGADO, RINS, BAÇO E PESO CORPORAL E MARCADORES DE TOXICIDADE HEPÁTICA, RENAL E MUSCULAR EM ANIMAIS TRATADOS COM OXA.....	52
6.10	O TRATAMENTO COM BCP PREVINE A TROMBOCITOPENIA E NÃO ALTERA A LEUCOPENIA INDUZIDA POR OXA.....	54
6.11	O TRATAMENTO COM BCP NÃO ALTERA A EFICÁCIA ANTITUMORAL DA OXA.....	55
6.12	O TRATAMENTO COM BCP EXERCE EFEITO ANTITUMORAL EM MODELO DE MELANOMA MURINO (B16F10).....	57
7.	DISCUSSÃO.....	68
8.	CONCLUSÃO.....	66
9.	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXO.....	81
	APÊNDICES.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 TERAPÊUTICA DO CÂNCER E OS EFEITOS ADVERSOS DA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL

A neuropatia induzida por quimioterapia (NIQ) é uma morbidade relacionada ao tratamento do câncer. A frequência de indivíduos que desenvolvem efeitos adversos a quimioterapia tende a aumentar nas próximas décadas, dado que a incidência de cânceres tem aumentado ano após ano. Isso ocorre como consequência ao aumento da expectativa de vida e a adoção de hábitos de risco vivenciados na sociedade moderna, que culminam no aumento da casuística de algumas doenças, dentre elas o câncer (ZHANG *et al.*, 2020). A incidência do câncer vem aumentando a cada nova estimativa publicada. Nos dados publicados pelo *Global Burden of Disease Cancer Collaboration*, observa-se que entre os anos de 2006 e 2016 houve aumento de 28% nos casos de câncer e 8,9 milhões de mortes por câncer no mundo (FITZMAURICE *et al.*, 2018). Dados mais recentes demonstram que, entre 2010 e 2019, houve aumento de 26% na incidência de novos casos e de 20,9% na mortalidade por câncer, sendo que para 2019 foram estimados 23,6 milhões de novos casos de câncer e mortalidade de 10 milhões de indivíduos (KOCARNIK *et al.*, 2022).

Até meados de 1960, o tratamento do câncer era baseado em ressecção cirúrgica dos tumores e radioterapia. Porém, com as recorrentes observações de metástases e recidivas dos tumores, a quimioterapia passou a ter relevância no tratamento do câncer (AMJAD *et al.*, 2021). O conceito de quimioterapia foi proposto por Paul Ehrlich em 1900, definido como “uso de produtos químicos para tratar doenças” (DEVITA & CHU, 2008). A quimioterapia antitumoral teve início no século 20 com uso clínico da aminopterina e das mostardas nitrogenadas, impactando significativamente na sobrevida dos pacientes com câncer (GALMARINI *et al.*, 2012). A partir disso, vários compostos quimioterápicos foram estudados para o tratamento do câncer, focando na descoberta de drogas citotóxicas, com baixa ou nenhuma seletividade para as células cancerosas, afetando de forma importantes células saudáveis, culminando nos efeitos adversos observados no tratamento quimioterápico (SCHIRRMARCHER *et al.*, 2017).

Os efeitos adversos clássicos da quimioterapia acometem tecidos que apresentam alta taxa de proliferação, como o sistema gastrointestinal, onde induz vômito, diarreia, enjoo e inapetência; o sistema reprodutor podendo levar a

infertilidade; nos folículos pilosos, levando a alopecia; a medula óssea, causando mielossupressão e por consequência imunossupressão e predisposição a hematomas e hemorragias (SCHIRRMACHER, 2017). Alguns quimioterápicos causam efeitos adversos específicos, como é o caso da doxorrubicina, que é cardiotóxica (CHRISTIDI & BRUNHAM, 2021), da cisplatina, que é altamente nefrotóxica (MANOHAR & LEUNG) e de alguns derivados de platina, taxanos e alcalóides da vinca, que causam neuropatia periférica, a principal morbidade em nível neurológico observada no uso destes quimioterápicos (CAVALETTI *et al.*, 2019).

O uso da quimioterapia citotóxica ainda é uma das alternativas mais utilizadas na terapêutica do câncer, e tende a persistir mesmo com a evolução das terapias alvo, pois pode ser empregada de forma curativa, adjuvante, neoadjuvante ou paliativa, auxiliando no aumento da sobrevivência de indivíduos com câncer (FANGET *et al.*, 2023; TEVAARWERK *et al.*, 2021; BIRTLE *et al.*, 2020; ABASSI *et al.*, 2019). Estima-se que em 50 anos (2070) o diagnóstico de novos casos de câncer dobre em relação a 2018, acometendo cerca de 34 milhões de pessoas (SOERJOMATARAM *et al.*, 2021), tendendo assim a aumentar também o uso de quimioterápicos, dado que uma parcela considerável desses indivíduos deve ser submetida a protocolos de quimioterapia. Por consequência, a quantidade de pacientes que deve experimentar algum efeito adverso, como a neuropatia induzida por quimioterapia (NIQ) aumentará, uma vez que esta é uma das morbidades relacionadas ao tratamento do câncer que mais afeta a qualidade de vida de pacientes em quimioterapia a curto e longo prazo e é causada por classes de quimioterápicos ainda em uso clínico, como os alcalóides da vinca, taxanos e derivados de platina (CAVALETTI *et al.*, 2019). Os sintomas de neuropatia são muitas vezes negligenciados na clínica, mesmo quando afetam a qualidade de vida e segurança do paciente. Por outro lado, a ausência de intervenção aumenta a probabilidade de agravamento da NIQ (ZAJĄCZKOWSKA *et al.*, 2019). Além disso, mesmo quando identificada a NIQ, o tratamento farmacológico muitas vezes é ineficaz e baseado na terapêutica de outras neuropatias, existindo assim a possibilidade de busca de novas opções farmacológicas para controle dos sintomas da NIQ.

1.2 NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS: ASPECTOS CLÍNICOS

A NIQ é uma polineuropatia causada pelo uso de algumas classes de quimioterápicos antitumorais, sendo frequente em tratamentos com derivados de

platina, taxanos e alcalóides da vinca. Dentre os fatores que influenciam no surgimento e severidade da NIQ estão o tipo de quimioterápico utilizado, as doses, intervalos entre os ciclos de administração, uso de politerapia (em especial uso prévio de opioides), idade avançada e comorbidades como diabetes, HIV, tabagismo e etilismo (COLVIN., 2019). A NIQ pode se apresentar tanto de forma aguda quanto crônica, podendo perdurar por meses a anos após o fim do tratamento quimioterápico (CAVALETTI *et al.*, 2019). Uma das mais abrangentes revisões sistemáticas e meta-análise, realizada por SERETNY e colaboradores (2014), baseada em 31 estudos com dados de 4.179 pacientes em quimioterapia, constatou prevalência de neuropatia em 68,1% dos pacientes no primeiro mês após a quimioterapia, 60% aos 3 meses, e 30% aos 6 meses ou mais.

Dentre os indutores de NIQ, os derivados de platina requerem atenção especial, dado que podem causar neuropatia em até 70% dos pacientes, com destaque para a oxaliplatina (OXA), que pode induzir neuropatia aguda (nos primeiros ciclos) variando entre 4 a 98% dos pacientes em tratamento. Quando associada a outros fármacos, como no protocolo FOLFOX (leucovorina, fluoracil e oxaliplatina) utilizado no tratamento do câncer colorretal, foi observada incidência de sintomas de neuropatia em 71% dos participantes do estudo, e destes, 84% apresentavam algum comprometimento funcional ou na qualidade de vida até 25 meses após o cessar da quimioterapia (BURGESS *et al.*, 2021; GEBREMEDHN *et al.*, 2018; PACHMAN *et al.*, 2015-2016). Deve se levar em consideração que esses dados podem estar subestimados devido à negligência no diagnóstico clínico, pois existem estudos que demonstram diferença no percentual do diagnóstico médico para algum sintoma de neuropatia em comparação aos relatados por pacientes (BURGESS *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2017), além da subnotificação, uma falha que ainda é recorrente (DESFORGES *et al.*, 2022).

Os sintomas experienciados em pacientes que desenvolvem NIQ são: hiperalgesia, parestesia e disestesia, sensação de queimação e/ou choques elétricos e de vestir meias e luvas. Em casos mais severos, se tem relatos de dor lancinante (ZAJĄCZKOWSKA *et al.*, 2019). Sintomas motores ocorrem com menos frequência e assumem a forma de fraqueza distal, distúrbios de deambulação, perda de equilíbrio e alguns movimentos prejudicados, que podem evoluir para perda da percepção sensorial e, em casos extremos, levar à paresia, imobilização completa do paciente e incapacidade grave (ZAJĄCZKOWSKA *et al.*, 2019).

O diagnóstico da NIQ ainda não tem um padrão bem estabelecido, por se tratar de uma neuropatia de difícil obtenção de dados quantitativos. Atualmente, empregam-se avaliações objetivas e subjetivas. As objetivas são avaliações neurofisiológicas, tais como estudos de condução nervosa, os quais direcionam o diagnóstico quando observada axonopatia, a principal alteração observada em pacientes com NIQ (DESFORGES *et al.*, 2022; CAVALETTI *et al.*, 2010). As avaliações subjetivas, são baseadas nos relatos dos pacientes que, devido às dificuldades de avaliação clínica, se tornaram uma ferramenta importante para o diagnóstico da NIQ. Uma das avaliações subjetivas utilizadas é a ficha de avaliação de Critérios Comuns de Terminologia para Eventos Adversos (NCI-CTCAE), onde os médicos pontuam de 1 a 5 o grau de efeitos adversos, que incluem a NIQ (CAVALETTI *et al.*, 2007-2010). Devido às limitações dos testes objetivos e subjetivos, o uso conjunto dessas avaliações vem sendo instituída para o diagnóstico da NIQ, sendo o mais comum a pontuação total da neuropatia (TNS-Total Neuropathy Score), que se provou ser mais sensível do que o NCI-CTCAE, sendo confiável para avaliar gravidade e alterações durante a NIQ (DESFORGES *et al.*, 2022).

O diagnóstico precoce da NIQ é importante, pois o controle farmacológico pode reduzir a probabilidade de cronificação da dor induzida por quimioterápicos (ZUO *et al.*, 2003; ELLIS e BENNET, 2013). Porém, a NIQ é uma neuropatia farmacorresistente, em que poucos fármacos mostram benefícios significativos para a maior parte dos indivíduos avaliados em testes clínicos (SALAT, 2020). As terapias disponíveis para NIQ ainda são limitadas, ineficazes em muitos pacientes, e baseadas em fármacos empregados em outras neuropatias. Nenhuma estratégia foi altamente eficaz para eliminar os sintomas dessa neuropatia (QUASTHOFF e HARTUNG, 2002; NITIPIR *et al.*, 2018).

A duloxetina é um dos fármacos mais recomendados para o tratamento da NIQ, embora a eficácia apresentada em estudos clínicos não seja alta (CHOW *et al.*, 2022). Por exemplo, foi observada redução da dor associada à neuropatia induzida por paclitaxel ou oxaliplatina em 30% dos pacientes tratados com duloxetina (SMITH *et al.*, 2013). No estudo de FARSHCHIAN e colaboradores (2018), foi observada uma melhora moderada em tratamento com duloxetina em pacientes tratados com taxanos ou derivados de platina. Os mecanismos pelos quais a duloxetina apresenta efeito na redução da dor apenas em uma parte dos pacientes com NIQ ainda não foi estabelecido (SMITH *et al.*, 2013)

Tem sido descrito que o uso prévio de opioides é um fator de risco para o surgimento dos sintomas da NIQ (COLVIN *et al.*, 2019). Além disso, opioides causam tolerância a longo prazo, que pode dificultar a aplicação no tratamento da NIQ especialmente em pacientes com NIQ crônica. Apesar disso, alguns estudos demonstram efeito analgésico de opioides na NIQ. O tratamento com oxicodona reduziu em 47% a intensidade da dor em pacientes com neuropatia induzida por bortezomib (CARTONI *et al.*, 2012) e melhorou em 21% a pontuação de dor em pacientes com neuropatia induzida por diferentes quimioterápicos, e que não responderam ao tratamento com pregabalina e gabapentina (KIM *et al.*, 2018).

O uso de AINEs na NIQ é contraditório. Existe literatura demonstrando efeito benéfico, reduzindo as respostas nociceptivas em modelo animal de neuropatia induzida por paclitaxel (UEDA *et al.*, 2012). Em outro estudo, o uso de AINEs não apresentou eficácia antinociceptiva em animais com neuropatia induzida por vincristina (LYNCH *et al.*, 2004). Os estudos com AINEs na NIQ são limitados e necessitam de mais avaliações (DESFORGES *et al.*, 2022). Além de que o uso prolongado de AINEs pode acarretar uma série de efeitos adversos em diferentes sistemas, como o cardiovascular e gastrointestinal (BINDU *et al.*, 2020), sendo que a própria quimioterapia provoca efeito colateral a nível gastrointestinal, o uso de AINEs pode intensificar estes sintomas em um tratamento de longo prazo.

Pregabalina e gabapentina são fármacos muito utilizados no tratamento de diferentes neuropatias, porém na NIQ esses fármacos apresentam efeitos contraditórios em estudos clínicos; alguns estudos demonstram melhora da dor (SAIF *et al.*, 2010; MISHRA *et al.*, 2012; MAGNOWSKA *et al.*, 2018) e outros nos quais não foi observada eficácia (RAO *et al.*, 2007).

O uso de canabinoides na NIQ ainda é uma estratégia a ser explorada. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem efeito antinociceptivo do uso de canabinoides em modelo animal (BLANTON *et al.*, 2019), estudos clínicos ainda são poucos, com evidências promissoras em estudos-piloto. O uso de uma formulação contendo THC e CBD administrado por spray oral apresentou eficácia superior ao grupo placebo em pacientes com dor neuropática persistente por três meses após a conclusão da quimioterapia com paclitaxel, vincristina ou cisplatina (LYNCH *et al.*, 2014). D'ANDRE e colaboradores (2021) apresentam um relato de casos de pacientes em quimioterapia apresentando algum nível de neuropatia e observaram que o tratamento com CBD, THC ou CBD+THC por via tópica apresentou benefício frente a neuropatia em 84,6%

dos 26 pacientes do estudo. Porém, o efeito foi transitório, retornando os sintomas horas após a administração dos canabinoides. Sendo assim, a eficácia de canabinoides carece de maiores avaliações clínicas e farmacológicas, incluindo o uso de canabinoides agonistas seletivos para os receptores CB₁ e/ou CB₂, dado que grande parte dos pacientes desses estudos foram tratados com CBD, cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado.

Além dos impactos sobre a qualidade de vida do paciente, a NIQ pode exigir redução na dose do quimioterápico, aumento no intervalo entre os ciclos, ou mesmo finalização do protocolo antes do planejado, podendo comprometer significativamente o sucesso do tratamento antitumoral e reduzir a sobrevida do paciente (COLVIN., 2019). Sendo assim, a pesquisa por fármacos que tenham eficácia comprovada em uma parcela maior de pacientes e que reduzam mais significativamente os indicadores (*scores*) de dor, são necessários para a melhora da qualidade de vida e sobrevida de pacientes em quimioterapia.

1.3 FISIOPATOLOGIA DA NEUROPATIA INDUZIDA POR OXALIPLATINA

Os danos neuronais causados por quimioterápicos variam de acordo com as diferentes classes de fármacos, com as propriedades físicas e químicas específicas do fármaco utilizado, e com a posologia. Os mecanismos que induzem a NIQ, em parte, resultam dos mesmos mecanismos citotóxicos pelos quais os quimioterápicos desempenham o efeito antitumoral (ZAJĄCZKOWSKA *et al.*, 2019). Por exemplo, os taxanos induzem morte das células tumorais pela desestabilização dos microtúbulos, mesmo mecanismo que em células neuronais causa degeneração walleriana por falha no transporte axonal (ZAJĄCZKOWSKA *et al.*, 2019). A OXA, além de formar adutos de platina no DNA genômico, também forma esses adutos no DNA mitocondrial, o que leva à disfunção mitocondrial, culminando na redução da síntese de adenosina trifosfato (ATP) neuronal, além de aumentar de forma significativa os níveis de ERO, amplificando os danos neuronais (KANG *et al.*, 2021).

A OXA é o quimioterápico padrão ouro no tratamento do câncer colorretal e das metástases em consequência desse câncer (RANIERI *et al.*, 2019), sendo a NIOX um dos efeitos adversos mais prevalentes em pacientes com câncer colorretal tratados com OXA. A NIOX pode ser observada de forma aguda já no primeiro ciclo de tratamento, assim como pode cronificar com a continuação dos ciclos de quimioterapia (KANG *et al.*, 2021). Como observa-se na Figura 1, alguns mecanismos em particular

são responsáveis pelos sintomas agudos, como é o caso da alteração das propriedades funcionais dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem, provocadas pelos metabólitos do oxalato presente na OXA (KANG *et al.*, 2021).

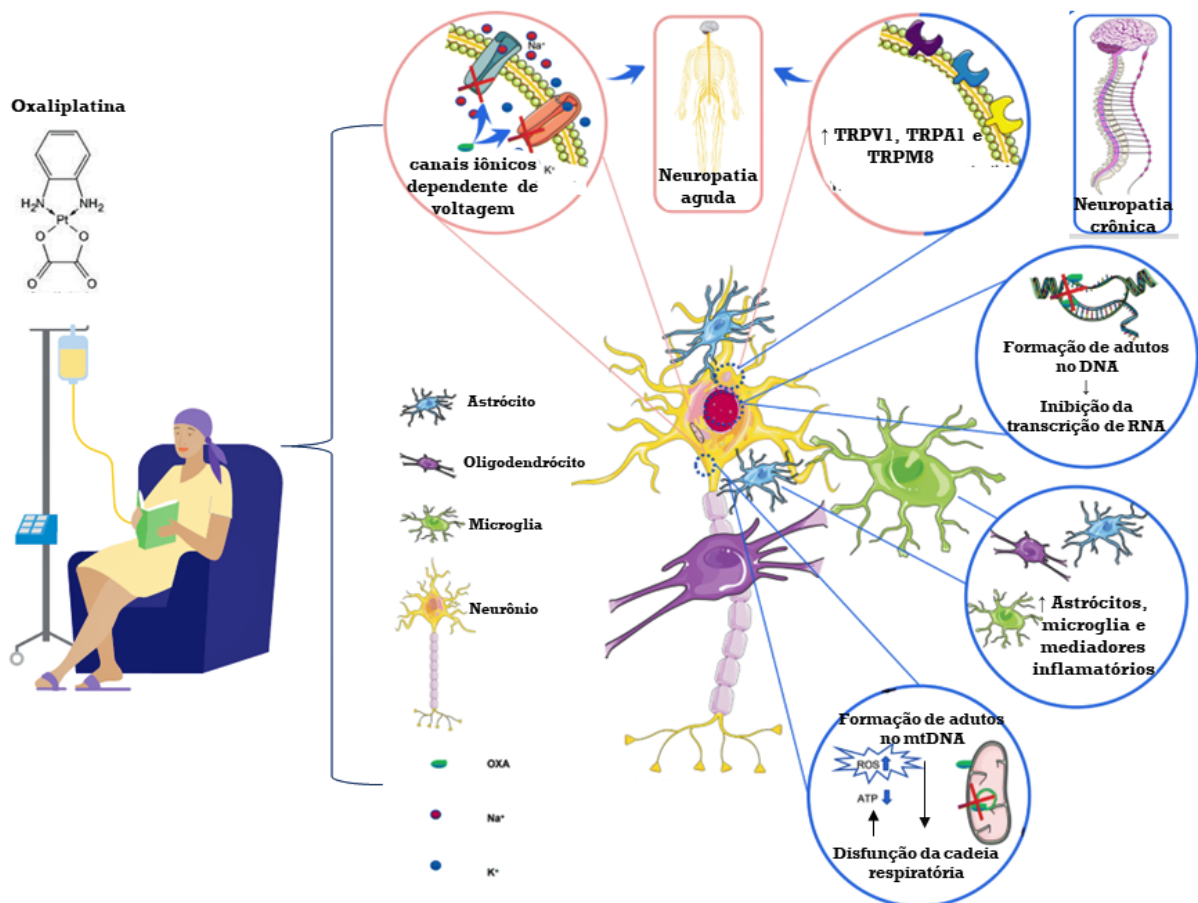


Figura 1. Mecanismos envolvidos na NIOX. Após a infusão de oxaliplatina ocorre bloqueio de canais iônicos dependentes de voltagem, e modulação de receptores da família TRP que participam principalmente na neuropatia aguda (círculos em rosa), mas também na neuropatia crônica (círculos em azul). Na cronificação da NIOX também há participação de danos ao DNA genômico e mitocondrial, que por consequência leva ao aumento de EROs. Os danos neuronais provocados pela OXA induzem a liberação de mediadores inflamatórios, ativando astrócitos e microglia que participam da sensibilização nociceptiva em nível de SNC (adaptado de KANG *et al.*, 2021).

Já está estabelecido o envolvimento de canais de K⁺ na NIOX, onde a hiperexcitabilidade induzida por OXA foi reduzida após a ativação de canais de K⁺ axonais (Kv7) (SITTL *et al.*, 2010) e de canais de Ca²⁺, onde o tratamento com bloqueadores dos canais de Ca²⁺ é clinicamente empregado (SIAU, 2006). Porém, na cronificação da NIOX, disfunções dos canais iônicos ainda são observadas. Em um estudo em humanos, 78% dos pacientes que desenvolveram neuropatia crônica apresentaram anormalidades nas correntes de Na⁺ (KRISHNAN *et al.*, 2005).

Também estão envolvidos nos processos agudos da NIOX os receptores de potenciais transitórios (TRPs), pois o tratamento com OXA resulta na regulação positiva do mRNA do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1), receptor de potencial transitório A1 (TRPA1) e do receptor de potencial transitório subfamília M membro 8 (TRPM8) em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) *in vitro*. Já foi observado *in vivo* que a alodinia ao frio está relacionada ao aumento na sensibilidade e expressão de TRPM8 e TRPA1, em camundongos (GAUCHAN *et al.*, 2009). A expressão de TRPM8 aumentou significativamente em 3 dias após a injeção de uma dose terapêutica de OXA, aumentando conseqüentemente a sensibilidade ao frio (GAUCHAN *et al.*, 2009).

Um dos fatores-chave para desenvolvimento e cronificação da NIOX é a formação dos adutos de platina no DNA, que ocorre amplamente em neurônios do DRG. É sabido que há correlação entre dano provocado por adutos de platina no DNA e a severidade da neuropatia (TA *et al.*, 2006). O dano ao DNA inibe a transcrição de RNA, que inviabiliza várias funções neuronais além de ativar vias apoptóticas. O dano ao DNA também ocorre em nível mitocondrial, onde a inibição da transcrição e da replicação do DNA, provocam disfunção mitocondrial, levando à interrupção da cadeia de transporte de elétrons, reduzindo a síntese de ATP e, por conseqüência a energia disponível para manutenção da atividade neuronal, além da superprodução de ERO, que é um fator importante no desenvolvimento e cronificação da NIOX (KANG *et al.*, 2021).

Os danos provocados pelas ERO originados principalmente pela disfunção mitocondrial, são de grande relevância para a severidade e cronificação da NIOX. Em um recente trabalho do nosso grupo, observamos que em camundongos o tratamento com OXA provoca aumento da lipoperoxidação, bem como da produção de ERO gerais e do ânion superóxido em medula espinhal de camundongos. O tratamento com diferentes antioxidantes foi capaz de reduzir a lipoperoxidação e a produção de ERO, além de reduzir a hiperalgesia induzida pela OXA, demonstrando assim um papel importante do dano oxidativo no desenvolvimento da NIOX (AGNES *et al.*, 2021).

No que se refere a sinalização nociceptiva, as ERO são relatadas como moduladores de TRPA1. Além de ser considerado um sensor de estresse oxidativo, também atua na sinalização de estímulos frios. O peróxido de hidrogênio é uma ERO que já foi associada com a capacidade da OXA de produzir hipersensibilidade

mecânica e ao frio agindo sobre TRPA1. O efeito da OXA em TRPA1 parece ser indireto, tendo participação dos subprodutos do estresse oxidativo (BESSAC *et al.*, 2008; KARASHIMA *et al.*, 2009; DEL CAMINO *et al.*, 2010). Dessa forma, é possível inferir que as ERO participam tanto no dano celular quanto na sinalização nociceptiva na NIOX.

Outro fator crucial para o desenvolvimento e cronificação da NIOX é a neuroinflamação em resposta aos danos neuronais provocados pela OXA. A literatura demonstra de forma concreta que a quimioterapia regula positivamente os níveis de mediadores pró-inflamatórios (MCLEARY *et al.*, 2019). Em uma análise de expressão gênica realizada em camundongos, foi observado que a OXA regula genes associados à função neuronal e a resposta inflamatória (STAROBOVA *et al.*, 2019). Já é bem estabelecido que a OXA induz neuroinflamação na periferia, onde aumenta a atividade de macrófagos no DRG que contribui de forma fundamental para o desenvolvimento da NIOX (TSUBOTA *et al.*, 2019). Também foi observado que a OXA leva ao aumento de TNF, IL-1 β e IL-6 e diminuição de IL-10 no DRG de ratos (LI *et al.*, 2017). Sabe-se que mastócitos liberam mediadores inflamatórios que participam da inflamação neurogênica (GREEN *et al.*, 2019). Nesse contexto, foi demonstrado que a OXA aumenta a quantidade e a degranulação de mastócitos, induzindo hiperalgesia mecânica, em camundongos com deficiência de mastócitos a hiperalgesia mecânica não foi observada após a injeção de OXA (SAKAMOTO *et al.*, 2016).

Existem evidências de que a OXA também induz neuroinflamação em nível de SNC, principalmente na medula espinhal, e que a redução da neuroinflamação reduz significativamente a nocicepção. Sabe-se que a OXA induz aumento da ativação da micróglia e astrócitos (MANELLI *et al.*, 2013a; MANELLI *et al.*, 2013b), aumenta os níveis de TNF, IL-1 β e IL-4 e diminui IL-10 em medula espinhal de ratos (JANES *et al.*, 2015). Nosso grupo demonstrou que, em camundongos, o tratamento com OXA aumentou os níveis de TNF e IL-1 β em medula espinhal. Ainda, quando realizado tratamento com OXA em animais nocaute para TLR4^{-/-} e nocaute de caspases 1/11^{-/-}, tais vias de sinalização participaram da resposta inflamatória, dado que os níveis de TNF e IL-1 β reduziram significativamente em comparação com os animais selvagens (AGNES *et al.*, 2021). Por fim, os animais nocautes não apresentaram alodinia mecânica induzida por OXA, sugerindo que a neuroinflamação é fundamental para o

surgimento das alterações comportamentais nociceptivas em camundongos tratados com OXA.

1.4 BETA-CARIOFILENO: ORIGEM, EFEITOS BIOLÓGICOS E MECANISMOS DE AÇÃO

Dada a relevância da inflamação e estresse oxidativo na NIOX, intervenções para reduzir a neuroinflamação e ERO, que possam ser empregadas a longo prazo, podem ser úteis para o controle da NIOX. Neste sentido, o Beta-Cariofileno (BCP) é um fitoquímico promissor, dado que apresenta efeito anti-inflamatório e sobre a modulação redox.

O BCP é um sesquiterpeno bicíclico de origem natural, que pode ser obtido de plantas como a cannabis, alecrim, lúpulo, pimenta-do-reino, lavanda, canela, gengibre, além de uma variedade de outras plantas. Diversos óleos essenciais apresentam concentrações relevantes de BCP, sendo um dos responsáveis pelos efeitos farmacológicos de alguns desses compostos (MACHADO *et al.*, 2018). Os sesquiterpenos são metabólitos secundários de plantas, altamente lipofílicos, que atravessam facilmente membranas celulares e apresentam potenciais efeitos biológicos em animais. Já foram relatados diferentes efeitos farmacológicos com uso de sesquiterpenos, dentre eles modulador redox, anti-inflamatório e antitumoral, descritos inclusive em estudos com o BCP (GERTSCH *et al.*, 2008).

Além de ser uma molécula de baixo custo de extração, o uso do BCP é aprovado por organizações como FDA (Food and Drug Administration) e pela EFSA (European Food Safety Authority) para uso em cosméticos, como intensificador de sabor e nutracêutico, dada a segurança e baixa toxicidade (FRANCOMANO *et al.*, 2019). No Brasil, o BCP consta na composição de algumas plantas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, assim como está presente em óleos essenciais de algumas plantas, sendo esses especificados na RDC nº2 de 15 de janeiro de 2007 (ANVISA., 2021, ANVISA., 2007).

Sobre parâmetros farmacocinéticos do BCP, no estudo de HE e colaboradores (2017), após a administração i.v de BCP (5, 10 e 20 mg/kg) em ratos, a concentração plasmática máxima apresentou aumento dose-dependente, assim como aumentou a área sob a curva (AUC). Após administração oral de 100 mg/kg de BCP em ratos, a concentração plasmática máxima foi de 307 ± 275 ng/mL, o tempo de meia-vida de 93.0 ± 74.6 min e o *clearance* de 16.0 ± 8.3 L/min/kg. Em cães, após administração

de 20 mg/kg i.v de BCP, foi observado que a concentração plasmática máxima atingiu 13143 ± 2212 ng/mL e o tempo de meia-vida foi 48.3 ± 17.1 min; quando administrado por via oral, o BCP (100 mg/kg) atingiu a concentração plasmática máxima de 95 ± 88 ng/mL e o tempo de meia-vida foi 42.0 ± 21.6 min (HE *et al.*, 2017). Após uma dose de 100 mg/kg (v.o) de BCP em humanos, a concentração plasmática máxima foi de 58,22 ng/ml e não apresentou diferença entre homens e mulheres, assim como não foram reportados efeitos adversos até 24 h após a dose de BCP (MODINGER *et al.*, 2022).

O metabolismo do BCP demonstrou ter importante participação de enzimas microsossomais hepáticas. Foi observado que o BCP inibe competitivamente CYP1A2 em humanos e de forma não competitiva em ratos, ao passo que a inibição CYP3A/2B foi competitiva nas duas espécies, indicando que o BCP pode produzir interação medicamentosa (NGUYEN *et al.*, 2017). No estudo de ASAKAWA e colaboradores (1986), foram encontrados 4 metabólitos do BCP na urina de coelhos após administração oral de 2g de BCP, todos em forma de óxidos (Fig. 2).

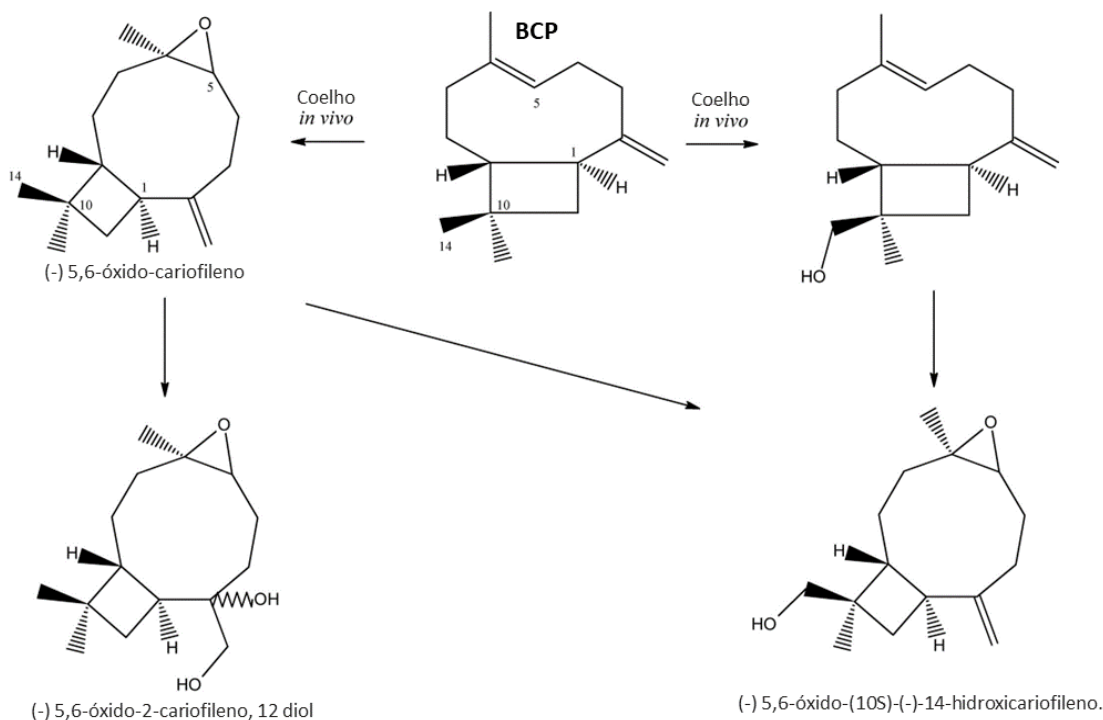


Figura 2. Estrutura do BCP e metabólitos gerados em coelhos após administração oral. O BCP é um sesquiterpeno bicíclico que após administração oral é biotransformado inicialmente em (-) 5,6-óxido-cariofileno e na sequência em (-) 5,6-óxido-2-cariofileno, 12 diol ou (-) 5,6-óxido-(10S)-(-)-14-hidroxicariofileno (Adaptado de Fidy *et al.*, 2016).

Sobre parâmetros de toxicidade, no estudo de SCHMITT e colaboradores (2016), a avaliação subcrônica da administração de BCP (150, 450 e 700 mg/kg, v.o) não demonstrou nenhuma alteração na sobrevivência, no peso e consumo alimentar, ou nos parâmetros bioquímicos avaliados; somente alterações esporádicas em plaquetas, eritrócitos e hemoglobina foram observadas. Resultados semelhantes foram observados em ensaio de toxicidade aguda e com doses repetidas em camundongos, onde as doses de 300 e 2000 mg/kg de BCP administradas oralmente não induziram nenhum efeito adverso (SILVA OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Dentre os mecanismos farmacodinâmicos propostos para o BCP, existem evidências concretas de ligação ao receptor canabinoide tipo 2 (CB₂), no mesmo sítio de ligação CP55,940 (GERTSCH *et al.*, 2008). Os receptores CB₂, são expressos majoritariamente em células imunes/inflamatórias, e os níveis de expressão do mRNA do CB₂ apresenta variações, onde a ordem de classificação dos níveis de mRNA CB₂ está nessa sequência: células B, células NK, monócitos/macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares, células T8, células T4 (GALIEGUE *et al.*, 1995). O receptor CB₂ também foi descrito no SNC em células microgliais, vasos sanguíneos e alguns neurônios (LELEU-CHAVAIN *et al.*, 2012).

Os receptores CB₂ são constituídos por sete domínios transmembranares com determinações bioquímicas e celulares da transdução do sinal das proteínas Gi/o (Fig. 3). As vias de sinalização utilizadas pelos receptores CB₂ dependem do tipo de células onde o receptor está localizado, da proteína G específica envolvida e das quinases presentes nas células (AGHAZADEH TABRIZI *et al.*, 2016). A ativação de CB₂ diminui a atividade da adenilato ciclase, reduzindo a produção de AMPc e, conseqüentemente, inibindo a proteína quinase ativada por AMPc (PKA) que, dentre suas funções, atua na modulação da resposta imunoinflamatória. Inibe canais de potássio e a expressão de alguns genes, além ativar a via Raf-1 para estimular a cascata MAPK, regulando positivamente a expressão gênica (KIRAN *et al.*, 2022; DHOPEHWARKAR *et al.*, 2014). CB₂ também ativa a via Akt/proteína quinase B, estimulando a sobrevivência, migração e crescimento celular (DHOPEHWARKAR *et al.*, 2014). CB₂ estimula a síntese “de novo” de ceramida, que pode atuar na via MAPK. De fato, os receptores CB₂ já foram demonstrados *upstream* aos três componentes principais das map cinases (MAPK), a cinase regulada por sinal extracelular (ERK), a Jun N-terminal cinase (JNK) e a p38. CB₂ também promove aumento transitório nos níveis intracelu-

lares de cálcio livre por meio de uma modulação da fosfolipase C (AGHAZADEH TABRIZI *et al.*, 2016). A ativação de CB2 também atua em canais iônicos, inibindo canais de K⁺, como consequência da inibição da PKA, ou permitindo o efluxo de K⁺ através das subunidades β e γ da proteína Gi/o, mesma via que pode inibir o influxo de Ca²⁺ (DHOPESHWARKAR *et al.*, 2014).

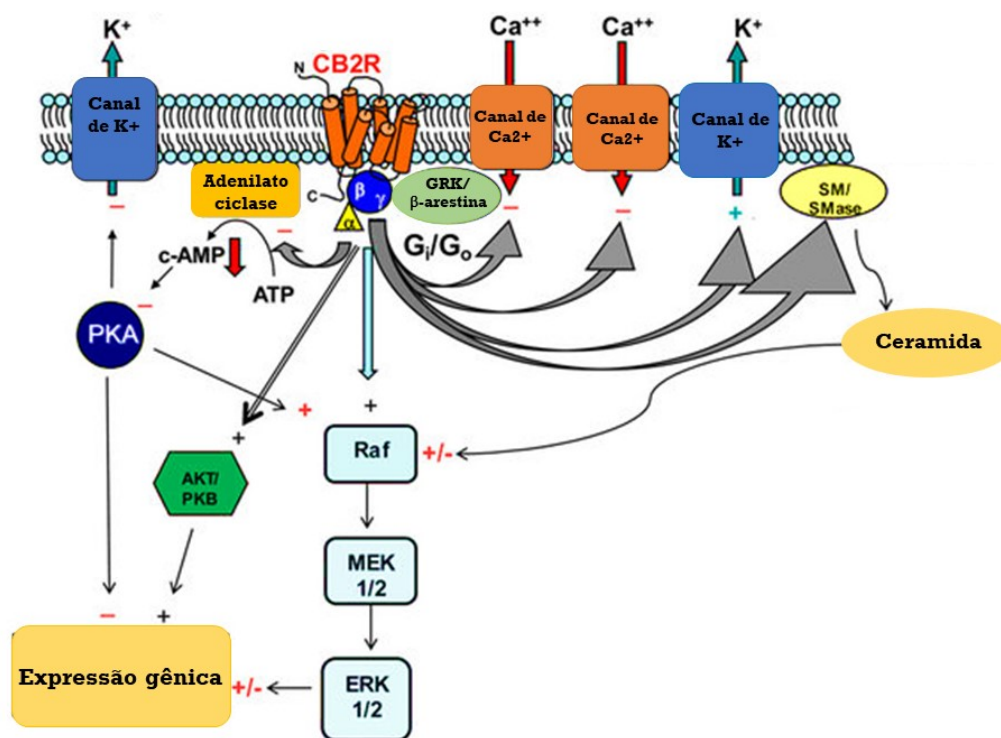


Figura 3. Vias de sinalização envolvidas na ativação de CB₂. Após a ligação de um agonista ao receptor CB₂, ocorre inibição de adenilato ciclase, e por consequência diminuição da produção de AMPc e redução na ativação da proteína dependente de PKA, culminando na inibição de canais de potássio tipo A e inibição da expressão de alguns genes. A ativação de Akt/proteína quinase B, estimula a sobrevivência celular, migração e crescimento. A ativação da cascata da MAPK, favorece a sobrevivência celular e modulação da expressão gênica. CB₂ inibe alguns canais de cálcio, dificultando influxo de cálcio na célula e o efluxo de K⁺ via PKA e pode, também, pode aumentar o efluxo de K⁺ através das subunidades β e γ da proteína Gi/o. CB₂ estimula a síntese de novo de ceramida que atua modulando Raf-1 e por consequência MEK e ERK que atuam na regulação da expressão gênica. O recrutamento de β-arestina para o receptor CB₂ ativado, induz dessensibilização e/ou internalização do receptor e ativação potencial de sinalização específica de arrestina. A diminuição da atividade da PKA, aumenta Raf-1 para estimular a cascata da MAPK, regulando positivamente a expressão de muitos genes (adaptado de DHOPESHWARKAR *et al.*, 2014).

As consequências da ativação dos receptores CB₂ incluem ações imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antioxidantes, sem causar os efeitos psicotrópicos causados por agonistas CB₁ (HASHIESH *et al.*, 2021). Os efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios da ativação de receptores CB₂ são bem descritos na literatura. Sabe-se que a ativação desses receptores tem um papel crucial

na resposta inflamatória, pois a expressão do gene *Cnr2* ocorre majoritariamente quando as células inflamatórias estão ativadas (LELEU-CHAVAIN *et al.*, 2012), e como resultado dessa ativação observa-se redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-8 e TNF e diminuição na migração de células inflamatórias (HASHIESHI *et al.*, 2021; LELEU-CHAVAIN *et al.*, 2012).

A literatura fornece evidências de que o BCP possui efeito anti-inflamatório em estudos *in vivo*, em testes para o tratamento de diferentes patologias. Em um modelo de isquemia-reperfusão em camundongos, foi observado que o tratamento com BCP diminuiu a necroptose neuronal e a inflamação, reduzindo os níveis de TNF e IL-1 β (YANG *et al.*, 2017). ALY e colaboradores (2019) observaram que o BCP reduziu a nocicepção e os níveis de mRNA de IL-1 β , TNF e interferon- γ em modelo de neuropatia induzida por antirretroviral. Um dos poucos trabalhos avaliando o efeito do BCP em modelo de NIQ, mostra que além de reduzir a nocicepção de camundongos tratados com paclitaxel, também diminuiu o imunocontoúdo de IL-1 β e NF- κ B (SEGAT *et al.*, 2017). Também é sabido que o BCP pode interagir com TLR4. TIAN e colaboradores (2019) observaram que o tratamento com BCP em camundongos submetidos a isquemia cerebral, reduziu a ativação microglial e citocinas, efeito que, em parte, foi mediado pela inibição de TLR4.

Em relação aos efeitos na modulação redox promovidos através da ativação de CB₂, os mecanismos ainda não foram totalmente descritos. HAN e colaboradores (2009) observaram que CB₂ regula negativamente a produção de ERO em macrófagos estimulados com tioglicolato. Em um modelo de nefropatia induzida por cisplatina, o uso de um agonista CB₂ reduziu os danos renais atenuando a inflamação e o estresse oxidativo (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2010; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2016). Em um modelo de obesidade em camundongos foi observado redução na inflamação do tecido adiposo com o tratamento com um agonista CB₂, efeito relacionado com a redução de macrófagos M1 e aumento de macrófagos M2 no tecido adiposo, em um processo dependente da via Nrf2/HO-1, uma via reguladora do estresse oxidativo, demonstrando também o envolvimento de CB₂ na regulação inflamatória por uma via redox (WU *et al.*, 2020).

Existem dados demonstrando que o BCP exerce efeitos antioxidantes em estudos *in vitro* e *in vivo*. Foi observado que o BCP, nas concentrações de 0,5 e 1 μ M, exerce efeito citoprotetor em células de glioma C6 submetidas a excitotoxicidade por

glutamato, aumentando a atividade antioxidante, através da via Nrf2 dependente de CB₂ (ASSIS *et al.*, 2014). Outro estudo *in vitro* em células SH-SY5Y expostas ao MPP+, mostrou que o tratamento com BCP inibe a produção de ERO, restaurando a funcionalidade mitocondrial e os níveis do antioxidante glutaciona, efeitos também relacionados com a ativação de CB₂ (WANG *et al.*, 2018). Quando administrado em ratos, o BCP reduziu a fibrose hepática, os níveis de EROs e a lipoperoxidação de hepatócitos (CALLEJA *et al.*, 2013). Em modelo de doença de Parkinson em ratos, o tratamento com BCP reduziu a lipoperoxidação e preveniu o declínio de glutaciona no mesencéfalo (OJHA *et al.*, 2016). Em modelo de hipercolesterolemia em ratos, foi observado que, além da melhora dos parâmetros metabólicos, o BCP também aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (HARB *et al.*, 2018).

Alguns estudos avaliaram o efeito do tratamento com BCP em modelos de câncer, dado que inflamação e o balanço redox são importantes para a biologia de células cancerosas. Em um modelo xenográfico de câncer colorretal (células HCT-116) em camundongos nude, foi observado que o BCP foi eficaz em reduzir o tamanho dos tumores e a angiogênese (DAHAM *et al.*, 2021). Em um modelo de melanoma (B16F10) em camundongos, foi observado que o BCP reduziu significativamente o peso dos tumores e a metástase (JUNG *et al.*, 2015). Apesar de poucos estudos *in vivo*, existem vários estudos *in vitro* demonstrando que o BCP apresenta atividade anticâncer em diversas linhagens de células tumorais, como de mama, cérebro, melanoma, pulmão, leucemia, hepático e ósseo (BARADARAN RAHIMI *et al.*, 2022; FRANCOMANO *et al.*, 2019; FIDYT *et al.*, 2016)

Além dos efeitos via CB₂, recentemente tem sido observado que o BCP também modula receptores PPAR_γ (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos tipo gamma), entretanto o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está bem estabelecido, o *crosstalk* entre CB₂ e PPAR_γ, através da ativação da MAPK induzida por CB₂, que promove a ativação de PPAR_γ via fosforilação direta (SCANDIFFIO *et al.*, 2020; IRRERA *et al.*, 2019). Já foi observado que o efeito anti-inflamatório do BCP é dependente tanto de CB₂ quanto de PPAR_γ (YOUSSEF *et al.*, 2019; IRRERA *et al.*, 2019; BENTO *et al.*, 2011).

Esse conjunto de fatores fazem do BCP uma molécula promissora para o tratamento da NIQ, pois atua em mecanismos cruciais para o desenvolvimento da neuropatia quimioinduzida, como a inflamação e o estresse oxidativo, além de

apresentar potencial efeito antitumoral, que é um fator importante para o tratamento de uma morbidade relacionada ao tratamento do câncer.

2. JUSTIFICATIVA

A NIOX é uma morbidade relacionada ao tratamento do câncer, por muitas vezes negligenciada na clínica, pela dificuldade de diagnóstico e, quando diagnosticada, pela baixa eficácia dos fármacos disponíveis. Para melhor controle dos sintomas, diferentes mecanismos fisiopatológicos devem ser inibidos. Nesse sentido, é sabido que o BCP apresenta efeito anti-inflamatório, modulador redox e potencial ação antitumoral, sendo assim um fármaco com características relevantes para o tratamento da NIOX, dado que os mecanismos inflamatórios e o estresse oxidativo são fundamentais para o desenvolvimento e progressão dessa neuropatia. Os efeitos da quimioterapia clássica para o câncer combinada com BCP, assim como a testagem do potencial antitumoral do BCP em monoterapia, especialmente em modelos in vivo em animais imunocompetentes (singênicos/não xenográficos), são demandas importantes do campo de pesquisa dos moduladores do sistema canabinoide em câncer. Grande parte dos estudos com fármacos candidatos ao tratamento da NIQ não avalia o impacto dos mesmos sobre a eficácia antitumoral do quimioterápico, o que consideramos uma importante falha na maior parte dos estudos. Sendo o câncer a doença primária, o estudo dos efeitos dos fármacos candidatos sobre o desenvolvimento tumoral é de extrema importância para o uso clínico de um composto candidato ao tratamento de uma morbidade relacionada ao tratamento do câncer.

3 HIPÓTESE

Demonstrados os efeitos farmacológicos do BCP como anti-inflamatório e modulador redox, hipotetizamos que o tratamento com BCP em modelo de neuropatia periférica induzida por OXA irá promover efeito antinociceptivo em consequência da diminuição da neuroinflamação e redução de danos oxidativos em sítios nociceptivos. Em relação ao desenvolvimento tumoral, é esperado que o BCP além de não diminuir a eficácia antitumoral da oxaliplatina, dado que não se espera um efeito bloqueador da platinação de DNA pelo BCP, possa apresentar efeito antitumoral em tratamento monoterápico ou combinado com quimioterápico citotóxico.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antinociceptivo do BCP em modelo animal de NIOX, os mecanismos moleculares envolvidos, e a interação do BCP com a OXA sobre o desenvolvimento de tumores.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o efeito do tratamento preventivo do BCP sobre as respostas nociceptivas mecânica e térmica ao frio e calor em animais tratados com OXA;
- b) Avaliar o efeito antinociceptivo do BCP em protocolo terapêutico em animais com NIOX pré-estabelecida;
- c) Determinar a participação dos receptores CB2 e PPAR_γ no efeito antinociceptivo do BCP, utilizando antagonista de CB2 (SR144528) e PPAR_γ (GW9662) e um agonista sintético de CB2 (GW405833);
- d) Avaliar o impacto do tratamento com BCP sobre a nocicepção espontânea aguda, hiperalgesia ao frio e edema de pata induzidos por capsaicina (agonista TRPV1), AITC (agonista TRPA1) e PGE2 (mediador inflamatório).
- e) Analisar os níveis de marcadores inflamatórios e oxidativos nos tratamentos com OXA e BCP.
- f) Monitorar os marcadores bioquímicos de dano hepático, renal e muscular, e parâmetros hematológicos em animais tratados com OXA e BCP.
- g) Determinar se o BCP apresenta efeito antitumoral *per se*, e se altera a eficácia antitumoral da OXA *in vivo*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS.

Os experimentos com animais seguiram todas as premissas éticas no uso de animais de experimentação presentes nas normativas do CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal). Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo número 1670201021. Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (90 dias pp.), obtidos do Biotério Central da UFSC; camundongos da linhagem C67BL/6 fêmeas tipo selvagem (90 dias pp.), reproduzidos no Laboratório de Farmacologia Experimental - LAFEX, UFSC. Os animais foram mantidos nos respectivos biotérios para cada linhagem, em gaiolas com

cama de serragem (6-8 animais/gaiola), temperatura ambiente de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12h, com acesso livre a água e ração padrão. Ao final dos experimentos os animais foram submetidos a eutanásia por meio de anestesia com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg), seguida por exsanguinação por punção cardíaca ou decapitação. Os pontos de terminação humanizada a seguir foram seguidos ao longo dos experimentos, sendo retirados dos experimentos os animais que apresentaram um ou mais dos sinais a seguir: piloereção, presença de hematúria ou hematoquezia, sangramentos, cianose, apatia, incoordenação motora, hipolocomoção, tremores, presença de dor (escala Grimace), perda de peso acentuada ($\geq 20\%$ comparado ao peso inicial do animal no início do protocolo e em presença de outros sinais de estresse acima descritos), ulceração no tumor, volume tumoral maior que 1.5 cm^3 (5-10% do peso corporal dependendo da linhagem animal) (WHITFIELD, 2022). O cálculo do tamanho amostral para os experimentos foi realizado de acordo com Callegari-Jacques (2004), calculada com base nos dados de média e desvio padrão do parâmetro principal (Von Frey) da análise obtido de estudos prévios com o mesmo modelo, segundo a fórmula: $n1 = [(SA^2 + SB^2)/(\mu A - \mu B)^2] \times (t + u)^2$; onde: S= desvio das amostras; μ = media das amostras; SA (desvio ratos controle); SB (desvio animais tratados); μA (media animais controle); μB (media animais tratados); $\alpha = 0,05$; Poder = $1 - \beta = 0,9$ e então $\beta = 0,1$; $n0 = 10$; $t = 2,1$; $u = 1,734$.

5.2 FÁRMACOS.

Os quimioterápicos oxaliplatina (Eurofarma – São Paulo) e cisplatina (Fauldcispla; Libbs Farmacêutica LTDA – São Paulo) foram mantidos refrigerados a 4°C de acordo com as orientações do fabricante, e preparadas no dia da administração, sendo diluídos em água ultrapura esterilizada para injetáveis. O BCP (W225207; Sigma-Aldrich) foi mantido em temperatura ambiente conforme especificação do fabricante, e diluído em óleo de soja no momento da administração. O antagonista CB_2 SR144528 (SML1899; Sigma-Aldrich) e o antagonista PPAR_γ GW9662 (M6191- Sigma-Aldrich), foram dissolvidos em solução contendo 4000 μl PBS, 500 μl DMSO e 500 μl etanol (8:1:1), aliquotados (solução-mãe - 1 mg/ml) e mantidos em freezer a -20°C , descongelando e diluindo a solução em salina no momento da administração, assim como para o agonista CB_2 GW405833 (G1421 – Sigma-Aldrich). Os algógenos Capsaicina (M2028 – Sigma-Aldrich), isotiocianato de alila (W203408 – Sigma-Aldrich), foram dissolvidos em DMSO, mantidos em freezer -

20°C e diluídos em salina estéril (NaCl 0,9%) no momento da administração. Para PGE₂ (14010, Cayman Chemical), uma solução mãe de 5 mg/mL em DMSO foi utilizada para diluição em salina estéril no momento da administração.

5.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.

5.3.1 Implantes tumorais

5.3.1.1 *Modelo de adenocarcinoma de Ehrlich em camundongos Swiss.*

Para indução do adenocarcinoma de Ehrlich, uma alíquota de células foi descongelada, a viabilidade celular verificada com Azul de Tripán, e 3x10⁶ células viáveis foram inoculadas por via i.p em um camundongo Swiss fêmea para expansão das células (AGNES *et al.*, 2021). Cerca de 7 dias após o implante i.p das células, o animal foi submetido a eutanásia e o tumor ascítico foi coletado para fazer uma nova passagem i.p. Ao final da terceira passagem ascítica (7 dias pós inoculação), o tumor ascítico foi coletado, as células contadas, e 3x10⁶ células foram implantadas na quarta glândula mamária da cadeia mamária esquerda de fêmeas Swiss (90 dias pp.) com seringa de insulina (1 mL) e agulha de 22G. Os animais foram anestesiados com isoflurano/oxigênio para realização do implante. Imediatamente após a finalização dos implantes todos os animais foram reunidos em uma caixa e então randomizados em novas caixas (6 animais/caixa). Após 7 dias do implante os tumores sólidos estavam visíveis e palpáveis, sendo possível o início dos tratamentos e mensuração do volume tumoral. A mensuração do volume tumoral foi realizada com paquímetro digital, medindo o diâmetro vertical e horizontal dos tumores. Para calcular o volume tumoral, foi utilizada a fórmula: volume (mm³) = 0,52 x a² x b, onde 'a' representa o menor diâmetro tumoral e 'b' o maior diâmetro em milímetros. Os pontos de terminação humanizada dos experimentos foram os mesmos descritos acima (item 5.1).

5.3.1.2 *Modelo de Melanoma (B16F10) em camundongos C57BL/6.*

Para o modelo de melanoma murino, inicialmente uma alíquota de células da linhagem B16F10 foi descongelada e cultivada em meio DMEM (Sigma-Aldrich, cat#D5796) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion, Brasil) e solução 1X de antibiótico:antimicótico (Sigma-Aldrich; cat#A5955) para expansão das células (3 passagens). Após tricotomia e antisepsia da região do implante, 5 x 10⁶ células (GIRARDI *et al.*, 2012) foram implantadas no flanco de camundongos C57BL/6 fêmeas (90 dias pp.), com auxílio de seringa de 1 mL e agulha de 22G. Logo após o

implante das células, todos os animais foram reunidos em uma caixa para realocação de forma randomizada em grupos de 6 animais. A partir do momento em que os tumores B16F10 foram palpáveis e passíveis de mensuração com paquímetro, os tratamentos foram iniciados. A mensuração do volume tumoral foi realizada com paquímetro digital, medindo o diâmetro vertical e horizontal dos tumores. Para calcular o volume tumoral, foi utilizada a fórmula: $\text{volume (mm}^3) = 0,52 \times a^2 \times b$, onde 'a' representa o menor diâmetro tumoral e 'b' o maior diâmetro em milímetros. Os pontos de terminação humanizada dos experimentos foram os mesmos descritos acima (item 5.1).

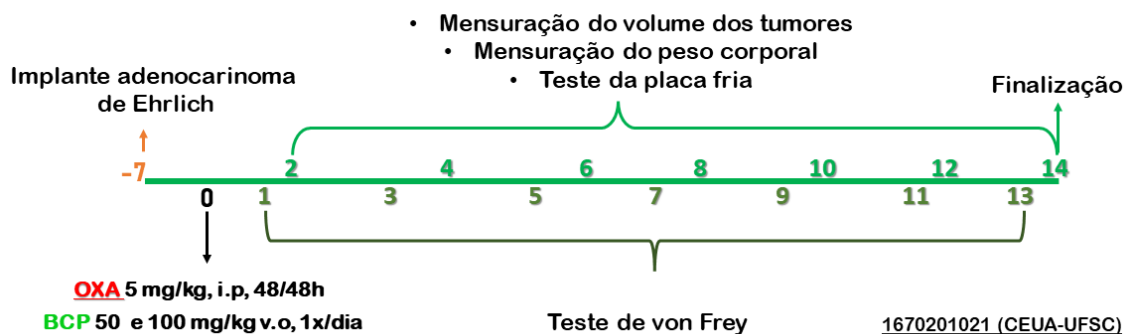
5.3.2 Indução da NIOX e protocolos de tratamento com BCP.

Para indução da neuropatia por OXA foram utilizados camundongos Swiss fêmea, ambientadas por duas semanas no biotério de alocação, e na sala de experimentação durante 3 dias por 3 h/dia. Dois dias antes da realização dos testes basais de nocicepção, os animais foram ambientados na plataforma de von Frey e na placa fria. Um dia antes do início do tratamento com OXA, foram coletados o perfil basal dos testes nociceptivos, para monitoramento de eventual variabilidade basal entre os grupos. A OXA foi administrada na dose de 5 mg/kg (AGNES *et al.*, 2021) por via intraperitoneal (i.p), com seringa e agulha de insulina (26G), a cada 48 h (7 doses: dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14), e os animais foram eutanasiados no dia 15 do protocolo. Exceto para os experimentos de nocicepção aguda, os testes nociceptivos foram sempre conduzidos antes da administração de uma nova dose de OXA, BCP ou dos agonistas/antagonistas de CB₂ e PPAR_γ utilizados.

Utilizamos dois protocolos de tratamento com BCP: I) preventivo (desenho experimental 1): iniciando a administração do BCP concomitante à administração da OXA, do dia 0 ao 14); II) terapêutico (desenho experimental 2): iniciando o tratamento com BCP no dia 6 do protocolo, ou seja, após a indução objetiva da neuropatia por OXA (tipicamente após 3 doses de OXA). Nesse modelo também foi realizada a avaliação aguda da nocicepção mecânica, durante 24 h após a primeira administração do BCP. Esta abordagem foi escolhida para reduzir o uso de animais adicionais em um experimento independente (princípio dos 3R). No protocolo terapêutico, a confirmação da indução da neuropatia foi determinada através da observação da alteração do limiar nociceptivo mecânico em teste de von Frey. O BCP foi administrado

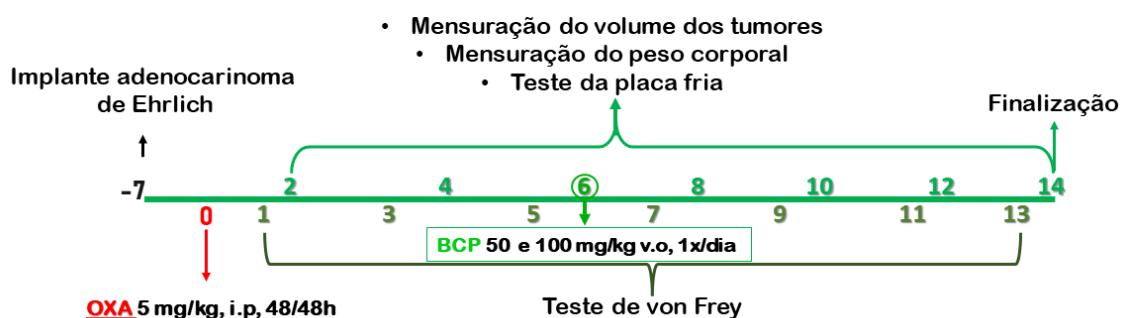
diariamente em ambos os protocolos de administração, por via oral (v.o). Quando o protocolo de NIOX foi realizado em animais com implante tumoral, o tratamento com OXA foi iniciado após ser possível palpar os tumores, cerca de 7 dias após o implante, os limiares basais foram obtidos um dia antes do início do tratamento com OXA.

Protocolo preventivo/concomitante



Desenho experimental 1. No dia -7 foi realizado o implante do adenocarcinoma de Ehrlich, que após 7 dias (dia 0) é palpável e mensurável. No dia 0 os tratamentos com OXA (5 mg/kg, i.p., 48/48h) e BCP (v.o., 1x/dia) foram iniciados. Nos dias ímpares foi realizado o teste de nocicepção mecânica (von Frey) e nos dias pares o volume dos tumores e o peso corporal foram mensurados e o teste da placa fria foi realizado. Os tratamentos e avaliações foram realizados até o 14º dia, seguindo para a eutanásia dos animais e coleta de tecidos.

Protocolo terapêutico



Desenho experimental 2. No dia -7 foi realizado o implante do adenocarcinoma de Ehrlich, que após 7 dias (dia 0) é palpável e mensurável. No dia 0 o tratamento com OXA (5 mg/kg, i.p., 48/48h) foi iniciado. Nos dias ímpares foi realizado o teste de nocicepção mecânica (von Frey) e nos dias pares o volume dos tumores e o peso corporal foram mensurados e o teste da placa fria foi conduzido. O tratamento com o BCP (v.o., 1x/dia) foi iniciado no dia 6, quando a hiperalgesia por OXA já estava evidente na avaliação de von Frey. Os tratamentos e avaliações foram realizados até o 14º dia, seguindo para a eutanásia dos animais e coleta de tecidos.

5.3.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT).

A viabilidade celular da linhagem B16F10 foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), que mede a redução do MTT à formazan, pela atividade das desidrogenases mitocondriais em células viáveis. As células foram plaqueadas e, após 24 h, foram submetidas ao tratamento com cisplatina (1, 5 e 10 μM), BCP (1, 25 e 50 μM), ou a combinação de ambos. Após o tempo de tratamento (72 h), o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados 2x com PBS, e foi adicionado 100 μL de MTT (0,5 mg/mL). Após incubação em estufa de cultivo por 1 h, a solução de MTT foi descartada e 200 μL de DMSO foi adicionado. A placa foi agitada e a leitura realizada em 560-630 nm (A560-A630) (Multileitora Infinite M200 TECAN). Os dados de viabilidade foram expressos em percentual comparado as células não tratadas (Viabilidade média= 100%).

5.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

5.4.1 Avaliação da nocicepção mecânica (von Frey).

A avaliação da nocicepção mecânica foi realizada através do teste de aplicação de filamentos de von Frey, pelo método “*up and down*” (CHAPLAN *et al.*, 1994). Inicialmente, os animais foram dispostos em câmaras de acrílico, o assoalho da plataforma é gradeado dando acesso à superfície plantar dos animais. O teste consiste na aplicação de filamentos na região intraplantar do pé direito, sendo considerada uma resposta positiva a retirada, chacoalhar ou lambe a pata estimulada. Em camundongos, iniciamos o teste com o filamento de força de 0,16 g e, em caso de resposta positiva um filamento com força menor (0,07 g) é aplicado e, em caso de resposta negativa, um filamento de força maior é utilizado (0,4 g). Foram realizadas 6 aplicações, utilizando filamentos de 0,02 a 4,0 g de força. Os resultados foram expressos em limiar de respostas positivas de 50%, e calculadas de acordo com a fórmula apresentada por Dixon (1980): $\text{limiar } 50\% \text{ (g)} = 10(X_f + k\delta)$, onde X_f representa o valor do último filamento de von Frey do teste; k representa um valor previamente tabelado (DIXON, 1980) como um padrão de respostas positivas/negativas; e δ representa a diferença média entre os estímulos (0,4498). Para análise estatística os dados foram normalizados por transformação logarítmica (\log_{10}).

5.4.2 Avaliação da nocicepção térmica ao frio (placa fria).

A avaliação da nocicepção térmica ao frio foi baseada e adaptada do protocolo de JASMIN e colaboradores (1998) e MANELLI e colaboradores (2012). O teste consiste em expor individualmente os animais durante 1 min em uma placa de gelo revestida por uma superfície plástica, medindo 22 x 12 cm de superfície e 3 cm de altura, com temperatura de superfície de 4 +/- 1 °C. Foi registrado o número de reflexos de retirada, lambida ou chacoalhar das patas dianteiras e traseiras ao longo de 1 min. Os resultados estão expressos em número de respostas por minuto.

5.4.3 Avaliação da nocicepção térmica ao calor (Hargreaves).

Para avaliar a nocicepção térmica ao calor, foi utilizada o teste criado por Hargreaves e colaboradores (1988), onde os animais foram contidos na fonte radiante de luz infravermelha, e a superfície plantar do pé direito foi posicionada sobre o ponto de emissão do feixe de luz de calor infravermelho. O tempo de permanência da superfície plantar no ponto de emissão de calor até a retirada foi automaticamente gerado pelo aparato de Hargreaves. Para tanto, foi utilizada a Intensidade de Luz Infravermelho de 35 (IR:35).

5.4.4 Rotarod.

Alterações na coordenação e função locomotora dos animais durante os tratamentos foram avaliadas no dispositivo de aceleração rotarod (EFF 412 Rota Rod; Insight Scientific Equipments, Brasil), que consiste em um cilindro giratório (haste) de 6 cm de diâmetro, com compartimentos separados de 9 cm de largura e elevados em 16 cm de altura. A velocidade do fuso foi aumentada gradativamente de 6 para 20 rpm durante um período máximo de 300 segundos, e o tempo que o animal se manteve na haste giratória foi considerado como “latência para queda” da plataforma. A sessão de treinamento foi realizada 1 dia antes de fazer a avaliação basal e iniciar os tratamentos. Os testes foram realizados nos dias 1, 7 e 14 do protocolo.

5.4.5 Avaliação do comportamento de construção de ninho (*nest building*).

O teste comportamental de construção de ninho (“nest building”) é utilizado como uma avaliação comportamental de bem-estar animal, é um comportamento inato de camundongos, que pode se encontrar alterado na ocorrência de estados de dor (JIRKOF, 2014). Os animais foram alocados em caixas individuais com cama de

serragem e 3 g de algodão em rolo compactado para ser utilizado como material para construção do ninho. O experimento foi iniciado no início do horário do ciclo escuro. Após 12 h, no início do ciclo claro, os animais foram alocados nas caixas de seus respectivos grupos. O teste foi avaliado através de escalas; 1 - mais de 90 % do algodão intacto; 2 - entre 50-90 % do algodão intacto; 3 - 50-90 % do ninho foi alterado, com vários pedaços de algodão pela caixa; 4 - 90% do algodão alterado, porém há o formato de ninho mais definido; 5 - construção de ninho quase perfeito, com laterais e cobertura do ninho estruturados (DEACON, 2006).

5.4.6 Teste de nocicepção aguda e edema de pata induzidos por algógenos.

Para avaliar o efeito do BCP sobre a nocicepção e edema de pata induzidos por algógenos, os animais foram pré-tratados com BCP (100 mg/kg v.o) durante cinco dias, sendo que no quinto dia o BCP foi administrado uma hora antes dos algógenos. Os animais foram submetidos a injeção intraplantar do agonista TRPA1, AITC (10 nmol/sítio); do agonista TRPV1, capsaicina (20 nmol/sítio); ou o mediador inflamatório, prostaglandina E2 (30 nmol/sítio), de acordo com nossos estudos prévios (AGNES *et al.*, 2021), Os algógenos foram dissolvidos em salina, como controle foi utilizada a injeção do veículo (0,03% DMSO/NaCl 0,9%). O volume da administração intraplantar foi de 20 µL/sítio. Imediatamente após a administração intraplantar do algógeno ou veículo, o animal foi colocado em uma câmara de vidro e os reflexos de lambe/chacoalhar e elevar das patas, foram registrados durante 15 min (estratificados a cada 5 min), e subsequentemente avaliados no teste da placa fria. Antes da administração dos algógenos o volume da pata foi mensurado e 30 min, 1 h e 3 h após a administração dos algógenos, o edema de pata foi mensurado com paquímetro digital posicionado verticalmente na pata do animal.

5.5 ANÁLISES DE MARCADORES DE ERO E DANOS OXIDATIVOS

5.5.1 Processamento dos tecidos.

Os tecidos foram homogeneizados no aparato Turrax X-1020, utilizando 1mL PBS 10mM + 10µL PMSF 0.1 M (inibidor de proteases) e 100 a 300 mg de tecido conforme o rendimento do órgão (fígado, rim, baço, cérebro e medula espinhal). As amostras foram então centrifugadas a 3.000 rpm, por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas em freezer -80 °C.

5.5.2 Dosagem de proteína.

O método padronizado por Lowry e colaboradores (1951) foi utilizado para a dosagem de proteínas dos tecidos. Em placas de 96 poços foram pipetados 10 µl de amostra e a curva em 6 pontos utilizando solução padrão de BSA (0 a 40 µg). Na sequência, foi adicionado em cada poço 235 µl do reativo C (tartarato duplo de Na e K⁺, sulfato de cobre, solução de hidróxido de sódio com carbonato de sódio), homogeneizado em agitador de placas durante 15 min, e então adicionado 15 µl de Folin 2N, e incubado sob agitação durante 30 min. A leitura foi realizada a 700 nm em leitora de microplacas (Multileitora Infinite M200 TECAN). Os resultados foram expressos em µg de proteína/µl de amostra.

5.5.3 Análise de produtos de lipoperoxidação (TBARS).

A lipoperoxidação tecidual foi avaliada pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras foram incubadas na presença de ácido tricloroacético 10% (TCA) para precipitação das proteínas e na sequência foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 min. 250 µl do sobrenadante foi coletado e adicionado 200 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% em cada amostra e na curva (MDA). Estas foram então incubadas a 80°C durante 40 min, produzindo, assim, uma Base de Schiff de coloração rosa, a qual foi medida a 532 nm em espectrofotômetro. Os níveis de TBARS foram expressos como nmol/mg de proteína

5.5.4 Análise *ex vivo* da produção de ERO por ensaio de DCF

A análise *ex-vivo* da produção de ERO em fragmentos de medula espinhal foi adaptada de Garré e colaboradores (2017). Ao final dos experimentos, a medula espinhal dos animais foi dissecada, e aproximadamente 50 mg de medula da região tóraco-lombar foi imediatamente fatiada em cortes transversais de 500 µm com auxílio de um fatiador de tecidos (Tissue Chopper, Campden Instruments LTD). As secções foram incubadas em placas de cultivo de 24-poços (Kasvi) contendo 500 µl de meio DMEM de alta glicose suplementado com antimicrobianos (Antibiotic: antimycotic solution, Sigma-Aldrich) durante 30 min para estabilização e lavagem dos restos celulares presentes nos tecidos, o meio foi descartado e substituído por meio fresco contendo 10 µM de DCFH-DA (diclorofluoresceína diacetato) para a detecção de ERO totais, especialmente peróxido de hidrogênio. Os tecidos foram incubados por 30 min em incubadora de CO₂ umidificada a 37 °C e, ao final, coletadas, lavadas em PBS 10

mM pH = 7, homogeneizadas em potter, e a fluorescência lida em Excitação/Emissão 485/532 nm. Os dados de fluorescência foram ponderados por mg de tecido no respectivo poço.

5.6 ANÁLISE DE CITOCINAS E 4-HIDROXINONENAL MEDULA ESPINHAL.

As quantificações de interleucina 1beta (IL-1 β) e TNF- α foram realizadas com os kits mouse IL-1beta/IL-1F2 Quantikine ELISA kit (MLB00C, R&D systems, Inc Minneapolis, EUA) e Tumor Necrosis Factor- α ELISA Kit (RAB0477, Sigma-Aldrich), respectivamente, os quais utilizam a metodologia de ELISA sanduíche. Um dia antes do ELISA, as amostras de medula espinhal foram homogeneizadas em tampão RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) com adição de PMSF (1 mM) e coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich), centrifugadas (10.000 g/10 min a 4 °C) para remoção do debris tecidual, e as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry. Inicialmente, realizou-se a incubação de 50 μ l de diluente e 50 μ l de padrões ou amostras (200 μ g de proteína/reação) por 2 h em temperatura ambiente, em um agitador de microplaca. Após lavagem da placa (3x), 100 μ L de anticorpo anti-TNF ou anti-IL-1 β foram adicionados aos poços, e incubados por mais 2 h. Após nova lavagem (3x), 100 μ L da solução de substrato foi adicionada aos poços e incubada por 10 min, seguido da adição de 100 μ l da solução de parada. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de citocina ligada, e a leitura é feita usando um leitor de microplacas (TECAN) a 450 nm corrigido em 540 nm ($A_{450nm} - A_{540nm}$). Os resultados foram calculados usando a curva padrão, normalizados pela quantidade de proteína presente nas amostras e expressos em pg de citocina/mg de proteína.

Para detecção de adutos de 4-hidroxinonenal (4-HNE) com proteínas, utilizou-se metodologia de ELISA indireto, como previamente descrito (GASPAROTTO et al., 2017). Inicialmente, 100 μ L de amostra (400 μ g de proteína/poço) foram incubadas em placas de ELISA de alta ligação (Greiner Bio-One 96-well High Binding Standard ELISA Microplates) e, após, lavadas 3x com tampão de lavagem (RABWASH4, Sigma-Aldrich). Subsequentemente, 200 μ L de anticorpo primário anti-4-HNE (Ab46545, AbCam; 1:1000) foi incubado por 2 h em temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens e anticorpo secundário anti-IgG acoplado conjugado com peroxidase HRP (1:2000) por 1 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes, e

incubadas com 100 µL do substrato TMB (RABTMB3, Sigma-Aldrich), por 10 min à temperatura ambiente, e paradas com 100 µL de HCl 2N. Os resultados foram expressos como densidade óptica (OD) a 450 nm descontado da absorção no comprimento de onda referência (540 nm) e do “branco” experimental (OD450-540nm).

5.7 HEMATOLOGIA E MARCADORES DE DANO HEPÁTICO, RENAL E MUSCULAR.

Amostras de sangue foram coletadas para realização das análises hematológicas e avaliação de marcadores de dano hepático, renal e muscular. O sangue foi coletado por punção cardíaca, e armazenado em tubos para obtenção de soro, ou em tubos contendo 70 µl de EDTA 0,1 M (pH 8,0) para obtenção de plasma. Parte do sangue foi separado para enviar ao laboratório Citovet (Florianópolis/SC) para realização do hemograma e parte foi centrifugada a 3.000 g/15min e o plasma ou soro coletado para realização de análises de metabolismo hepático (alanina aminotransferase - ALT e Fosfatase Alcalina - FAL), renal (creatinina) e de dano muscular (Creatina Quinase – CK. As análises foram realizadas com kits comerciais Liquiform (Labtest Diagnóstica, Brasil).

O princípio da análise de ALT consiste na transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, formando glutamato e piruvato, que é reduzido à lactato pela lactato desidrogenase e a coenzima NADH oxidada a NAD⁺, que é monitorada fotometricamente em comprimento de onda 340 nm. Os resultados foram apresentados como atividade da ALT (U/L).

A atividade da fosfatase alcalina (FAL) foi realizada com o kit Fosfatase Alcalina Liquiform (Labtest Diagnóstica – Brasil). A FAL do soro em pH alcalino faz a hidrólise do p-nitrofenilfosfato gerando p-nitrofenol e fosfato inorgânico, dessa forma a absorbância (405 nm) encontrada para o p-nitrofenol é proporcional a atividade da FAL. Os resultados foram expressos como atividade da FAL (U/L).

Para determinação da creatinina em plasma, foi utilizado o kit Creatinina K (Labtest Diagnóstica, Brasil), que segue o princípio de que a creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo avermelhado. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda de 510 nm em 30 e 90 segundos. Os resultados foram calculados de acordo com o fabricante e apresentados em mg/dL.

A atividade da creatina cinase (CK) foi avaliada com o kit CK-NAC Liquiform (Labtest Diagnóstica, Brasil). A CK atua na catálise e desfosforilação da creatina fosfato, produzindo ATP que reage com a glicose na presença da hexoquinase formando glicose-6-fosfato, que é oxidada pela G-6-PDH em 6-fosfogluconato e reduz NADP e NADPH. A velocidade no aumento da absorvância em 340 nm é proporcional à atividade da CK. Os resultados foram expressos como atividade da CK (U/L).

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparar vários grupos em um mesmo tempo foi utilizado o teste ANOVA de 1 via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. Diferenças entre três ou mais grupos em duas condições diferentes (ex: tempo e doses) foram analisadas por ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Bonferroni. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. Foi considerado um nível de significância de $p < 0.05$. Análises estatísticas e gráficos foram obtidos utilizando o software Prisma GraphPad®.

6 RESULTADOS

6.1 O TRATAMENTO COM BCP PREVINE O SURGIMENTO DA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDAS POR OXA.

O modelo de NIOX já foi caracterizado pelo nosso grupo utilizando a dose de 5 mg/kg de OXA por via i.p a cada 48 h (AGNES *et al.* 2021). Inicialmente realizamos o protocolo de tratamento concomitante (preventivo) de BCP com a OXA em camundongos Swiss fêmea; no dia -7 foi realizada a coleta dos dados basais dos testes nociceptivos e realizado o implante do adenocarcinoma de Ehrlich, após 7 dias do implante os tumores estavam palpáveis, possibilitando a mensuração do volume tumoral e início dos tratamentos (dia 0) com OXA e BCP, inicialmente testado nas doses de 50 e 100 mg/kg administradas por via oral (v.o) uma vez ao dia. No dia seguinte a cada administração da OXA, antes de uma nova dose do BCP, foi realizado o teste de von Frey; o teste da placa fria foi realizado nos dias 6, 10 e 14 e o teste de Hargreaves realizado no último dia do protocolo experimental (14º dia). O tratamento com BCP nas doses de 50 e 100 mg/kg inibiu o surgimento da hiperalgesia mecânica (Fig. 4A) e térmica ao frio (Fig. 4B). Não observamos diferença na avaliação da hiperalgesia ao calor (Fig. 4C).

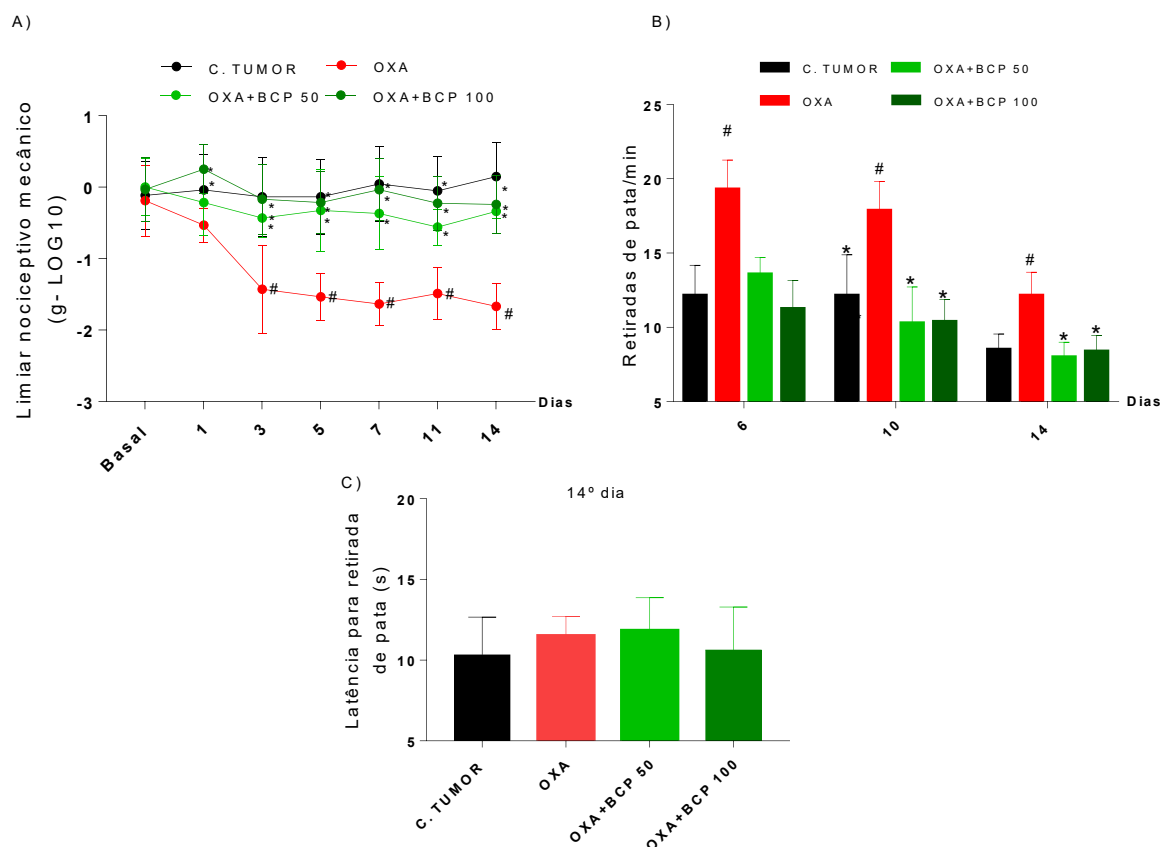


Figura 4. Avaliação nociceptiva do efeito do tratamento concomitante de OXA com BCP administrado (protocolo preventivo). Camundongos Swiss fêmea com implante do adenocarcinoma de Ehrlich foram tratados a partir do dia 0 com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) e BCP (50 e 100 mg/kg, v.o, 1x/dia) durante 14 dias, o grupo controle (com tumor) recebeu veículo. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada através do teste de von Frey (A) no dia subsequente a uma nova dose de OXA. A hiperalgesia ao frio (B) foi realizada nos dias 6, 10 e 14; e a avaliação da hiperalgesia ao calor (C) medida realizada no dia 14 do protocolo experimental. Valores representados como média \pm desvio padrão. # indica diferença estatística quando comparados ao grupo controle; * indica diferença do grupo OXA (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 8/\text{grupo}$).

6.2 O TRATAMENTO COM BCP REVERTE A HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA POR OXA.

No modelo terapêutico (pós-NIOX estabelecida), o protocolo iniciou no dia -7 com a coleta dos dados basais dos testes nociceptivos e o implante do adenocarcinoma de Ehrlich, 7 dias após o implante os tumores estavam palpáveis, possibilitando a mensuração do volume tumoral e início do tratamento com OXA. Após 3 doses de OXA (dias 0, 2 e 4), os limiares nociceptivos mecânico e térmico ao frio estavam alterados, avaliados no teste de von Frey no dia 5 (Fig. 5B). Assim, no dia 6

iniciamos o tratamento com BCP (100 mg/kg, VO, 1x/dia), e o tratamento com OXA seguiu sua posologia normal (5 mg/kg, IP, 48/48h). Observamos redução da hiperalgesia mecânica e térmica ao frio no grupo que recebeu BCP, desde os primeiros dias avaliados (dias 7 e 8); efeito que se manteve até o fim do protocolo experimental (Fig. 5A e 5B). Importante notar que os grupos “controle sem tumor” e “controle com tumor implantado”, não apresentaram perfis diferentes entre si nos testes nociceptivos, indicando que o tipo/tamanho tumoral implantado não altera parâmetros de resposta nociceptiva (Fig. 5 A-B).

Em um segundo momento, avaliamos o efeito agudo de uma dose de 100 mg/kg (v.o) de BCP no grupo de animais tratados previamente com OXA no experimento anterior (5 mg/kg, i.p, 48/48h). Após realizar a avaliação basal no teste de von Frey (12º dia), a dose de BCP foi administrada e a nocicepção mecânica foi avaliada 30 min, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h após a administração de 100 mg/kg de BCP. Observamos que o BCP reduz a hiperalgesia mecânica a partir da 3ª hora após administração (Fig 5A).

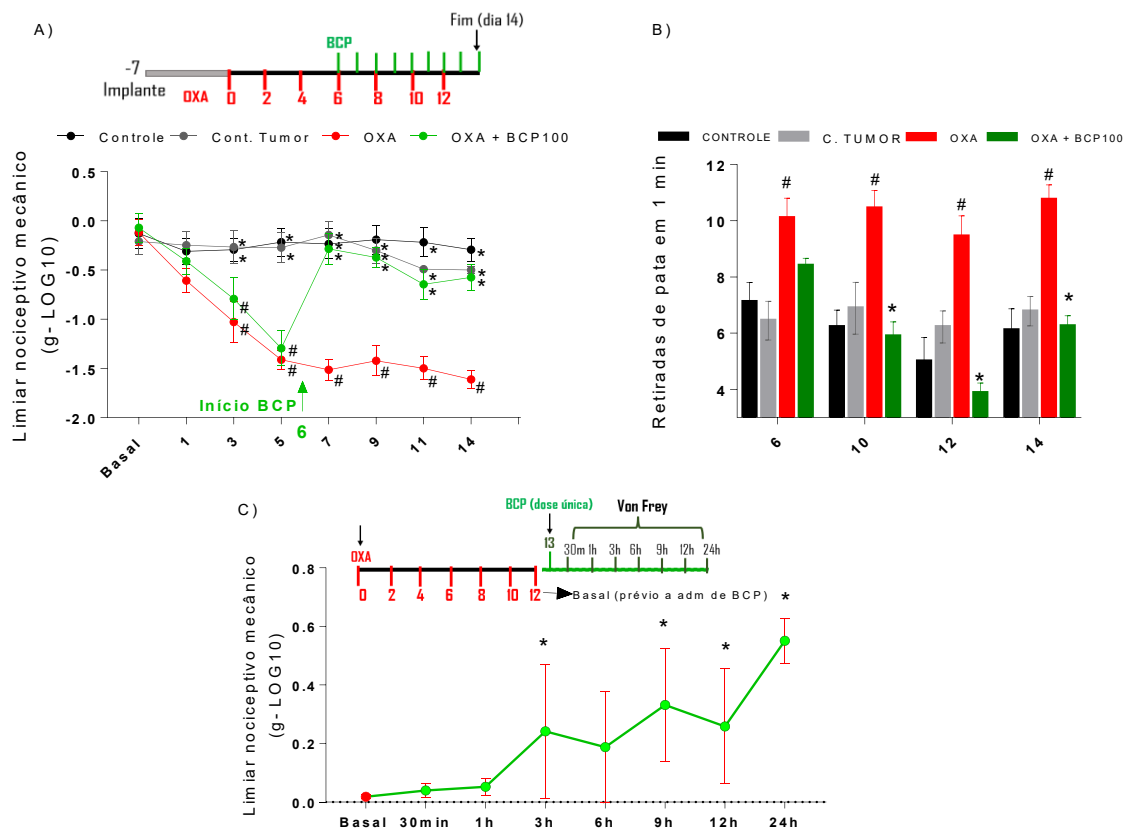


Figura 5. Avaliação nociceptiva do efeito do tratamento com BCP após a indução da neuropatia por OXA. Camundongos Swiss fêmea com implante do adenocarcinoma de Ehrlich foram tratados a partir do dia 0 com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h), até o surgimento da hiperalgesia mecânica. A avaliação da nocicepção mecânica foi realizada através do teste de von Frey (A) no dia subsequente a uma nova dose de OXA; e a nocicepção ao frio no teste da placa fria, nos dias 6, 10, 12 e 14 (B). Após a observação da alteração dos limiares nociceptivos (dia 5), foi iniciado o tratamento com o BCP (100 mg, v.o, 1x/dia) até o fim do protocolo experimental. (C) Avaliação aguda do efeito antinociceptivo mecânico do BCP em um grupo de animais tratados com OXA (5 mg/kg, i.p/ 48/48h) durante 12 dias; após a administração de uma dose única de BCP (100 mg/kg, v.o) os animais foram avaliados no teste de von frey nos tempos de: 30min, 1h,3h, 6h, 9h, 12h e 24h. Valores representados como média \pm desvio padrão. # indica diferença estatística ($p \leq 0,05$) quando comparados ao grupo controle; * indica diferença do grupo OXA. (em (A) e (B) ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$; em (C) ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni; $n=10$).

6.3 O TRATAMENTO COM ANTAGONISTA CB₂ (SR144528) INIBE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO MECÂNICO DO BCP EM ANIMAIS COM NIOX.

Realizamos uma abordagem farmacodinâmica para avaliar a participação de receptores CB₂ no efeito antinociceptivo observado no tratamento com o BCP, utilizando o fármaco SR144528 (RINALDI-CARMONA et al., 1998). O SR144528 foi descrito como antagonista CB₂, com seletividade 700 vezes maior para CB₂ versus CB₁, inibindo/revertendo os efeitos do agonista canabinoide CP55,940 na ativação da adenilato ciclase por forskolina em linhagem celular CHO superexpressando CB₂ humano (IC₅₀ = 10 nM) ou CB₁ humano (IC₅₀ > 10 μ M) (RINALDI-CARMONA et al., 1998).

Nesse protocolo experimental avaliamos o efeito do SR114528 após a indução da neuropatia. No dia 0, após a coleta dos dados nociceptivos basais, foi iniciado o tratamento com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) e, após 3 doses (von Frey do dia 5; Fig 6 A) o limiar nociceptivo mecânico já estava alterado nos grupos que receberam OXA. Iniciamos então o tratamento com o BCP (100 mg/kg, VO, 1x/dia) e BCP+SR144528 (1 mg/kg, i.p, 1x/dia, 30 min antes da administração do BCP). A dose de SR144528 foi baseada nos estudos anteriores de BELTRAMO e colaboradores (2006), em modelo de neuropatia por ligadura de nervo espinhal. Os resultados demonstram que o BCP reverte a hiperalgesia mecânica induzida por OXA e que o tratamento com o agonista inverso de CB₂ inibe a atividade antinociceptiva do BCP (Fig 6A). No teste da placa fria também observamos atividade antinociceptiva do BCP, porém, o antagonista CB₂ não inibiu o efeito do BCP sobre a hiperalgesia ao frio (Fig 6B).

Para avaliar os efeitos da OXA e do BCP sobre a higidez física dos animais, foi realizado o teste de Rotarod, que avalia equilíbrio e deambulação. Além disso, realizamos o teste de construção de ninho, que é uma avaliação que indica bem-estar dos animais; em estados de dor e doença, o comportamento de construção de ninho é reduzido. Na noite do dia -1 para o dia 0 foi realizada a avaliação basal do teste de construção de ninho, e reavaliado nos dias 7 e 14. O teste rotarod foi conduzido no último dia do protocolo experimental (14º dia). Observamos que não houve diferença entre os grupos no teste rotarod (Fig. 6D) e de construção de ninho (Fig. 6C), indicando que, mesmo em tratamento quimioterápico, que geralmente induz impactos sistêmicos, os animais apresentam o comportamento de construção de ninho que é inato da espécie, indicando bem-estar dos animais.

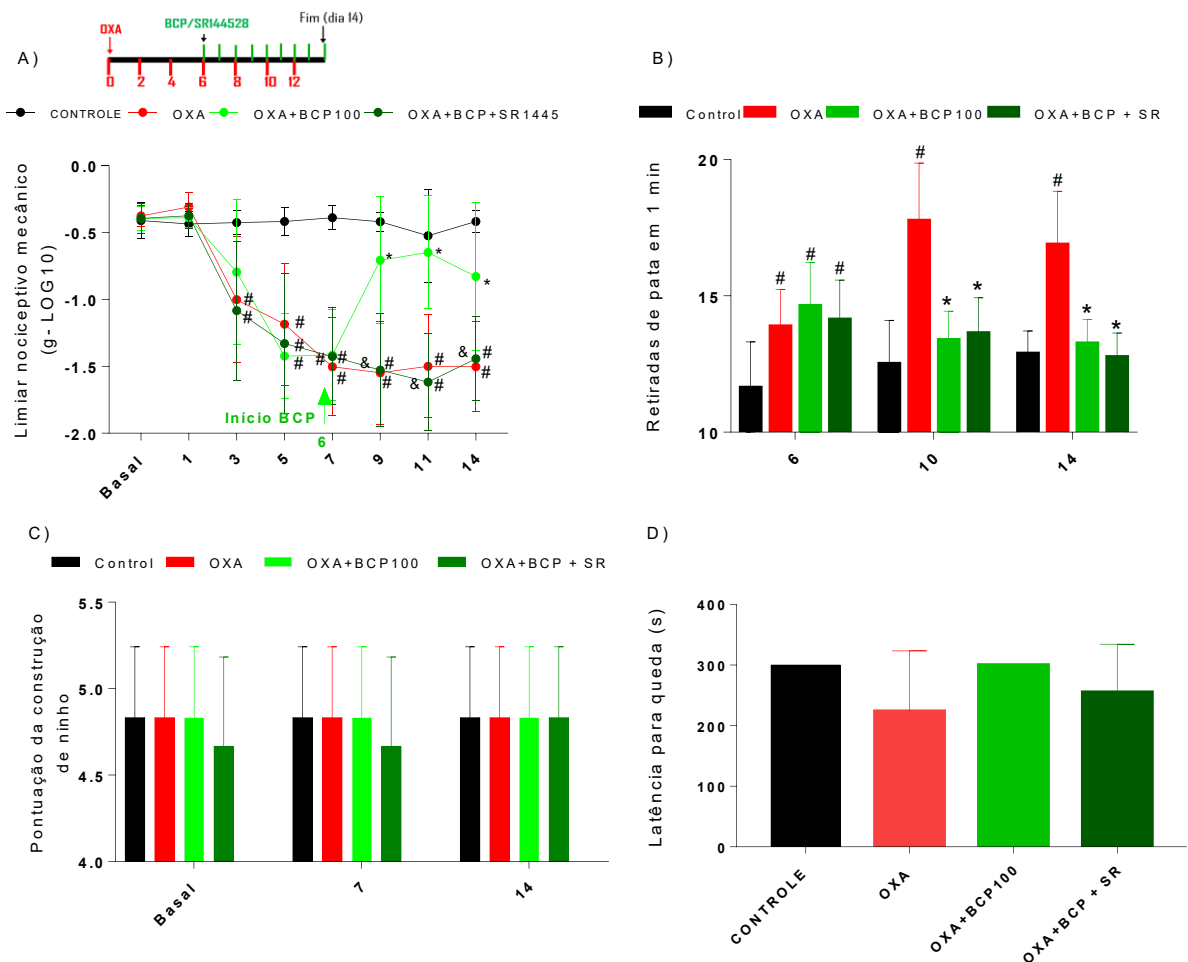


Figura 6. Avaliação do efeito do tratamento com o antagonista CB₂ SR144528 sobre os efeitos antinociceptivos do BCP no modelo de NIOX. Camundongos Swiss fêmea foram tratados com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) a partir do dia 0 e as intervenções com BCP (100 mg/kg, v.o, 1x/dia) e/ou SR144528 (1 mg/kg, i.p, 1x/dia) foram iniciadas no dia 6, após a indução da neuropatia, definida pela alteração dos limiares nociceptivos. Ao longo do

protocolo experimental, 6 animais de cada grupo experimental foram utilizados para a avaliação do comportamento de construção de ninho (C) e no último dia do experimento foi realizada a avaliação do equilíbrio e resistência física na plataforma rotarod (D). # indica diferença estatística ($p \leq 0,05$) quando comparados ao grupo controle; * indica diferença do grupo OXA; Valores representados como média \pm desvio padrão. & indica diferença do grupo BCP. Em (A), (B) e (C) foi aplicada ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni, com $n=8$ em (A) e (B) e $n=6$ em (C). Em (D) foi aplicada ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$; $n=8$).

6.4 O TRATAMENTO COM O AGONISTA CB₂ GW-405833 REVERTE A HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA POR OXA.

Após observar que um antagonista CB₂ inibe o efeito antinociceptivo do BCP, avaliamos o efeito de um agonista de CB₂ (GW405833) no modelo de NIOX. Nesse experimento no dia -1 foram coletados os dados basais do teste de von Frey e da placa fria, e no dia 0 foi iniciado o tratamento com OXA. No quinto dia do protocolo, foi observada hiperalgesia mecânica e térmica ao frio (Fig. 7 A e B) e então foi iniciado o tratamento com o GW405833 (1 mg/kg, i.p, 1x/dia). O GW405833 tem característica de agonista parcial de CB₂, e sua dose foi baseada nos estudos anteriores em modelos de dor neuropática e inflamatória (VALENZANO *et al.*, 2005). Os resultados demonstram que o agonista sintético de CB₂ foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica (Fig. 7A) e ao frio (Fig. 7B) em comparação ao grupo OXA, reforçando a participação de CB₂ na modulação antinociceptiva no modelo de NIOX.

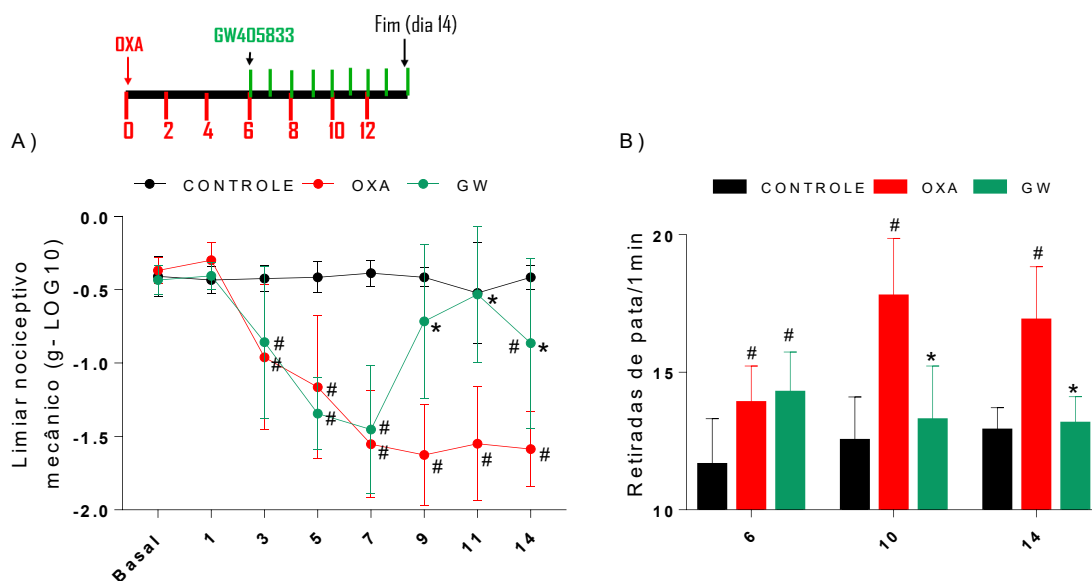


Figura 7. Avaliação nociceptiva do efeito do agonista CB₂ GW405833 em modelo de NIOX. Os animais foram tratados com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) até a indução da neuropatia, sendo então iniciado o tratamento com GW405833 (1 mg/kg, i.p, 1x/dia) avaliando a nocicepção mecânica (A) e térmica ao frio (B). # indica diferença estatística quando comparados ao grupo controle; Valores representados como média ± desvio padrão. * indica diferença do grupo OXA (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; p<0,05; n= 8/grupo).

6.5 O TRATAMENTO COM ANTAGONISTA PPAR_γ (GW9662) INIBE PARCIALMENTE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO MECÂNICO DO BCP EM ANIMAIS COM NIOX.

Alguns estudos associam os efeitos farmacológicos do BCP ao seu efeito agonista de PPAR_γ (SCANDIFFIO *ET AL.* 2020; IRRERA *et al.*, 2019). Desse modo, avaliou-se a participação de PPAR_γ no efeito antinociceptivo do BCP, utilizando o antagonista irreversível GW9662 (SEARGENT *et al.*, 2004). Em protocolo similar ao apresentado na figura 8, foi iniciado o tratamento com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) e, após 3 doses, o limiar nociceptivo mecânico já estava alterado nos grupos que receberam OXA (Fig. 8A). Iniciamos, então, o tratamento com o BCP (100 mg/kg, v.o, 1x/dia) e BCP+GW9662 (1 mg/kg, i.p, 1x/dia, 30 min antes da administração do BCP). A dose de GW9662 foi baseada no estudo de BENTO e colaboradores (2011), no qual 1 mg/kg de GW9662 inibiu o efeito anti-inflamatório do BCP em modelo de colite em camundongos. Ao avaliar os resultados, é possível observar que o BCP reverte a hiperalgesia mecânica induzida por OXA e que o tratamento com o antagonista PPAR_γ inibe apenas no dia 11 a atividade antinociceptiva do BCP (Fig 8A) e no teste da placa fria o antagonista PPAR_γ não inibiu o efeito do BCP sobre a hiperalgesia ao frio (Fig 8B).

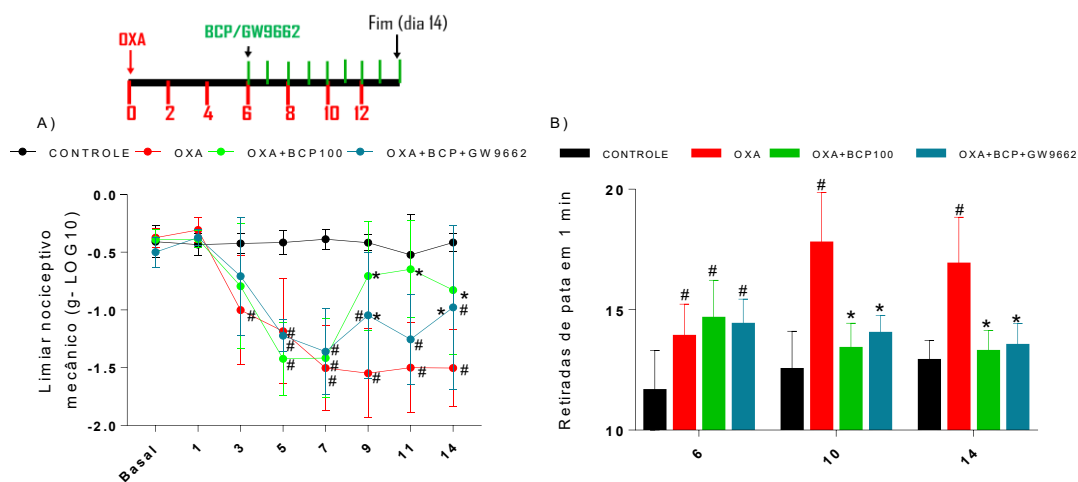


Figura 8. Avaliação do efeito do tratamento com o antagonista PPAR γ GW9662 sobre os efeitos antinociceptivos do BCP no modelo de NIOX. Camundongos Swiss fêmea foram tratados com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) a partir do dia 0 e as intervenções com BCP (100 mg/kg, v.o, 1x/dia) e/ou GW9662 (1 mg/kg, i.p, 1x/dia) foram iniciadas no dia 6, após a indução da neuropatia, definida pela alteração dos limiares nociceptivos mecânico (A) e térmico ao frio (B). # indica diferença estatística ($p \leq 0,05$) quando comparados ao grupo controle; Valores representados como média \pm desvio padrão. * indica diferença do grupo OXA; & indica diferença do grupo BCP. (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni, n=8).

6.6 O TRATAMENTO COM BCP REDUZ A NOCICEPÇÃO ESPONTÂNEA AGUDA, HIPERALGESIA AO FRIO E REDUZ O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ALGÓGENOS.

Para avaliar a participação de diferentes vias de sinalização na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (antiedematogênica) do BCP, realizamos a avaliação aguda sobre o efeito dos algógenos AITC (agonista TRPA1), capsaicina (agonista TRPV1) e prostaglandina E2 (mediador inflamatório). Os animais foram previamente tratados com 100 mg/kg de BCP (v.o, 1x/dia), por 5 dias, sendo que no quinto dia a administração de BCP foi realizada 1 h antes da administração dos algógenos. No quinto dia, foi realizada a administração por via intraplantar de AITC, capsaicina ou PGE2 e, imediatamente após a administração intraplantar, os animais foram posicionados em uma câmara de vidro, e os comportamentos de chacoalhar, lambe e elevar a pata foram contabilizados durante 15 min (estratificados de 5 em 5 min) e o edema de pata e teste da placa fria foram avaliados 30 min, 1h, 2h e 3h após a administração do algógeno.

Utilizando o agonista TRPA1 (AITC) como algógeno, observamos que o tratamento prévio com BCP é capaz de reduzir o comportamento nociceptivo espontâneo agudo durante os 15 min avaliados (Fig. 9A), de reduzir o edema de pata na 2^a e 3^a hora após administração do AITC. No teste da placa fria, o grupo que recebeu veículo (v.o) e AITC intraplantar apresentou diferença do grupo que recebeu veículo intraplantar, mas o grupo BCP não apresentou diferença em comparação ao controle veículo intraplantar (Fig. 9C). Quando administramos o agonista TRPV1 (capsaicina), observamos que o BCP reduziu o comportamento nociceptivo espontâneo agudo durante os 15 min avaliados (Fig. 9D), assim como reduziu o número de retiradas de pata na placa fria (Fig. 9F), embora não tenha apresentado diferença sobre o edema de pata em comparação ao controle veículo intraplantar (Fig.

9E). Com o uso do mediador inflamatório (PGE2) como algógeno, observamos que o BCP melhorou os três parâmetros avaliados, a nocicepção espontânea aguda (Fig. 9G), edema de pata (Fig. 9H) e o número de retiradas de pata na placa fria (Fig. 9I).

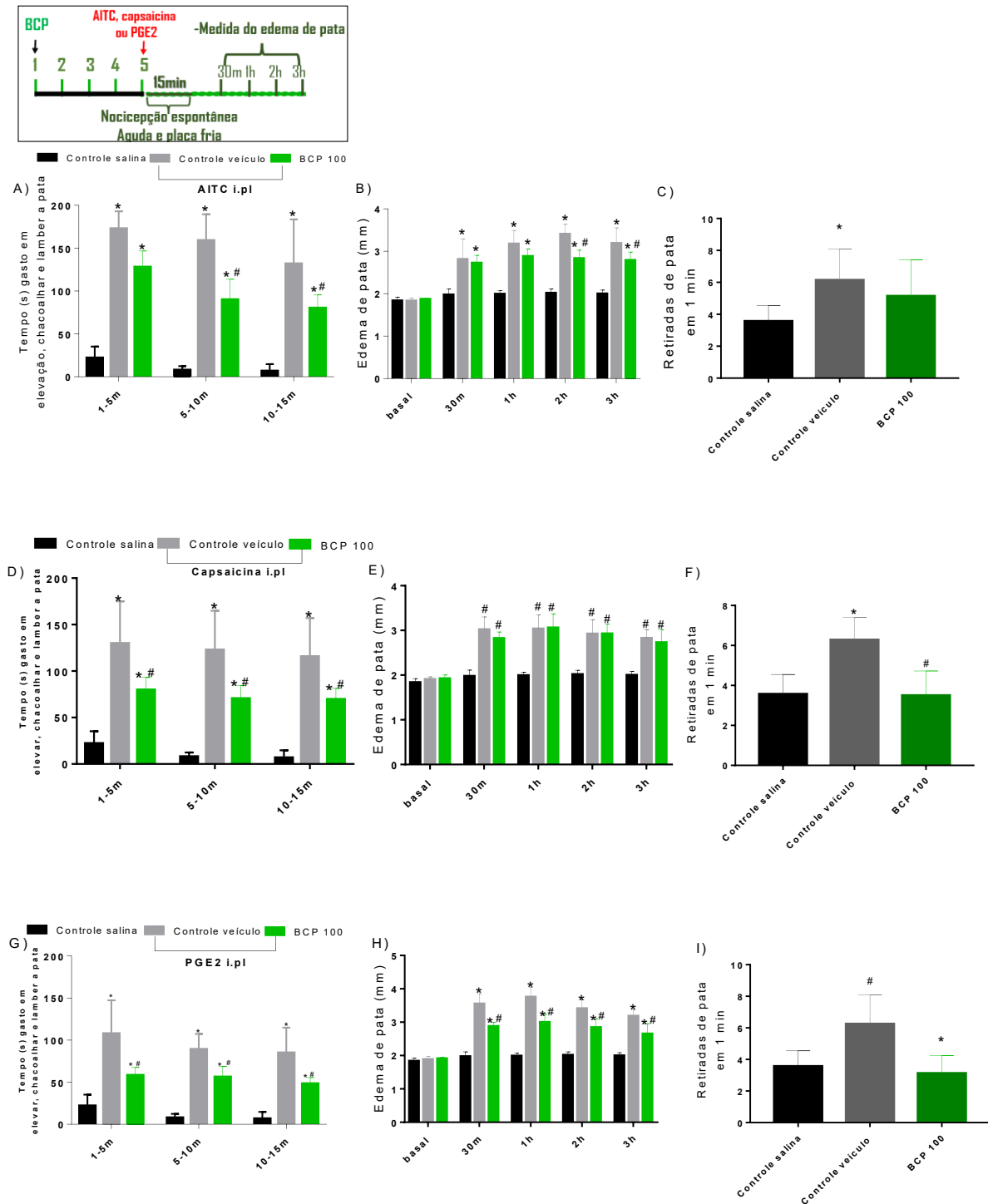
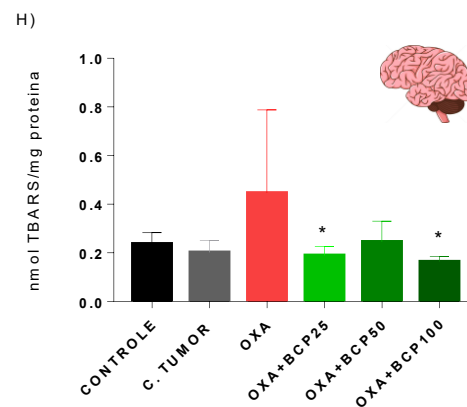
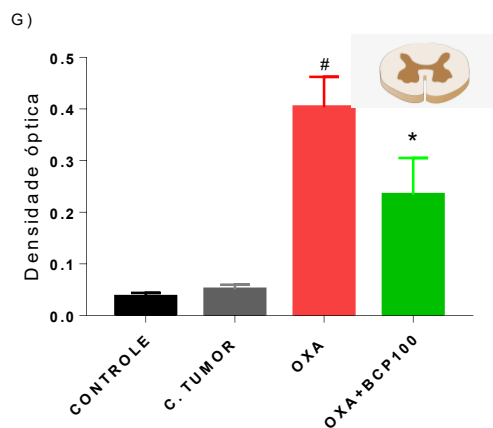
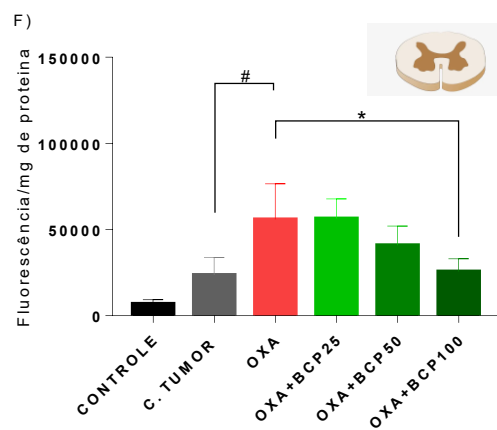
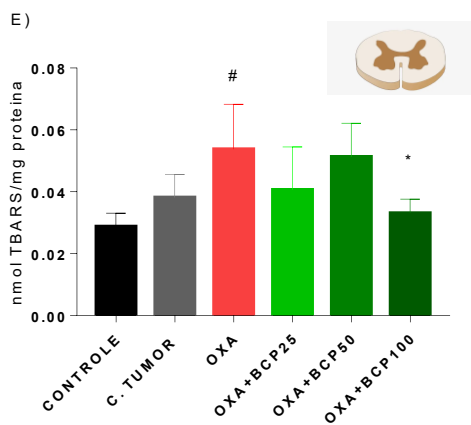
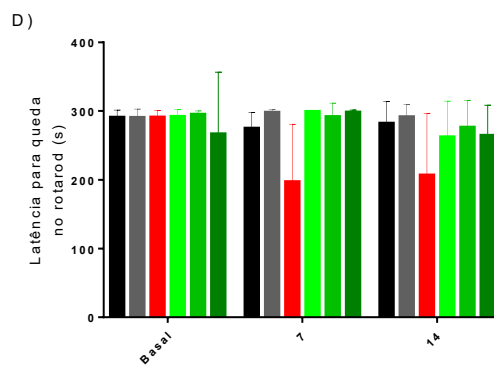
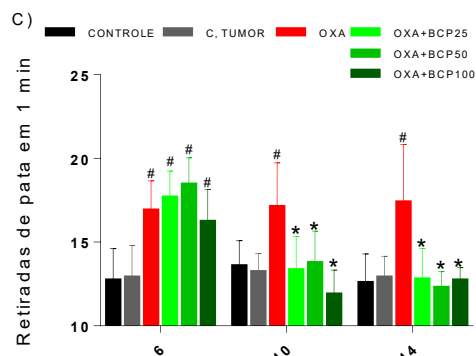
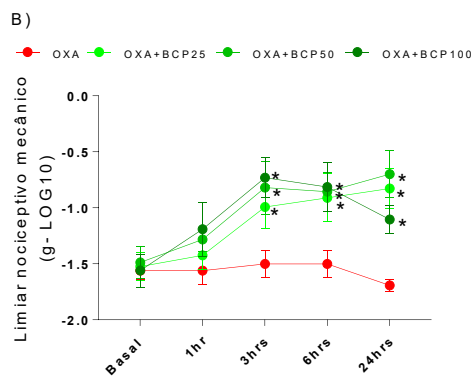
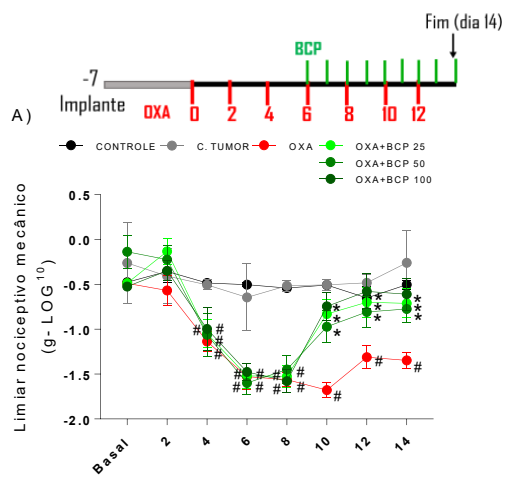


Figura 9. Avaliação dos efeitos do BCP sobre a hiperalgesia e edema da pata em um modelo de nocicepção aguda induzida por algógenos. Os animais foram previamente tratados por 4 dias com 100mg/kg de BCP e no quinto dia uma hora antes da administração intraplantar de algógenos. Avaliação da nocicepção aguda (A), edema de pata (B) e

hiperalgesia ao frio (C) induzida por AITC (alil isotiocianato); Avaliação da nocicepção aguda (D) e edema de pata (E) induzidos pela capsaicina; Avaliação da nocicepção aguda (E), edema de pata (F) e hiperalgesia ao frio (C) induzida por PGE2 (prostaglandina E2). Avaliação da nocicepção aguda (D) e edema de pata (E) induzidos pela capsaicina; Avaliação da nocicepção aguda (G), edema de pata (H) e hiperalgesia ao frio (I) induzida por PGE2. Valores representados como média \pm desvio padrão. # denota diferença estatística do grupo de controle salina; *indica diferença do grupo OXA. (nos gráficos de nocicepção espontânea aguda, ANOVA de duas vias com teste post hoc de Bonferroni; $P < 0,05$; $n = 8$ /grupo; nos gráficos de hiperalgesia ao frio ANOVA de uma via, *post hoc* de Bonferroni, $P < 0,05$; $n = 8$ /grupo).

6.7 O TRATAMENTO COM BCP REDUZ MARCADORES DE DANO OXIDATIVO E ERO EM MEDULA ESPINHAL.

Observado o fenótipo da neuropatia e o efeito antinociceptivo do BCP em 14 dias do protocolo experimental (Fig. 10A-D), no dia 15 os animais foram submetidos à eutanásia para coleta dos tecidos (fígado, rins, baço, cérebro e medula espinhal) e análise de dano oxidativo. Observamos que, na medula espinhal, a OXA aumenta a lipoperoxidação, e a dose de 100 mg/kg de BCP reduz significativamente esse efeito (Fig 10E), assim como também observamos no ensaio de diclorofluoresceína (DCF), que detecta ERO, principalmente peróxido de hidrogênio, que a dose de 100 mg/kg de BCP diminuiu a fluorescência do DCF em comparação ao grupo tratado somente com OXA (Fig 10F). Corroborando o efeito do BCP no ambiente redox da medula espinhal, por ELISA, observamos que o BCP reduz significativamente os níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE), um aldeído formado durante a lipoperoxidação (Fig. 10G). No cérebro, a OXA aumenta a lipoperoxidação em comparação aos grupos tratados com 25 e 100 mg/kg de BCP, os quais não diferem dos controles (Fig 10H). Por outro lado, os resultados em baço demonstram que todos os grupos que receberam OXA apresentam aumento na lipoperoxidação, sem diferença para os tratados com OXA+BCP (Fig 10I). Nos rins, foi observado aumento da lipoperoxidação somente no grupo tratado com OXA (Fig 10J), como já observamos anteriormente (AGNES *et al.*, 2021), e no fígado não houve diferença entre os grupos (dados não apresentados).



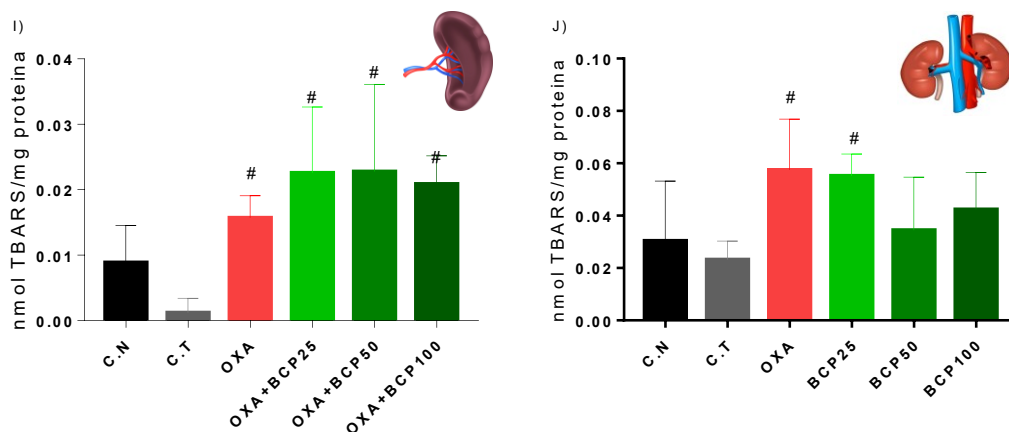


Figura 10. Avaliação de danos oxidativos em tecidos de animais tratados com BCP em modelo de NIOX. Antes da coleta dos tecidos foi realizada a caracterização do modelo de NIOX (OXA 5 mg/kg, i.p, 48/48h) em camundongos Swiss fêmea portadores de tumor e iniciado o tratamento com BCP (25, 50 e 100 mg/kg, v.o, 1x/dia); os tratamentos foram realizados durante 14 dias, onde foi realizada a avaliação da hiperalgesia mecânica aguda (B) durante 24h após a primeira administração do BCP; assim como a avaliação a longo prazo (até o final do protocolo experimental de 14 dias) da hiperalgesia mecânica (A) e térmica ao frio (C). (D) avaliação do equilíbrio e resistência física na plataforma rotarod. Ao término do protocolo experimental (15º dia) os tecidos foram coletados e então realizadas as análises de lipoperoxidação tecidual em cérebro (H), medula espinhal (E), baço (I), rins (J). Em (F) mensuração dos níveis de EROs pelo ensaio com sonda DCF em medula espinhal. (G) Mensuração dos níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) em medula espinhal. Valores representados como média \pm desvio padrão. # indica diferença estatística quando comparados ao grupo controle; * indica diferença do grupo OXA. Nos gráficos de coluna, ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, $n = 7-8$; em; nos gráficos de linha, ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 8$ /grupo.

6.8 O TRATAMENTO COM BCP DIMINUI OS NÍVEIS DE IL-1 β E TNF EM MEDULA ESPINHAL DE ANIMAIS TRATADOS COM OXA.

Sendo a atividade anti-inflamatória um dos principais mecanismos farmacológicos conhecidos do BCP, avaliamos os níveis das interleucinas IL-1 β e TNF em medula espinhal de animais tratados com BCP no protocolo após a indução da neuropatia por OXA. Após 7 dias do implante tumoral, foi induzida a neuropatia com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) em fêmeas Swiss com implante do adenocarcinoma de Ehrlich. O tratamento com BCP (100 mg/kg, v.o, 1x/dia) iniciou no dia 6, após observação da alteração dos limiares nociceptivos mecânico e térmico ao frio. Ao final do protocolo experimental foram coletadas as amostras de medula espinhal para a análise por ELISA. Observamos que a OXA induz importante aumento nos níveis de IL-1 β (Fig. 11A) e TNF (Fig. 11B) que é significativamente reduzido pelo tratamento

com BCP, inferindo assim que o BCP de fato exerce efeito anti-inflamatório em medula espinhal.

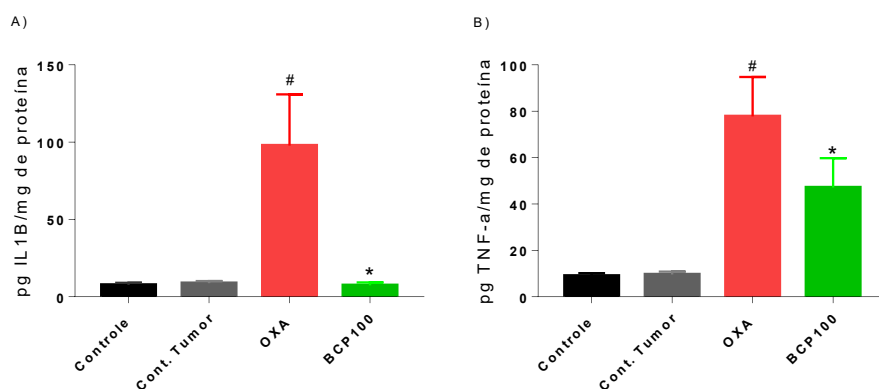


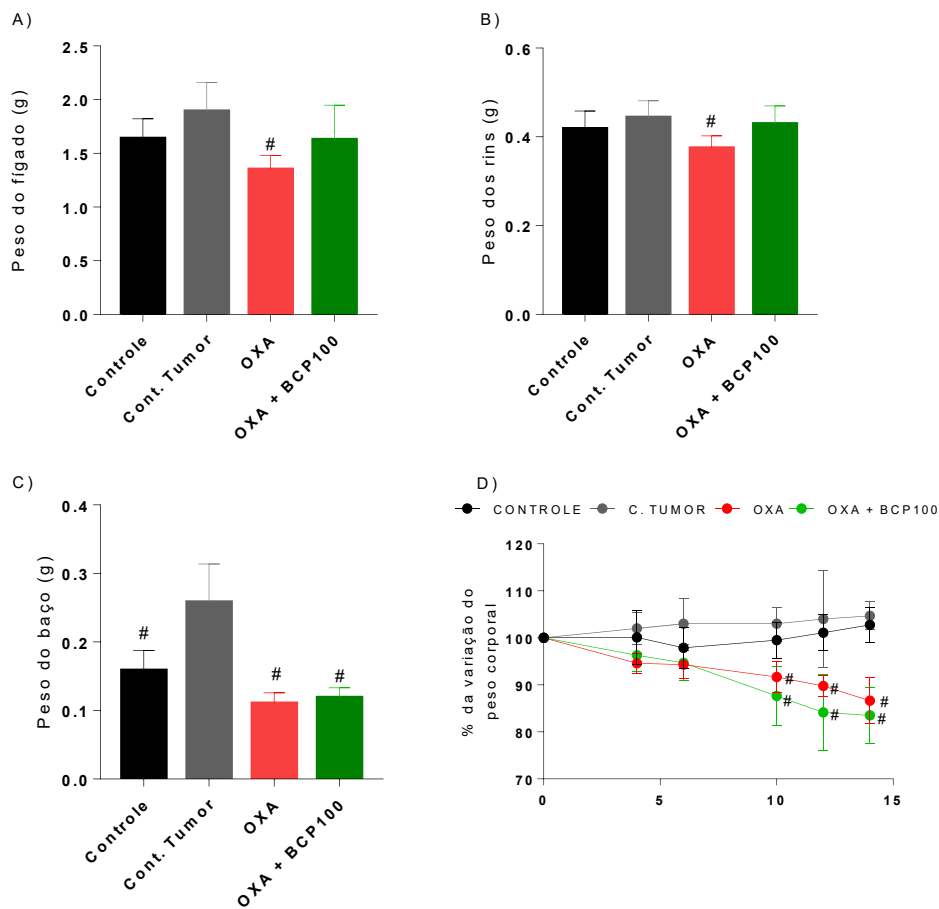
Figura 11. Mensuração dos níveis de IL-1 β e TNF em medula espinhal de animais tratados com BCP em modelo de NIOX. Após a caracterização do efeito antinociceptivo do BCP sobre a hiperálgia induzida por OXA, amostras de medula espinhal foram coletadas para quantificação de IL-1 β (A) e TNF (B). # indica diferença dos grupos controle; Valores representados como média \pm desvio padrão. * indica diferença do grupo OXA. (ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, $n = 8$)

6.9 O TRATAMENTO COM BCP NÃO ALTERA O PESO DO FÍGADO, RINS, BAÇO E PESO CORPORAL E MARCADORES DE TOXICIDADE HEPÁTICA, RENAL E MUSCULAR EM ANIMAIS TRATADOS COM OXA.

Na avaliação macroscópica dos órgãos dos animais, observamos diferença no tamanho do fígado, rins e baço dos animais tratados com OXA, e confirmamos que de fato existe diferença no peso desses órgãos. Na figura 12 observamos que o grupo tratado com OXA apresenta redução no peso do fígado (Fig 12A) e dos rins (Fig 12B) em comparação aos controles, já grupo OXA+BCP não é diferente dos controles, porém, também não difere do grupo tratado somente com OXA. Em relação ao peso do baço, observamos que o grupo com tumor não tratado, apresentou aumento significativo no peso do órgão em comparação aos grupos OXA e OXA+BCP (Fig 12C), assim como os tumores nos animais controles também são maiores (dados apresentados no tópico 6.11), indicando que há relação do tamanho e peso do tumor com o tamanho e peso do baço. Sobre o peso corporal observamos que os grupos tratados com OXA apresentaram menor variação de peso em relação ao peso inicial

em comparação aos controles e, sobre esse parâmetro, não observamos diferença entre o grupo OXA e OXA+BCP (Fig 12D).

Apesar de observar diferença no peso dos rins e do fígado, não foi observada diferença nos marcadores bioquímicos de dano hepático, avaliada por meio da atividade de ALT e FAL (Fig. 12E-F), renal, avaliada pelos níveis de creatinina (Fig. 12G), e muscular pela atividade da CK (Fig. 12H).



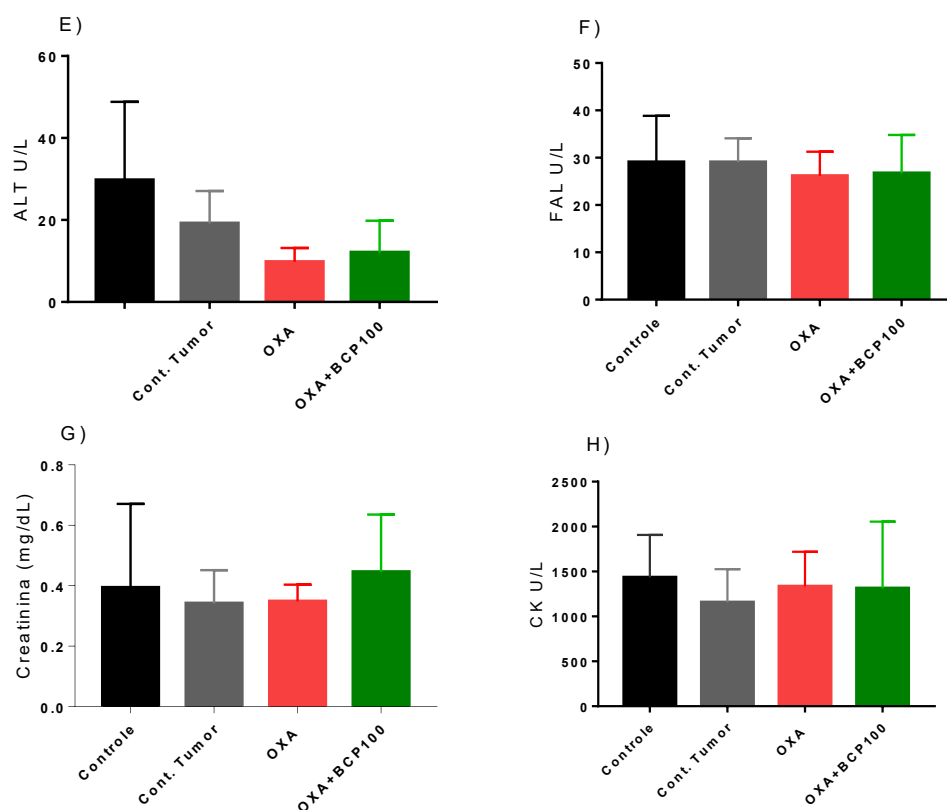


Figura 12. Avaliação da toxicologia macroscópica de órgãos e de marcadores de dano hepático, renal e muscular. Ao fim do protocolo experimental foram coletados rins, fígado, baço e sangue de camundongos Swiss fêmeas tratados com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h) e BCP (100 mg/kg, v.o, 1x/dia). Em (A) peso do fígado, (B) peso dos rins, (C) peso do baço e (D) peso corporal. A partir do soro ou plasma foram realizadas as análises bioquímicas para atividade da ALT (E), FAL (F), creatinina (G) e CK (H). Valores representados como média \pm desvio padrão. # indica diferença estatística quando comparados ao grupo controle; (nos gráficos de coluna, ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, $n = 8$; em (D) ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 8$ /grupo).

6.10 O TRATAMENTO COM BCP PREVINE A TROMBOCITOPENIA E NÃO ALTERA A LEUCOPENIA INDUZIDA POR OXA.

Para avaliação do perfil hematológico utilizamos sangue total em EDTA, a coleta do sangue foi realizada nos animais do experimento apresentado no tópico 6.4 (Fig 4C e D). Após coleta do sangue as amostras foram enviadas para o laboratório Citovet (Florianópolis-SC) onde o hemograma foi realizado. Os resultados demonstram alteração na quantidade de plaquetas (Fig. 13A) no grupo OXA e OXA+BCP+SR em relação ao controle e o grupo tratado com OXA+BCP apresentou aumento em relação ao grupo OXA, mas não em relação ao OXA+BCP+SR. Também

observamos diminuição na contagem de leucócitos totais nos grupos tratados com OXA em relação ao controle (Fig 13C), mas não houve diferença na contagem de eritrócitos (Fig 13B).

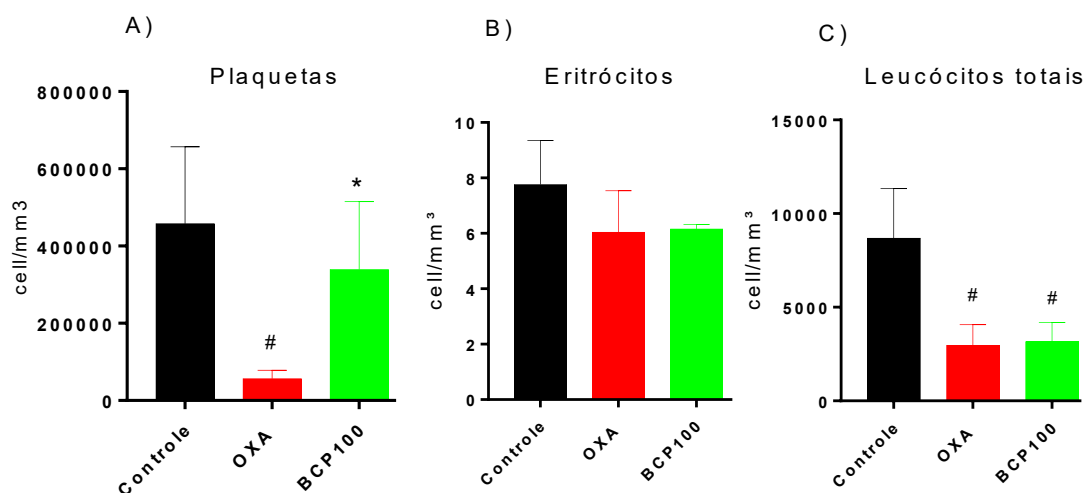


Figura 13. Hematologia de animais tratados com BCP em modelo de NIOX. O sangue total foi coletado para contagem automatizada de plaquetas (A), eritrócitos (B) e leucócitos totais (C). Valores representados como média \pm desvio padrão. # indica diferença dos grupos-controle; * indica diferença do grupo OXA. (ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, $n = 5$).

6.11 O TRATAMENTO COM BCP NÃO ALTERA A EFICÁCIA ANTITUMORAL DA OXA.

Acompanhamos, como variável secundária dos experimentos anteriores, o efeito combinado do BCP com OXA sobre o volume e peso do adenocarcinoma de Ehrlich e observamos que não há alteração da eficácia antitumoral da OXA quando administrado concomitantemente (Fig. 14 A-B) ou após a indução da neuropatia por OXA (Fig 14C-D), demonstrando que a OXA não altera a eficácia antitumoral do BCP no modelo de adenocarcinoma de Ehrlich, nas doses e regimes posológicos utilizados. Para avaliar o efeito do BCP em monoterapia sobre o desenvolvimento de tumores, no primeiro momento realizamos o implante tumoral em fêmeas Swiss (dia -7), e após 7 dias com a presença do tumor sólido, foi iniciada a administração do BCP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (VO, 1x/dia) durante 17 dias. Nesse experimento observamos que o tratamento com BCP inibiu o crescimento tumoral nas doses de 25 e 50 mg/kg,

que difere no volume do tumor em comparação ao controle; e a dose de 25 mg/kg difere no peso do tumor em comparação ao grupo controle (Fig 14 E-F).

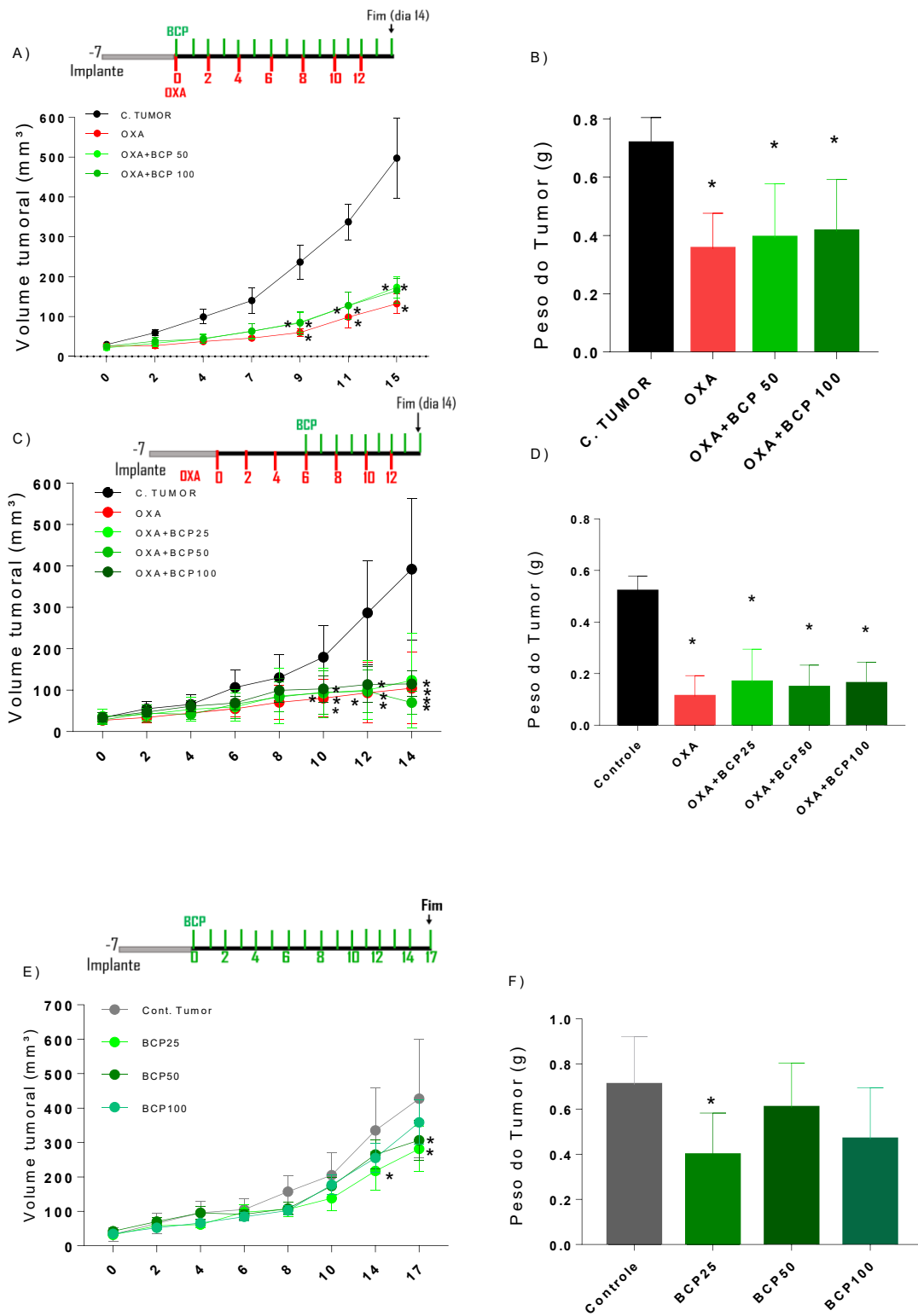


Figura 14. Avaliação da interação do BCP com OXA sobre o desenvolvimento do adenocarcinoma de Ehrlich. Após 7 dias dos implantes tumorais foi iniciada a intervenção

com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h), o efeito do BCP (10, 50 e 100 mg/kg, v.o, 1x/dia) foi avaliado em dois protocolos, iniciando concomitante a OXA, em protocolo de 14 dias de tratamento, sendo realizada a mensuração do volume dos tumores (A), ao final do experimento os tumores foram coletados e pesados (B); e no protocolo após a indução da neuropatia (C) e (D). A avaliação do efeito sobre o desenvolvimento de tumores com BCP em monoterapia foi realizada em protocolo de tratamento de 17 dias com uma dose diária de BCP (25, 50 e 100 mg/kg, v.o, 1x/dia), em (E) o volume dos tumores e em (F) peso dos tumores. * indica diferença do grupo controle. Nos gráficos de linha, ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$. Nos gráficos de coluna, ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$; em (A-D $n=8$; E, $n=7$).

6.12 O TRATAMENTO COM BCP EXERCE EFEITO ANTITUMORAL EM MODELO DE MELANOMA MURINO (B16F10).

Em outro experimento avaliamos o efeito *in vivo* e *in vitro* do BCP em células de melanoma B16F10. Para o modelo animal utilizamos camundongos fêmea da linhagem C57BL/6 que receberam o implante das células B16F10 no dia -7 do protocolo experimental; após cerca de 7 dias do implante os tumores estavam visíveis e palpáveis, iniciando no dia 0 os tratamentos com de BCP (100 mg/kg, v.o, 1x/dia), cisplatina (CDDP 1 mg/kg, i.p, 48/48h) ou a combinação de BCP e CDDP, durante o total de 8 dias. Nesse experimento, observamos que somente os grupos BCP e BCP+CDDP apresentaram diferença no volume e peso dos tumores em relação ao controle (Fig 15 A e B). No ensaio *in vitro* (Fig. 15C), utilizando as células B16F10 observamos que a CDDP nas concentrações de 1, 5 e 10 μM diminui a viabilidade celular em comparação ao controle; o BCP não reduziu a viabilidade celular em nenhuma das concentrações utilizadas (1, 25 e 50 μM); a combinação dos fármacos teve efeito aditivo/sinérgico somente na comparação entre os grupos CDDP 1 μM e CDDP 1 μM + BCP25 μM e o BCP diminuiu o efeito citotóxico da CDDP somente na comparação entre CDDP 10 μM e CDDP 10 μM + BCP 50 μM .

Na sequência realizamos um experimento avaliando a sobrevida de animais com melanoma, considerando o tempo para atingir os *endpoints* humanitários (descritos no tópico 5.3.7.2). Após o implante das células B16F10, os animais foram incluídos no experimento individualmente a partir do momento em que o tumor se encontrava palpável e mensurável com paquímetro, sendo considerado o início do tratamento no dia 0, onde foram administradas as doses de 25, 50 ou 100 mg/kg (v.o, 1x/dia). Os animais foram tratados até atingir ao menos um dos *endpoints* para o modelo, sendo então submetidos a eutanásia. Nenhum animal permaneceu no

experimento até o óbito em consequência do tumor. Na figura 15. (D) observamos que o BCP foi capaz de aumentar significativamente a sobrevivência dos animais no experimento, com significância nas doses de 50 e 100 mg/kg.

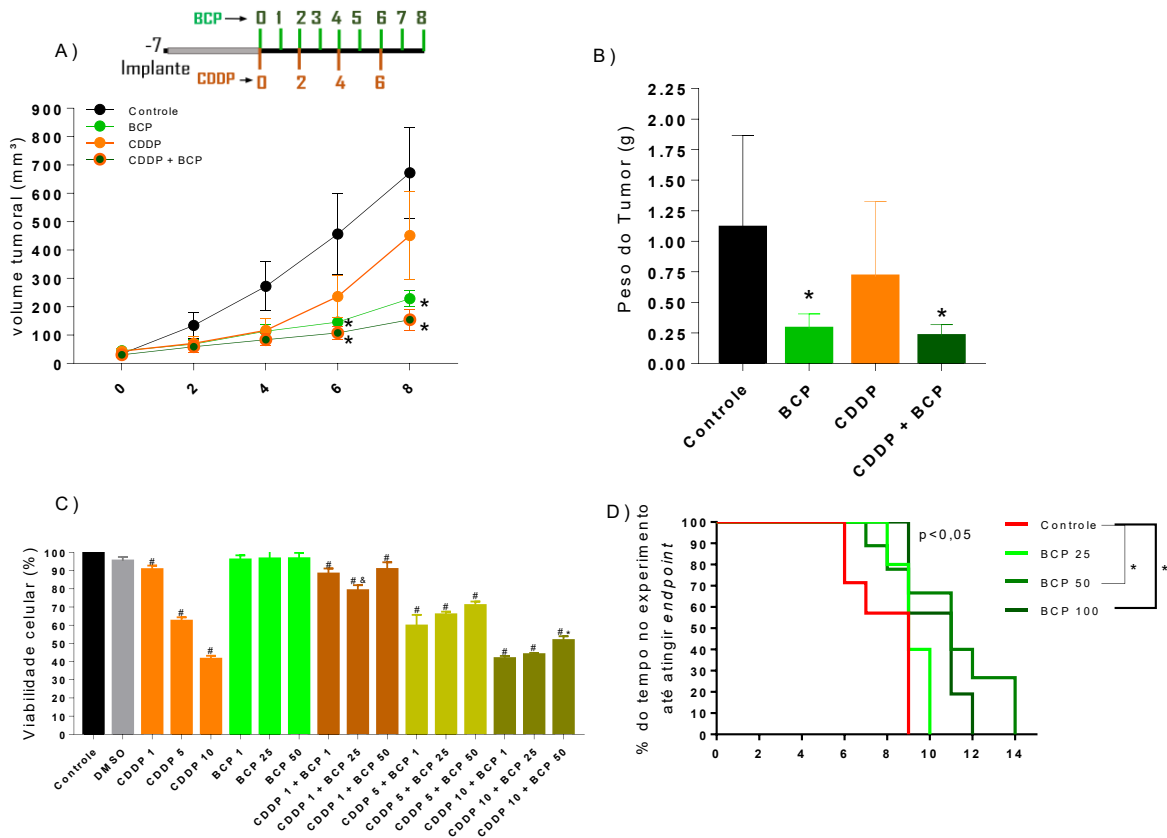


Figura 15. Efeito antitumoral do BCP em modelo de melanoma murino B16F10. Após o implante subcutâneo das células B16F10, os tumores levam de 5 a 10 dias para se tornarem palpáveis, possibilitando a mensuração do volume tumoral e início dos tratamentos. Inicialmente foi realizado o experimento avaliando o efeito do BCP em monoterapia ou combinado com CDDP sobre o volume (A) e peso dos tumores (B). Em (D) os animais foram tratados com BCP (25, 50 e 100 mg/kg, v.o, 1x/dia), o gráfico representa o percentual de sobrevivência até atingir algum dos *endpoints* humanitários. (C) avaliação *in vitro* do BCP sozinho (1, 25 e 50 μ M) ou combinado com CDDP (1, 5 e 10 μ M) sobre a viabilidade das células B16F10. Valores representados como média \pm desvio padrão. * indica diferença do grupo controle. Em (A), ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 5$; em (B) e (D) ANOVA de 1 via, *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, $n = 5$; em (C) comparação da curva pelo teste Mantel-Cox, $p < 0,05$, $n = 6$).

7 DISCUSSÃO

O manejo dos efeitos adversos causados pelo uso de quimioterápicos durante o tratamento do câncer por muitas vezes é um desafio na clínica, especialmente quando

essa morbidade é de difícil diagnóstico e tratamento, como é o caso da NIQ (DESFORGES *et al.*, 2022; ZAJĄCZKOWSKA *et al.*, 2019; CAVALETTI *et al.*, 2010). (SALAT *et al.*, 2020). Ao subdiagnóstico somam-se a dificuldade do controle farmacológico dos sintomas neuropáticos e o fato de que, em diversos estudos clínicos, as intervenções farmacológicas não apresentaram benefício em grande parte dos indivíduos avaliados (SALAT *et al.*, 2020). Assim, novas abordagens farmacológicas devem ser estudadas para o controle da NIQ, pois o tratamento precoce tende a inibir a cronificação dos danos neuronais (ZUO *et al.*, 2003; ELLIS e BENNET, 2013). A severidade da neuropatia, além de afetar a qualidade de vida do paciente oncológico, pode levar a modificações do protocolo antitumoral, aumentando o intervalo entre as doses, reduzindo a dose ou, em casos graves, provocar interrupção precoce do tratamento quimioterápico. O desvio de curso dos protocolos quimioterápicos pode afetar a eficácia antitumoral, principalmente pela facilitação do processo de resistência das células tumorais aos fármacos, o que dificulta significativamente o sucesso da quimioterapia e aumenta a probabilidade de óbito em consequência do câncer (COLVIN *et al.*, 2019).

Neste estudo, baseados em um modelo não clínico de NIOX em animais portadores de tumor, demonstramos que o fitoquímico BCP pode ser uma alternativa farmacológica para o controle do fenótipo neuropático, sem afetar a eficácia antitumoral e toxicidade da OXA. Para avaliar o efeito antinociceptivo do BCP e sobre a eficácia antitumoral da OXA, inicialmente, aplicamos o protocolo de tratamento concomitante da OXA com uma dose diária do BCP, com o intuito de avaliar se a intervenção com BCP previne o surgimento da hiperalgesia mecânica e térmica ao frio, assim como avaliar por um período amplo o efeito sobre o desenvolvimento dos tumores de Ehrlich. Observamos que o BCP previne o surgimento da hiperalgesia mecânica e térmica ao frio e, em relação a eficácia antitumoral da OXA, o BCP não alterou o efeito da OXA na redução do volume tumoral. No protocolo pós-indução da neuropatia (terapêutico) - que se correlaciona melhor com a realidade clínica, na qual a intervenção farmacológica geralmente ocorre após observação de algum sintoma de neuropatia - observamos que uma dose única de 100 mg/kg de BCP, apresenta efeito antinociceptivo a partir de 3 h; efeito que se manteve até o fim das primeiras 24 h avaliadas, e se manteve até o final dos 14 dias de protocolo. Esse conjunto de dados demonstra que o BCP previne o surgimento da hiperalgesia mecânica e térmica ao frio em modelo murino de NIOX, assim como reverte a hiperalgesia no protocolo

terapêutico; além de não alterar a eficácia antitumoral da OXA em ambos protocolos de tratamento (concomitante e pós indução da neuropatia). Não encontramos trabalhos na literatura avaliando os efeitos do BCP especificamente sobre a NIOX. Nesse modelo, existe um trabalho que avalia os efeitos de Δ^9 -THC e canabidiol, que apresentam efeito antinociceptivo, porém a participação de CB₁ e CB₂ no efeito observado não foi avaliada (KING *et al.*, 2017). Entretanto, já foi observado que tanto CB₁ quanto CB₂ apresentam expressão aumentada em DRG de animais tratados com OXA (NOYA-RIOBÓ *et al.*, 2023). Em um estudo com o agonista sintético de CB₂, AM1710, foi observada redução da hiperalgisia mecânica e térmica ao frio em modelo de neuropatia induzida por paclitaxel e cisplatina (DENG *et al.*, 2012), assim como o uso do agonista JHW-133 melhorou a nocicepção mecânica em modelo de neuropatia induzida por cisplatina (VERA *et al.*, 2013). Em modelo de neuropatia induzida por paclitaxel, o agonista CB₂ MDA7 atenuou a hiperalgisia mecânica, assim como agonista misto CB₁/CB₂ CP55,940 apresentou melhora da nocicepção mecânica através de CB₂ (WU *et al.*, 2018; DENG *et al.*, 2015). No único trabalho que encontramos utilizando o BCP em um modelo de NIQ (induzida por paclitaxel), SEGAT e colaboradores (2017) observaram que o BCP reverte a hiperalgisia mecânica induzida por PTX, através de mecanismo envolvendo CB₂, dado que o efeito antinociceptivo foi inibido pelo antagonista CB₂ AM630.

Nosso trabalho vai ao encontro desses dados, pois quando administramos o antagonista de CB₂ SR144528 também observamos inibição do efeito antinociceptivo sobre a hiperalgisia mecânica, inferindo que, ao menos em parte, o efeito do BCP envolve CB₂. Porém, sobre a hiperalgisia térmica ao frio, o antagonista não inibiu o efeito antinociceptivo. Também avaliamos o efeito do antagonista PPAR_v GW9662 (1 mg/kg, i.p) no modelo de NIOX, e observamos um efeito transitório de inibição do efeito do BCP sobre a hiperalgisia mecânica, e assim como o antagonista CB₂, não inibiu o efeito antinociceptivo do BCP sobre a hiperalgisia ao frio. Entretanto, existem trabalhos demonstrando evidências do envolvimento de PPAR_v na NIQ (QUINTÃO *et al.*, 2019). Neste contexto, foi observado que o uso do agonista PPAR_v rosiglitazona, melhora a hiperalgisia térmica ao frio e reduz a hiperalgisia evocada por pressão em modelo de NIOX (ZANARDELLI *et al.*, 2014). Importante notar que a ausência de uma curva de doses, em nosso modelo, pode limitar nossa interpretação sobre a eficácia

dos antagonistas CB₂ e PPAR_γ testados sobre o parâmetro de sensibilidade ao frio. Além disso, o fato do antagonista CB₂ não inibir o efeito do BCP na sensibilidade ao frio, pode ser devido a dose de SR144528 que utilizamos (1 mg/kg, baseado nos estudos de BELTRAMO e colaboradores., 2006), dado que, em alguns trabalhos que avaliaram o efeito do SR144528 sobre a nocicepção ao frio, a dose utilizada para observar efeito inibitório sobre a droga teste nesses estudos foi de 3 mg/kg (CROWE *et al.*, 2015; KINSEY *et al.*, 2009).

Outra possibilidade é que o BCP pode modular outras vias de sinalização, como alguns membros da família TRP. Existem evidências de que canabinoides modulam alguns TRPs, sendo inclusive um grupo de TRPs denominados como receptores canabinoides ionotrópicos (MULLER *et al.*, 2019). Já foi predita *in silico* a ligação do BCP ao TRPV1 (VENKATAKRISHNA *et al.*, 2022; TOLEDO *et al.*, 2020), embora modelos mais robustos devem ser realizados para confirmar esses achados. Na relação de canabinoides com os receptores TRP, o primeiro agonista endógeno de TRPV1 descoberto foi a anandamida (ZYGMUNT *et al.*, 1999). Além disso, foi descrito que o Δ⁹-THC atua em TRPV2 e modula moderadamente TRPV3, TRPV4, TRPA1 e TRPM8 (DE PETROCELLIS *et al.*, 2011; MULLER *et al.*, 2019), assim como o canabigerol, que é significativamente mais seletivo para CB₂ tem efeito agonista em TRPV1 (DE PETROCELLIS *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstram que de fato o BCP apresenta efeito antinociceptivo sobre a nocicepção espontânea aguda e hiperalgesia ao frio induzida pelo agonista TRPV1, capsaicina, resultados semelhantes aos de KATSUYAMA e colaboradores (2013), obtidos através da administração intraplantar de BCP, onde observaram melhora na nocicepção espontânea aguda induzida por capsaicina. Outros agonistas CB₂, AM1241 e JWH133, também já demonstraram efeito antinociceptivo em modelos utilizando capsaicina como algógeno; efeito inibido com uso de antagonistas CB₂ (AM630, SR144528) (QUARTILHO *et al.*, 2003; HOHMANN *et al.*, 2004; SAGAR *et al.*, 2005).

Utilizando AITC como algógeno, observamos diminuição da nocicepção espontânea aguda e diminuição do edema de pata nos animais tratados com BCP. DE PETROCELLIS e colaboradores (2011) demonstram que canabinoides com afinidade para CB₁ e CB₂ apresentam efeito antinociceptivo após estímulo com AITC (agonista TRPA1); também foi observada participação de CB₂ na modulação da

nocicepção orofacial induzida por AITC em ratos (SPRADLEY *et al.*, 2012). Portanto, os dados aqui obtidos em conjunto com a literatura demonstram que parece existir relação de TRPs no efeito antinociceptivo do BCP e de agonistas CB₂. Porém, estudos testando antagonistas são necessários para confirmar a participação de CB₂ no efeito do BCP sobre o sistema de TRPs.

Adicionalmente observamos que o BCP também melhora a nocicepção espontânea aguda, hiperalgesia ao frio e edema de pata em animais que receberam PGE₂ na pata, confirmando que o BCP é capaz de inibir a sensibilização neuronal induzida por PGE₂, que é liberada durante processos inflamatórios e causa excitação neuronal (CUI e NICOL, 1995). A PGE₂ já foi caracterizada como um algógeno através da administração intraplantar (KASSUYA *et al.*, 2007), sendo um bom modelo para avaliar a hiperalgesia induzida por um mediador inflamatório e para avaliação do efeito antiedematogênico de um fármaco, dado que a PGE₂ induz pronunciado edema de pata (CLAUDINO *et al.*, 2006). A literatura demonstra que a PGE₂ participa da sensibilização neuronal em estados de lesão (MA *et al.*, 2008), assim como já foi observado que PGE₂ participa do processo de cronificação da NIOX (STAURENGO-FERRARI *et al.*, 2022), sendo assim a inibição da hiperalgesia induzida por PGE₂ importante também no contexto da NIOX.

Um dos principais efeitos farmacológicos propostos para o BCP é o anti-inflamatório (MACHADO *et al.*, 2018). Na NIOX ocorre aumento da liberação de citocinas pró inflamatórias (MCLEARY *et al.*, 2019), já bem caracterizada em medula espinhal com aumento de TNF e IL-1 β (JUANG *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2021; AGNES *et al.*, 2021; BAI *et al.*, 2022). Nesse sentido reforçamos os dados da literatura ao observar aumento significativo de IL-1 β e TNF- α na medula espinhal de animais tratados com OXA, e uma importante redução nos níveis dessas citocinas em animais tratados com BCP, confirmando a atividade anti-inflamatória do BCP no modelo de NIOX. Apesar de não ter literatura disponível avaliando interleucinas no tratamento com BCP em modelo de NIOX, em um modelo de neuropatia induzida por paclitaxel em camundongos, o BCP diminuiu a imunociteína de IL-1 β e NF- κ B em medula espinhal (SEGAT *et al.*, 2017). Além disso, alguns trabalhos em diferentes modelos demonstram ação anti-inflamatória do BCP. Em modelo de dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica em ratos, foi observado que o tratamento com BCP reduziu os níveis de TNF e IL-1 β em homogenato de aorta (YOUSSEF *et al.*, 2019).

ALBERTI e colaboradores (2017) observaram que em células Treg obtidas de animais com encefalomielite induzida pelo peptídeo MOG-35-55, o tratamento com BCP reduz os níveis de INF- γ e IL-4 e aumentou IL-10; efeito que foi inibido pelo antagonista CB₂ AM630. Em um modelo de cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em ratos, foi observado que o tratamento com BCP reduz os níveis de TNF, IL-1 β e IL-6 no coração (MEERAN *et al.*, 2019); resultados semelhantes aos observados por AL-TAEE e colaboradores (2019) no mesmo modelo de cardiotoxicidade por doxorubicina, no qual observaram redução de TNF, IL-1 β e IL-6 no miocárdio de ratos.

Em relação aos efeitos de CB₂ na modulação inflamatória, foi observado em modelo de neuropatia induzida por paclitaxel que o agonista CB₂ MDA7 preveniu o surgimento da hiperalgesia mecânica, além de reduzir a expressão gênica de TNF, IL-1 β e IL-6 em medula espinhal (XU *et al.*, 2014). Em um modelo de inflamação de pata induzida por carragenina, foi observado que o agonista CB₂ GW405833 diminuiu os níveis séricos de TNF e IL-1 β (PARLAR *et al.*, 2018). No trabalho de ZOPPI e colaboradores (2014) o tratamento com o agonista CB₂ JHW133 reduziu os níveis de TNF e IL-1 β no cérebro de camundongos em modelo de estresse acústico. Dessa forma, os dados da literatura em conjunto com nossos resultados evidenciam que o BCP e outros agonistas CB₂ exercem efeito anti-inflamatório em diferentes patologias estudadas em modelo animal, incluindo a NIQ.

Além do mecanismo anti-inflamatório clássico via CB₂, o efeito como modulador redox faz parte dos efeitos farmacológicos propostos para o BCP (ASSIS *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2016; FRANCOMANO *et al.*, 2019). No nosso modelo realizamos a quantificação de TBARS em amostras de cérebro, medula espinhal, fígado, rins e baço além da mensuração de ERO pela sonda DCF e dos níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) em medula espinhal. Observamos que o tratamento com OXA aumentou a lipoperoxidação, os níveis de ERO (ensaio DCF) e os níveis de 4-HNE, ao passo que o BCP (100 mg/kg) reduziu significativamente esses parâmetros, indicando que o BCP atua na neuroproteção contra lipoperoxidação e produção de ERO no SNC. Não encontramos trabalhos avaliando modulação redox em medula espinhal no tratamento com BCP, sendo necessários mais estudos para confirmar esse efeito, assim como os mecanismos envolvidos, como a ativação da via Nrf2 observada no cérebro de animais tratados com BCP (LOU *et al.*, 2016). Em relação aos danos oxidativos em medula espinhal induzidos por OXA, já observamos que existe relação entre o

aumento de lipoperoxidação e dos níveis de EROs com a hiperalgesia, pois o uso de antioxidantes além de reduzir esses parâmetros, melhora significativamente a nocicepção dos animais em modelo de NIOX (AGNES *et al.*, 2021).

Na avaliação da lipoperoxidação do baço, observamos que todos os grupos que receberam OXA apresentaram aumento na lipoperoxidação. Além disso observamos que o tamanho do baço também era menor nesses animais em comparação ao grupo controle sem OXA. Logo, o efeito sobre a lipoperoxidação no baço parece ser independente da presença de tumor, pois o grupo controle com tumor não apresentou aumento. Neste contexto, já foi observado no tratamento com OXA causa esplenomegalia (LEES *et al.*, 2020), efeito que não foi reproduzido em nosso modelo. Porém, no trabalho de LEES e colaboradores (2020) as avaliações foram realizadas em animais sem tumor, que pode ser o motivo da diferença para o nosso modelo no qual há presença de tumor. Não encontramos dados avaliando danos oxidativos no baço induzidos por OXA, portanto maiores avaliações devem ser realizadas nesse sentido, assim como o estudo das consequências do estresse oxidativo no baço desses animais.

A OXA reduz a quantidade de leucócitos totais, uma consequência da mielossupressão – causada pela platinação do DNA e parada/morte celular dos precursores hematopoiéticos – tipicamente observada em pacientes tratados com OXA (HANADA *et al.*, 2010). Em um modelo de NIOX, a OXA também induziu redução de leucócitos totais (CANTA *et al.*, 2020). Entretanto, o BCP não apresentou nenhum efeito sobre esse parâmetro, indicando que o BCP não afeta o mecanismo de ação antitumoral da OXA, o dano em DNA. Em linhagem de melanoma, o BCP também não afetou a citotoxicidade da cisplatina *in vitro*, sugerindo que a platinação de DNA não deve ter sido diminuída na presença do BCP. Outra alteração hematológica observada foi a trombocitopenia, que predispõe ao surgimento de hematomas e hemorragias potencialmente fatais; alteração que já é bem relatada em humanos em tratamento com OXA (KOUTRAS *et al.*, 2004; BAUTISTA *et al.*, 2010; SHAO *et al.*, 2018). Em modelo animal também já foi observada trombocitopenia induzida por OXA (ORTHMANN *et al.* 2016; CANTA *et al.*, 2020). Sobre esse parâmetro, o BCP teve um efeito positivo, aumentando significativamente a quantidade de plaquetas e, neste sentido, EL-SHEIK e colaboradores observaram que o BCP aumentou a quantidade de plaquetas após exposição ao metotrexato. Esse efeito pode ter relação com

ativação de receptores CB₂ os quais, ao menos em humanos, são expressos em plaquetas (CATANI *et al.*, 2010).

Além da eficácia antinociceptiva de um fármaco candidato ao tratamento da NIQ, é fundamental avaliar a segurança do fármaco sobre o desenvolvimento de tumores. Nesse sentido, observamos que o BCP não altera a eficácia antitumoral da OXA no adenocarcinoma de Ehrlich. Também avaliamos o efeito isolado do BCP no mesmo modelo e observamos potencial efeito antitumoral do BCP, porém, o efeito não foi dose-dependente, sendo significativo nas doses de 25 e 50 mg/kg, mas não na dose de 100 mg/kg. Considerando que a análise do efeito antitumoral foi uma variável secundária no desenho do nosso modelo, mais estudos devem ser realizados para confirmar ação antitumoral do BCP sozinho ou combinado com quimioterápicos (FIDYT *et al.*, 2016). Um dos poucos trabalhos encontrados vai ao encontro dos nossos resultados e demonstra que o BCP não altera a eficácia antitumoral da doxorrubicina em camundongos com adenocarcinoma de Ehrlich (HANUŠOVÁ *et al.*, 2017). Em estudos *in vitro*, foi observado que o BCP aumenta o efeito antiproliferativo da OXA em células de câncer colorretal (AMBROZ *et al.*, 2019), não afeta o efeito antiproliferativo da doxorrubicina em células de adenocarcinoma colorretal (DI GIACOMO *et al.*, 2017); e promove quimiossensibilização a doxorrubicina em células de colangiocarcinoma (DI SOTTO *et al.*, 2020). Em modelo animal existem evidências da participação de CB₂ no desenvolvimento de tumores. Em um modelo xenográfico de implante de células de câncer de mama (MDA-MB231), foi observado que o agonista CB₂ JHW-133 diminui o volume tumoral; efeito que é inibido pelo antagonista CB₂ SR144528 (QAMRI *et al.*, 2018). Esse resultado corrobora com os achados de MORALES e colaboradores (2015), no mesmo modelo (implante xenográfico de MDA-MB231), e o tratamento com a agonista CB₂ o-Quinona, que apresentou efeito antitumoral *in vivo* e *in vitro*.

Em outro momento, avaliamos o efeito do BCP sobre um tumor mais agressivo, o melanoma B16F10 (MACHADO *et al.*, 2013). Nesse modelo, observamos efeito antitumoral bem pronunciado no tratamento com BCP, superior ao efeito da CDDP nesse modelo. Além disso, o BCP aumentou significativamente a sobrevivência de animais com melanoma. O trabalho de JUNG e colaboradores (2015) corrobora com nossos resultados. Em modelo de melanoma B16F10 em animais recebendo dieta hiperlipídica, com o intuito de criar um microambiente mais propício ao crescimento

de tumores, foi observado que o uso de BCP na formulação da ração inibiu o crescimento dos tumores através de mecanismos que envolvem supressão da proliferação celular e da angiogênese, indicando também que na linhagem de camundongos C57BL/6 o BCP também parece ser absorvido por via oral o suficiente para gerar efeito farmacológico. Por outro lado, quando realizamos um ensaio *in vitro* com as células B16F10, não observamos efeito antiproliferativo do BCP, o que nos leva a crer que o efeito observado *in vivo* pode estar ocorrendo via modulação da resposta imune/inflamatória através de CB₂. O estudo de GRUBER e colaboradores (2021) nos traz base para tal hipótese, pois em animais Cnr2^{-/-} foi observado aumento no volume dos tumores em comparação aos animais Cnr2^{+/+}. No infiltrado tumoral, foi observado aumento de linfócitos B (CD19⁺) e diminuição de linfócitos T (CD8⁺), indicando que existe relação entre expressão de CB₂ e a imunidade tumoral no desenvolvimento do melanoma B16F10 em camundongos (GRUBER *et al.*, 2021). Além da modulação da inflamação/imunidade tumoral, já foi observado que o BCP e/ou agonistas CB₂ são capazes de reduzir a angiogênese, induzir apoptose, reduzir metástases em diferentes tipos de câncer em estudos *in vitro* e *in vivo* (KHAN *et al.*, 2016; HASHIESH *et al.*, 2021; IRRERA *et al.*, 2020; DAHHAM *et al.*, 2021; ARUL *et al.*, 2020; FIDYT *et al.*, 2016). Portanto, os dados que obtivemos em conjunto com os apresentados na literatura demonstram que o BCP apresenta potencial atividade antitumoral, porém, mais estudos são necessários para observar a reprodutibilidade desses resultados, assim como investigar se os mecanismos moleculares envolvidos na ação antitumoral são os mesmos propostos com o uso de outros agonistas CB₂.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o tratamento com BCP em modelo de NIOX apresenta efeito antinociceptivo sobre a hiperálgia mecânica e térmica ao frio em protocolo concomitante/preventivo, assim como quando administrado após a indução da neuropatia por OXA. Os mecanismos farmacodinâmicos sugerem que há participação de receptores CB₂ no efeito do BCP sobre a hiperálgia mecânica, e efeito de PPAR_γ em menor magnitude. Porém, nenhum antagonista inibiu a atividade antinociceptiva ao frio, indicando que outras vias de sinalização podem estar envolvidas no efeito do BCP. Sobre o desenvolvimento de tumores, o BCP não alterou a eficácia antitumoral da OXA no modelo de adenocarcinoma de Ehrlich e, quando administrado em monoterapia, apresentou potencial efeito antitumoral tanto no

modelo de adenocarcinoma de Ehrlich quanto, e principalmente, no modelo de melanoma B16F10. Sendo assim, pode-se concluir que o BCP é uma molécula promissora para o controle da NIOX, sem alterar a eficácia antitumoral da OXA em modelo animal. Estudos em humanos devem ser realizados para avaliar se há translação dos dados obtidos em modelo animal, para assim viabilizar a aplicação clínica do BCP.

9. REFERÊNCIAS

- 1 ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - BRASIL). Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. – 2. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2021. Brasília: [citado em 10/02/23] Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulariofitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-capa2.pdf>.
- 2 ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - BRASIL). RESOLUÇÃO - RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007.
- 3 AGHAZADEH TABRIZI, M. et al. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Potential Therapeutic Benefits of Cannabinoid CB2 Receptor Agonists. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 2, p. 519–560, 27 jan. 2016.
- 4 AGNES, J. P. et al. Antioxidants Improve Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Tumor-Bearing Mice Model: Role of Spinal Cord Oxidative Stress and Inflammation. **The Journal of Pain**, v. 22, n. 8, p. 996–1013, 1 ago. 2021.
- 5 ALBERTI, T. et al. (-)- β -Caryophyllene, a CB2 Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 691, 1 abr. 2017.
- 6 AL-TAEE, H. et al. β -caryophyllene, a dietary phytocannabinoid attenuates oxidative stress, inflammation, apoptosis and prevents structural alterations of the myocardium against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats: An in vitro and in vivo study. **European Journal of Pharmacology**, v. 858, p. 172467, set. 2019.
- 7 ALY, E.; KHAJAH, M. A.; MASOCHA, W. β -Caryophyllene, a CB2-Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Antiretroviral-Induced Neuropathic Pain. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 106, 27 dez. 2019.
- 8 AMBROŽ, M. et al. Sesquiterpenes α -humulene and β -caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. **Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 69, n. 1, p. 121–128, 1 mar. 2019.

- 9 AMES-SIBIN, A. P. et al. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 12, p. 10262–10277, 21 ago. 2018.
- 10 AMJAD, M. T.; KASI, A. **Cancer Chemotherapy**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>>.
- 11 ANAND, U.; OTTO, W. R.; ANAND, P. Sensitization of Capsaicin and Icilin Responses in Oxaliplatin Treated Adult Rat DRG Neurons. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1744–80696–82, jan. 2010.
- 12 ASAKAWA, Y. et al. Terpenoid biotransformation in mammals IV Biotransformation of (+)-longifolene, (-)-caryophyllene, (-)-caryophyllene oxide, (-)-cyclocolorenone, (+)-nootkatone, (-)-elemol, (-)-abietic acid and (+)-dehydroabietic acid in rabbits. **Xenobiotica**, v. 16, n. 8, p. 753–767, jan. 1986.
- 13 ASSIS, L. C. et al. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, v. 279, p. 220–231, out. 2014.
- 14 BAI, X. et al. Wnt3a/YTHDF1 Regulated Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain Via TNF- α /IL-18 Expression in the Spinal Cord. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 8 ago. 2022.
- 15 BARADARAN RAHIMI, V.; ASKARI, V. R. A mechanistic review on immunomodulatory effects of selective type two cannabinoid receptor β -caryophyllene. **BioFactors**, v. 48, n. 4, p. 857–882, jun. 2022.
- 16 BAUTISTA, M. A. et al. Hypersensitivity reaction and acute immune-mediated thrombocytopenia from oxaliplatin: two case reports and a review of the literature. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 3, n. 1, 26 mar. 2010.
- 17 BELTRAMO, M. et al. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 1530–1538, mar. 2006.
- 18 BENTO, A. F. et al. β -Caryophyllene Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through CB2 Receptor Activation and PPAR γ Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153–1166, 1 mar. 2011.
- 19 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. 1899–1910, 1 maio 2008.
- 20 BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114147, out. 2020.

- 21 BLANTON, H. L. et al. Cannabinoids: Current and Future Options to Treat Chronic and Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. **Drugs**, v. 79, n. 9, p. 969–995, 24 maio 2019.
- 22 BONGARZONE, E. R.; PASQUINI, J. M.; SOTO, E. F. Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. **Journal of Neuroscience Research**, v. 41, n. 2, p. 213–221, 1 jun. 1995.
- 23 BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241–251, ago. 2004.
- 24 BURGESS, J. et al. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Pathomechanisms and Treatment. **Oncology and Therapy**, v. 9, n. 2, p. 385–450, 16 out. 2021.
- 25 CALLEGARI-JACQUES, C.; M, S. Bioestatística: princípios e aplicações. **Bioestatística: princípios e aplicações**, p. 255–255, 2003.
- 26 CALLEJA, M. A. et al. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394–401, 1 maio 2012.
- 27 CAMINO, D. DEL et al. TRPA1 Contributes to Cold Hypersensitivity. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 15165–15174, 10 nov. 2010.
- 28 CANTA, A. et al. Calmangafodipir Reduces Sensory Alterations and Prevents Intraepidermal Nerve Fibers Loss in a Mouse Model of Oxaliplatin Induced Peripheral Neurotoxicity. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 594, 1 jul. 2020.
- 29 CARTONI, C. et al. Controlled-release oxycodone for the treatment of bortezomib-induced neuropathic pain in patients with multiple myeloma. **Supportive Care in Cancer**, v. 20, n. 10, p. 2621–2626, 15 jun. 2012.
- 30 CATANI, M. et al. Human platelets express authentic CB1 and CB2 receptors. **Current Neurovascular Research**, v. 7, n. 4, p. 311-318, 2010.
- 31 CVALETTI, G. et al. Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity assessment: A critical revision of the currently available tools. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 3, p. 479–494, fev. 2010.
- 32 CVALETTI, G. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A multifaceted, still unsolved issue. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 24, n. S2, out. 2019.
- 33 CVALETTI, G. et al. The Total Neuropathy Score as an assessment tool for grading the course of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: comparison with the National Cancer Institute-Common Toxicity Scale. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 12, n. 3, p. 210–215, set. 2007.

- 34 CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1 jul. 1994.
- 35 CHRISTIDI, E.; BRUNHAM, L. R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 1 abr. 2021.
- 36 CLAUDINO, R. F. et al. Pharmacological and Molecular Characterization of the Mechanisms Involved in Prostaglandin E₂-Induced Mouse Paw Edema. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 2, p. 611–618, 27 abr. 2006.
- 37 COLVIN, L. A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **PAIN**, v. 160, p. S1–S10, maio 2019.
- 38 D'ANDRE, S. et al. Topical Cannabinoids for Treating Chemotherapy-Induced Neuropathy: A Case Series. **Integrative Cancer Therapies**, v. 20, p. 153473542110617, jan. 2021.
- 39 DAHHAM, S. S. et al. β -Caryophyllene Induces Apoptosis and Inhibits Angiogenesis in Colorectal Cancer Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10550, 1 jan. 2021.
- 40 DE PETROCELLIS, L. et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1479–1494, 12 jul. 2011.
- 41 DEACON, R. M. Assessing nest building in mice. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1117–1119, ago. 2006.
- 42 DEACON, R. M. J. Measuring Motor Coordination in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 75, 29 maio 2013.
- 43 DESFORGES, A. D. et al. Treatment and diagnosis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: An update. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 147, p. 112671, 1 mar. 2022.
- 44 DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 30 out. 2008.
- 45 DHOPEHWARKAR, A.; MACKIE, K. CB2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target—What Does the Future Hold? **Molecular Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 430–437, 8 ago. 2014.
- 46 DI GIACOMO, Silvia et al. Chemosensitizing properties of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide in combination with doxorubicin in human cancer cells. **Anticancer Research**, v. 37, n. 3, p. 1191-1196, 2017.

- 47 DI SOTTO, A. et al. Modulation of STAT3 Signaling, Cell Redox Defenses and Cell Cycle Checkpoints by β -Caryophyllene in Cholangiocarcinoma Cells: Possible Mechanisms Accounting for Doxorubicin Chemosensitization and Chemoprevention. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 858, 2 abr. 2020.
- 48 DIXON, W. J.. Efficient Analysis of Experimental Observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 20(1), 441–462. 1980.
- 49 DRAPER, H. H.; HADLEY, M. [43] **Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/007668799086135I>>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- 50 ELLIS, A.; BENNETT, D. L. H. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, n. 1, p. 26–37, jul. 2013.
- 51 EL-SHEIKH, S. M. A. et al. Anti-arthritic effect of β -caryophyllene and its ameliorative role on methotrexate and/or leflunomide-induced side effects in arthritic rats. **Life Sciences**, v. 233, p. 116750, set. 2019.
- 52 FARSHCHIAN, N. et al. Comparative study of the effects of venlafaxine and duloxetine on chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 82, n. 5, p. 787–793, 13 ago. 2018.
- 53 FIDYT, K. et al. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007–3017, 30 set. 2016.
- 54 FRANCOMANO, F. et al. β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. **Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 5420, 1 jan. 2019.
- 55 GALIEGUE, S. et al. Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 54–61, ago. 1995.
- 56 GALMARINI, D.; GALMARINI, C. M.; GALMARINI, F. C. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 84, n. 2, p. 181–199, nov. 2012.
- 57 GARRÉ, J. et al. An Acute Mouse Spinal Cord Slice Preparation for Studying Glial Activation ex vivo. **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 2, 2017.
- 58 GASPAROTTO, J. et al. Anti-RAGE antibody selectively blocks acute systemic inflammatory responses to LPS in serum, liver, CSF and striatum. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 62, p. 124–136, 2017.
- 59 GAUCHAN, P. et al. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. **Neuroscience Letters**, v. 458, n. 2, p. 93–95, jul. 2009.

- 60 GEBREMEDHN, E. G.; SHORTLAND, P. J.; MAHNS, D. A. The incidence of acute oxaliplatin-induced neuropathy and its impact on treatment in the first cycle: a systematic review. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 12 abr. 2018.
- 61 GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 1 jul. 2008.
- 62 GIRARD, E. et al. Macrophage migration inhibitory factor produced by the tumour stroma but not by tumour cells regulates angiogenesis in the B16-F10 melanoma model. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 9, p. 1498–1505, 6 set. 2012.
- 63 GREEN, D. P. et al. A Mast-Cell-Specific Receptor Mediates Neurogenic Inflammation and Pain. **Neuron**, v. 101, n. 3, p. 412–420.e3, 6 fev. 2019.
- 64 GRUBER, T. et al. Cannabinoid Receptor Type-2 in B Cells Is Associated with Tumor Immunity in Melanoma. **Cancers**, v. 13, n. 8, p. 1934, 1 jan. 2021.
- 65 HAN, K. H. et al. CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. **Cardiovascular Research**, v. 84, n. 3, p. 378–386, 11 jul. 2009.
- 66 HANADA, K. et al. Pharmacokinetics and Toxicodynamics of Oxaliplatin in Rats: Application of a Toxicity Factor to Explain Differences in the Nephrotoxicity and Myelosuppression Induced by Oxaliplatin and the Other Platinum Antitumor Derivatives. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 9, p. 1893–1899, 15 jun. 2010.
- 67 HANUŠOVÁ, V. et al. The effects of β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 828–836, nov. 2017.
- 68 HARB, A. A.; BUSTANJI, Y. K.; ABDALLA, S. S. Hypocholesterolemic effect of β -caryophyllene in rats fed cholesterol and fat enriched diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 62, n. 3, p. 230–237, 2018.
- 69 HASHIESH, H. M. et al. A focused review on CB2 receptor-selective pharmacological properties and therapeutic potential of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 111639, ago. 2021.
- 70 HE, J. et al. Pharmacokinetic evaluation of β -caryophyllene alcohol in rats and beagle dogs. **Xenobiotica**, v. 48, n. 8, p. 845–850, 11 set. 2017.
- 71 HERSHMAN, D. L. et al. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 18, p. 1941–1967, 20 jun. 2014.

- 72 HOHMANN, A. G. Selective Activation of Cannabinoid CB2 Receptors Suppresses Hyperalgesia Evoked by Intradermal Capsaicin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 2, p. 446–453, 1 dez. 2003.
- 73 HUANG, X. et al. Downregulation of metallothionein-2 contributes to oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, 13 abr. 2021.
- 74 IRRERA, N. et al. β -Caryophyllene Mitigates Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA) in Mice Through a Cross-Talk between CB2 and PPAR- γ Receptors. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 326, 31 jul. 2019.
- 75 JANES, K. et al. Spinal neuroimmune activation is independent of T-cell infiltration and attenuated by A3 adenosine receptor agonists in a model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 44, p. 91–99, fev. 2015.
- 76 JASMIN, L. et al. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. **Pain**, v. 75, n. 2, p. 367–382, jan. 1998.
- 77 JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 139–146, ago. 2014.
- 78 JUNG, J. I. et al. β -Caryophyllene potently inhibits solid tumor growth and lymph node metastasis of B16F10 melanoma cells in high-fat diet-induced obese C57BL/6N mice. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 9, p. 1028–1039, 29 maio 2015.
- 79 JUNG, Y. et al. Anti-allodynic effect of Buja in a rat model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via spinal astrocytes and pro-inflammatory cytokines suppression. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, 14 jan. 2017.
- 80 KANG, L. et al. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment. **Journal of Neurology**, 30 maio 2020.
- 81 KARASHIMA, Y. et al. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1273–1278, 27 jan. 2009.
- 82 KASSUYA, C. A. L. et al. Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 6, p. 727–737, mar. 2007.
- 83 KATSUYAMA, S. et al. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 17, n. 5, p. 664–675, 1 maio 2013.

- 84 KIM, B.-S. et al. Efficacy and safety of oxycodone/naloxone as add-on therapy to gabapentin or pregabalin for the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in Korea. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 5, p. e448–e454, 27 dez. 2017.
- 85 KING, K. M. et al. Single and combined effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 17, p. 2832–2841, 27 jul. 2017.
- 86 KOCARNIK, J. M. et al. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019. **JAMA Oncology**, v. 8, n. 3, 30 dez. 2021.
- 87 KOCARNIK, J. M. et al. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019. **JAMA Oncology**, v. 8, n. 3, 30 dez. 2021.
- 88 KOUTRAS, A. K. et al. Oxaliplatin-Induced Acute-Onset Thrombocytopenia, Hemorrhage and Hemolysis. **Oncology**, v. 67, n. 2, p. 179–182, 2004.
- 89 KRISHNAN, A. V. et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity and the development of neuropathy. **Muscle & Nerve**, v. 32, n. 1, p. 51–60, 2005.
- 90 LEES, J. G. et al. Oxaliplatin-induced haematological toxicity and splenomegaly in mice. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238164, 2 set. 2020.
- 91 LELEU-CHAVAIN, N. et al. Recent Advances in the Development of Selective CB2 Agonists as Promising Anti-Inflammatory Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 3457–3474, 1 jul. 2012.
- 92 LI, Y.-Y. et al. Activation of STAT3-mediated CXCL12 up-regulation in the dorsal root ganglion contributes to oxaliplatin-induced chronic pain. **Molecular Pain**, v. 13, 22 nov. 2017.
- 93 LIU, H. et al. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of β -caryophyllene/ β -cyclodextrin inclusion complex. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1-2, p. 304–310, jun. 2013.
- 94 LOU, J. et al. β -Caryophyllene Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Nrf2/HO-1 Pathway in Rats. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 6, p. 1291–1304, 22 jan. 2016.
- 95 LOWRY, O. H., EROEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193(1), 265–275. 1951.
- 96 LYNCH, J. J. et al. Attenuation of mechanical allodynia by clinically utilized drugs in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. **Pain**, v. 110, n. 1, p. 56–63, jul. 2004.
- 97 LYNCH, M. E.; CESAR-RITTENBERG, P.; HOHMANN, A. G. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Pilot Trial With Extension Using an Oral Mucosal

- Cannabinoid Extract for Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 47, n. 1, p. 166–173, 1 jan. 2014.
- 98 MACHADO, D. et al. Irradiated Riboflavin Diminishes the Aggressiveness of Melanoma In Vitro and In Vivo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54269, 16 jan. 2013.
- 99 MACHADO, K. DA C. et al. A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 12, p. 2376–2388, 3 out. 2018.
- 100MAGNOWSKA, M. et al. Effectiveness of gabapentin pharmacotherapy in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Ginekologia Polska**, v. 89, n. 4, p. 201–205, 2018.
- 101MANNELLI, D.C.L. et al. Morphologic Features and Glial Activation in Rat Oxaliplatin-Dependent Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 12, p. 1585–1600, dez. 2013.
- 102MANNELLI, D.C.L. et al. Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Oxidative Stress as Pathological Mechanism. Protective Effect of Silibinin. **The Journal of Pain**, v. 13, n. 3, p. 276–284, mar. 2012.
- 103MANNELLI, D.C.L. et al. Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: Could it correlate with in vivo neuropathy? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 143–150, ago. 2013.
- 104MANOHAR, S.; LEUNG, N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. **Journal of Nephrology**, v. 31, n. 1, p. 15–25, 5 abr. 2017.
- 105MCLEARY, F. et al. Mechanisms underlying select chemotherapeutic-agent-induced neuroinflammation and subsequent neurodegeneration. **European Journal of Pharmacology**, v. 842, p. 49–56, jan. 2019.
- 106MEERAN, M. F. N. et al. β -Caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene attenuates doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity via activation of myocardial cannabinoid type-2 (CB2) receptors in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 304, p. 158–167, maio 2019.
- 107MISHRA, S. et al. A Comparative Efficacy of Amitriptyline, Gabapentin, and Pregabalin in Neuropathic Cancer Pain. **American Journal of Hospice and Palliative Medicine®**, v. 29, n. 3, p. 177–182, 10 jul. 2011.
- 108MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 240–264, ago. 2006.
- 109MÖDINGER Y, et al. Enhanced Oral Bioavailability of β -Caryophyllene in Healthy Subjects Using the VESIsorb® Formulation Technology, a Novel Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS). *Molecules*. 2022; 27(9):2860.

- 110MORALES, P. et al. Selective, Nontoxic CB2 Cannabinoid o-Quinone with in Vivo Activity against Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2256–2264, 20 fev. 2015.
- 111MUKHOPADHYAY, P. et al. Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 3, p. 457–467, 1 fev. 2010.
- 112MUKHOPADHYAY, P. et al. The novel, orally available and peripherally restricted selective cannabinoid CB2 receptor agonist LEI-101 prevents cisplatin-induced nephrotoxicity. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 3, p. 446–458, 15 jan. 2016.
- 113NGUYEN, L. T. et al. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 278, p. 123–128, dez. 2017.
- 114NOYA-RIOBÓ, M. V. et al. Changes in the expression of endocannabinoid system components in an experimental model of chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain: Evaluation of sex-related differences. **Experimental Neurology**, v. 359, p. 114232, jan. 2023.
- 115OJHA, S. et al. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 418, n. 1-2, p. 59–70, 17 jun. 2016.
- 116OLIVEIRA, G. L. DA S. et al. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 338–346, fev. 2018.
- 117ORTHMANN, A. et al. Improved Treatment of MT-3 Breast Cancer and Brain Metastases in a Mouse Xenograft by LRP-Targeted Oxaliplatin Liposomes. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 1, p. 56–68, 1 jan. 2016.
- 118PACHMAN, D. R. et al. Clinical Course of Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Results From the Randomized Phase III Trial N08CB (Alliance). **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 30, p. 3416–3422, 20 out. 2015.
- 119PACHMAN, D. R. et al. Comparison of oxaliplatin and paclitaxel-induced neuropathy (Alliance A151505). **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 12, p. 5059–5068, 18 ago. 2016.

- 120PARK, S. B. et al. Clinical and genetic predictors of paclitaxel neurotoxicity based on patient- versus clinician-reported incidence and severity of neurotoxicity in the ICON7 trial. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 11, p. 2733–2740, nov. 2017.
- 121PARLAR, A. et al. The exogenous administration of CB2 specific agonist, GW405833, inhibits inflammation by reducing cytokine production and oxidative stress. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 18 set. 2018.
- 122QAMRI, Z. et al. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 11, p. 3117–3129, 1 nov. 2009.
- 123QUARTILHO, Aline et al. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 99, n. 4, p. 955-960, 2003
- 124QUASTHOFF, Stefan; HARTUNG, Hans Peter. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of neurology**, v. 249, n. 1, p. 9-17, 2002.
- 125QUINTÃO, N. L. M. et al. Pharmacological Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: PPAR γ Agonists as a Promising Tool. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 28 ago. 2019.
- 126RAMESH, G.; MACLEAN, A. G.; PHILIPP, M. T. Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–20, 2013.
- 127RAO, R. D. et al. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Cancer**, v. 110, n. 9, p. 2110–2118, 2007.
- 128RINALDI-CARMONA, Murielle et al. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, n. 2, p. 644-650, 1998.
- 129SAGAR, D. R. et al. Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 371–379, 21 jul. 2005.
- 130SAIF, Muhammad Wasif et al. Role of pregabalin in treatment of oxaliplatin-induced sensory neuropathy. **Anticancer research**, v. 30, n. 7, p. 2927-2933, 2010.
- 131SAKAMOTO, A.; ANDOH, T.; KURASHI, Y. Involvement of mast cells and proteinase-activated receptor 2 in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in mice. **Pharmacological Research**, v. 105, p. 84–92, mar. 2016.
- 132SAŁAT, K. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1—current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy. **Pharmacological Reports**, v. 72, n. 3, p. 486–507. 2020.

- 133SANTOS, P. S. et al. β -caryophyllene Delivery Systems: Enhancing the Oral Pharmacokinetic and Stability. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 29, p. 3440–3453, 8 dez. 2018.
- 134SCANDIFFIO, R. et al. Protective Effects of (E)- β -Caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. E3273, 26 out. 2020.
- 135SCHIRRMACHER, VOLKER. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 2, p. 407–419, 2017.
- 136SEARGENT, J. M.; YATES, E. A.; GILL, J. H. GW9662, a potent antagonist of PPAR γ , inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone, independently of PPAR γ activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 8, p. 933–937, dez. 2004.
- 137SEGAT, G. C. et al. Antiallodynic effect of β -caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. **Neuropharmacology**, v. 125, p. 207–219, 2017.
- 138SERETNY, M. et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **Pain**, v. 155, n. 12, p. 2461–2470, dez. 2014.
- 139SHAO, Y.-Y.; HONG, R.-L. **Fatal Thrombocytopenia after Oxaliplatin-based Chemotherapy**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://ar.iiarjournals.org/content/anticancer/28/5B/3115.full.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- 140SHARMA, C. et al. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 21, p. 3237–3264, 1 jun. 2016.
- 141SHIMOZUMA, K. et al. Feasibility and validity of the Patient Neurotoxicity Questionnaire during taxane chemotherapy in a phase III randomized trial in patients with breast cancer: N-SAS BC 02. **Supportive Care in Cancer**, v. 17, n. 12, p. 1483–1491, 28 mar. 2009.
- 142SIAU, C.; BENNETT, G. J. Dysregulation of Cellular Calcium Homeostasis in Chemotherapy-Evoked Painful Peripheral Neuropathy. **Anesthesia & Analgesia**, v. 102, n. 5, p. 1485–1490, maio 2006.
- 143SITTL, R. et al. Enhancement of axonal potassium conductance reduces nerve hyperexcitability in an in vitro model of oxaliplatin-induced acute neuropathy. **NeuroToxicology**, v. 31, n. 6, p. 694–700, dez. 2010.
- 144SMITH, E. M. L. et al. Effect of Duloxetine on Pain, Function, and Quality of Life Among Patients With Chemotherapy-Induced Painful Peripheral Neuropathy. **JAMA**, v. 309, n. 13, p. 1359, 3 abr. 2013.

- 145SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 1–10, 2 jun. 2021.
- 146SPRADLEY, J. M. et al. Differences in peripheral endocannabinoid modulation of scratching behavior in facial vs. spinally-innervated skin. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 743–749, 1 set. 2012.
- 147STAROBOVA, H. et al. Inflammatory and Neuropathic Gene Expression Signatures of Chemotherapy-Induced Neuropathy Induced by Vincristine, Cisplatin, and Oxaliplatin in C57BL/6J Mice. **The Journal of Pain**, v. 21, n. 1-2, p. 182–194, jan. 2020.
- 148STAURENGO-FERRARI, L. et al. Neuroendocrine mechanisms in oxaliplatin-induced hyperalgesic priming. **PAIN**, p. 10.1097/j.pain.0000000000002828, 13 maio 2022.
- 149SUT, S. et al. New Drugs from Old Natural Compounds: Scarcely Investigated Sesquiterpenes as New Possible Therapeutic Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 1241–1258, 9 abr. 2018.
- 150TA, L. E. et al. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum–DNA binding. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 6, p. 992–1002, dez. 2006.
- 151 TIAN, Xiaocui et al. β -Caryophyllene protects against ischemic stroke by promoting polarization of microglia toward M2 phenotype via the TLR4 pathway. **Life sciences**, v. 237, p. 116915, 2019.
- 152TSUBOTA, M. et al. Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, 30 out. 2019.
- 153UEDA, S. et al. Etodolac, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Attenuates Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in a Mouse Model of Mechanical Allodynia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 1, p. 53–60, 29 mar. 2012.
- 154VALENZANO, K. J. et al. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 5, p. 658–672, abr. 2005.
- 155WANG, G.; MA, W.; DU, J. β -Caryophyllene (BCP) ameliorates MPP+ induced cytotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1086–1091, jul. 2018.

- 156WHITFIELD, L. Handbook of Laboratory Animal Science: Essential Principles and Practices, 4th edition Edited by J Hau and SJ Schapiro (2021). Published by CRC Press, Boca Raton, FL 33487, USA. 994 pages Hardback (ISBN: 978-1138341807). Price £141.64. **Animal Welfare**, v. 31, n. 4, p. 561–563, nov. 2022.
- 157WU, Q. et al. CB2R agonist JWH-133 attenuates chronic inflammation by restraining M1 macrophage polarization via Nrf2/HO-1 pathway in diet-induced obese mice. **Life Sciences**, v. 260, p. 118424, nov. 2020.
- 158XU, J. J. et al. Spinal gene expression profiling and pathways analysis of a CB2 agonist (MDA7)-targeted prevention of paclitaxel-induced neuropathy. **Neuroscience**, v. 260, p. 185–194, fev. 2014.
- 159YANG, M. et al. Neuroprotective Effect of β -Caryophyllene on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of Necroptotic Neuronal Death and Inflammation: In Vivo and in Vitro. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, 26 out. 2017.
- 160YOUSSEF, D. A.; EL-FAYOUMI, H. M.; MAHMOUD, M. F. Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR- γ receptors. **Chemico-Biological Interactions**, v. 297, p. 16–24, jan. 2019.
- 161ZAJĄCZKOWSKA, R. et al. Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1451, 22 mar. 2019.
- 162ZANARDELLI, M. et al. Oxaliplatin Neurotoxicity Involves Peroxisome Alterations. PPAR γ Agonism as Preventive Pharmacological Approach. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102758, 18 jul. 2014.
- 163ZOPPI, S. et al. Regulatory role of the cannabinoid CB2receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 11, p. 2814–2826, 15 maio 2014.
- 164ZUO, Y. et al. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain**, v. 105, n. 3, p. 467–479, out. 2003.

ANEXO

Artigos publicados como autor ou coautor durante o período do doutorado:

USASP
US ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN



The Journal of Pain, Vol 22, No 8 (August), 2021: pp 996–1013
Available online at www.jpain.org and www.sciencedirect.com

Antioxidants Improve Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Tumor-Bearing Mice Model: Role of Spinal Cord Oxidative Stress and Inflammation



Jonathan Paulo Agnes,^{*} Vitória Wibbelt dos Santos,^{*} Raquel Nascimento das Neves,^{*} Rosângela Mayer Gonçalves,^{*} Marina Delgobo,^{*} Carolina Saibro Girardi,[†] Débora Denardin Lückemeyer,[‡] Marcella de Amorim Ferreira,[‡] Sérgio José Macedo-Júnior,[‡] Samantha Cristiane Lopes,^{**} Fernando Spiller,[§] Daniel Pens Gelain,[†] José Cláudio Fonseca Moreira,[†] Rui Daniel Prediger,^{**} Juliano Ferreira,[‡] and Alfeu Zanotto-Filho^{*}

^{*}Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, [†]Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, [‡]Laboratório de Farmacologia Experimental, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, ^{**}Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, [§]Laboratório de Imunobiologia (Lidi), Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil





Biochemical Pharmacology

Volume 163, May 2019, Pages 440-450



Late autophagy inhibitor chloroquine improves efficacy of the histone deacetylase inhibitor SAHA and temozolomide in gliomas

Rosângela Mayer Gonçalves^{a, b}, Jonathan Paulo Agnes^a, Marina Delgobo^a, Priscila Oliveira de Souza^b, Marcos P. Thomé^c, Luana Heimfarth^b, Guido Lenz^c, José Cláudio Fonseca Moreira^b, Alfeu Zanotto-Filho^a  

--



Research paper

Efficient identification of novel anti-glioma lead compounds by machine learning models

Bruno Junior Neves ^{a, b, 1}, Jonathan Paulo Agnes ^{c, 1}
, Marcelo do Nascimento Gomes ^{b, d, 1}, Marcio Roberto Henriques Donza ^e
, Rosângela Mayer Gonçalves ^c, Marina Delgobo ^c, Lauro Ribeiro de Souza Neto ^f
, Mario Roberto Senger ^f, Floriano Paes Silva-Junior ^f, Sabrina Baptista Ferreira ^e
, Alfeu Zanotto-Filho ^c , Carolina Horta Andrade ^b

Article Advance

Cancer Letters

Volume 502, 1 April 2021, Pages 44-57





COX-2 promotes mammary adipose tissue inflammation, local estrogen biosynthesis, and carcinogenesis in high-sugar/fat diet treated mice

Rosângela Mayer Gonçalves ^a, Marina Delgobo ^a, Jonathan Paulo Agnes ^a, Raquel Nascimento das Neves ^a
, Marcelo Falchetti ^a, Tuany Casagrande ^a, Ana Paula Vargas Garcia ^b, Thaynan Cunha Vieira ^b
, Nauana Somensi ^c, Maciel Alencar Bruxel ^d, Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes ^e, Alex Rafacho ^d
, André Báfica ^e, Daniel Pens Gelain ^c, José Cláudio Fonseca Moreira ^c, Geovanni Dantas Cassali ^b
, Alexander James Roy Bishop ^f, Alfeu Zanotto-Filho ^a



Role of toll-like receptor 4 and sex in 6-hydroxydopamine–induced behavioral impairments and neurodegeneration in mice

Nauana Somensi ^a  , Samantha Cristiane Lopes ^b, Juciano Gasparotto ^c
, Rosângela Mayer Gonçalves ^b, Camila Tiefensee-Ribeiro ^a, Daniel Oppermann Peixoto ^a
, Pedro Ozorio Brum ^a, Cibele Martins Pinho ^b, Jonathan Paulo Agnes ^b, Lucas Santos ^a
, Jade de Oliveira ^a, Fernando Spiller ^b, José Cláudio Fonseca Moreira ^a, Alfeu Zanotto-Filho ^b
, Rui Daniel Prediger ^b, Daniel Pens Gelain ^a

APÊNDICES

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICPETIVO DE UMA FORMULAÇÃO DE BCP EM NANOEMULSÃO.

As nanoemulsões de BCP foram sintetizadas em parceria com o grupo da Prof^a Dra Elenara Lemos Senna, e preparadas pela MSc. Rafaela Costa e Silva, no Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia (CCS-UFSC). As nanoemulsões foram preparadas por meio da técnica de emulsificação espontânea descrita por Bouchemal et al. (2004), como segue: para a preparação da fase orgânica, 300 mg ou 500 mg de β -cariofileno foram pesados diretamente em um cálice de 30 mL. Em seguida foram adicionados 1,0 mL ou 0,6 mL de uma solução de lecitina de soja (Lipoid S100) a 7 mg/mL em etanol. O volume final foi completado para 20 mL com etanol e as soluções foram mantidas em banho de ultrassom por 6 min para completa solubilização dos componentes. A fase aquosa foi constituída de 40 mL de uma solução de Tween ® 80 1,0% (m/v) previamente preparada. A fase orgânica foi então vertida no interior da fase aquosa com o auxílio de uma seringa e deixadas sob agitação por 10 min. Em seguida as emulsões foram submetidas à evaporação sob pressão reduzida a temperatura de 40°C para eliminação do solvente orgânico e concentração até o volume final de 10 mL ou 20 mL. Após a evaporação, as nano emulsões foram filtradas através de papel-filtro quantitativo com poro de 8,0 μ m. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. Com o objetivo de evitar a degradação do fármaco, as nano emulsões foram preparadas e armazenadas protegidas da luz e em temperatura ambiente. O teor de BCP livre e nas nano emulsões foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as análises foram realizadas em cromatógrafo LC-20AD (Shimadzu, Japão) equipado com uma bomba binária LC-20AD e acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A 206 (DAD). Os experimentos foram realizados em modo de fase reversa, utilizando uma coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 μ m), com temperatura de forno a 30 °C. O sistema foi operado em modo isocrático com fase móvel constituída acetonitrila:água (90:10, v/v), em fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μ L e os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 210 nm, com monitoramento dos espectros de UV/Vis na faixa de 200 a 400 nm. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Lcsolution (Shimadzu, Japão). O teor de BCP

encontrado após análise por CLAE da nanoemulsão foi $32,88 \pm 3,99$ mg/mL, os demais parâmetros farmacotécnicos estão apresentados na tabela 1.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta	pH
NE₁	232,65 ± 5,59	0,17 ± 0,01	-21,15 ± 1,45	4,18 ± 0,06
NE₂	237,15 ± 2,95	0,16 ± 0,03	-21,15 ± 1,15	4,12 ± 0,01
NE₃	185,35 ± 1,25	0,15 ± 0,03	-16,85 ± 1,75	4,09 ± 0,01
NE₄	189,95 ± 4,55	0,13 ± 0,06	-19,70 ± 1,30	4,11 ± 0,02

Tabela 1- Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nano emulsões contendo β -cariofileno.

Alguns estudos demonstram que estratégias para aumentar a estabilidade, entrega e absorção do BCP, aumentam a concentração plasmática do fármaco (LIU *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2018) e por consequência a biodisponibilidade, partindo desse pressuposto comparamos o efeito do BCP livre em óleo com uma formulação nano-emulsificada de BCP. Inicialmente comparamos o efeito da dose de 100 mg/kg de BCP livre com as doses de 10, 50 e 100 mg/kg da nanoemulsão. Os tratamentos com OXA, BCP livre ou nanoemulsão de BCP foram iniciados concomitantemente no dia 0 (protocolo preventivo).

Os resultados demonstram que os grupos tratados com BCP livre e as diferentes doses da nanoemulsão de BCP apresentaram efeito antinociceptivo, prevenindo o surgimento da hiperalgesia mecânica (Fig. 6A) e térmica ao frio (Fig. 6B), o efeito observado com as nanoemulsões nas diferentes doses foi semelhante ao BCP livre na dose de 100/mg/kg. possivelmente, a nanoemulsão de BCP melhora sua biodisponibilidade oral, dado que em doses menores, como 10 mg/kg, a nanoemulsão atinge eficácia antinociceptiva semelhante ao BCP livre em 100 mg/kg.

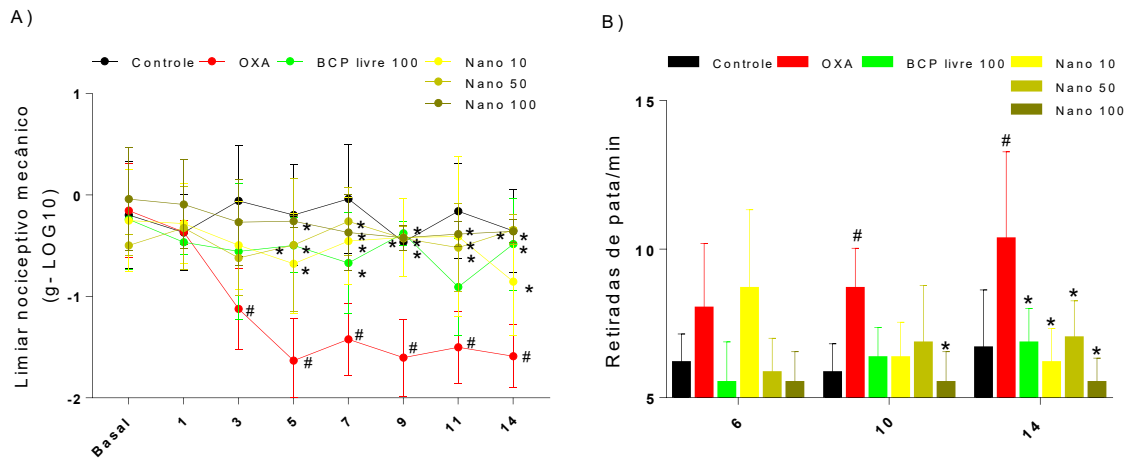


Figura Suplementar 1. Avaliação da atividade antinociceptiva de uma formulação de BCP em nanoemulsão em modelo de NIOX (protocolo preventivo). Camundongos Swiss fêmea foram tratados a partir do dia 0 com OXA (5 mg/kg, i.p, 48/48h), nanoemulsão de BCP (10, 50 e 100 mg/kg, v.o, 1x/dia) ou BCP livre (100 mg/kg, v.o, 1x/dia) durante 14 dias, o grupo controle recebeu veículo. A avaliação da nocicepção mecânica foi realizada através do teste de von Frey (A) no dia subsequente a uma nova dose de OXA e a nocicepção ao frio através do teste da placa fria (B), foi realizado nos dias 6, 10 e 14. # indica diferença estatística quando comparados ao grupo controle; * indica diferença do grupo OXA (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 6$ /grupo).