

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Maria Claudia dos Santos Bittencourt

**Investigação não-clínica da toxicidade e da eficácia analgésica de  
dibucaína tópica ácida em modelo de neuropatia sensorial dolorosa  
relacionada ao HIV**

**Florianópolis  
2023**

Maria Claudia dos Santos Bittencourt

**Investigação não-clínica da toxicidade e da eficácia analgésica de dibucaína tópica ácida em modelo de neuropatia sensorial dolorosa relacionada ao HIV**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof.Dr. Juliano Ferreira

Florianópolis

2023

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ezenir e Vilbam, que nunca mediram esforços para realizar todos os meus sonhos e me proporcionar a melhor formação possível. Mãe, obrigada por me colocar como prioridade na sua vida, por nunca me negar um colo e por me guiar através dos melhores caminhos. Pai, obrigada por ser a pessoa mais gentil e doce que conheço, por sempre me oferecer ternura e acolhimento todos os dias, por me encher de orgulho e inspiração com suas histórias de vida. Só estou aqui pelo amor que vocês sentem por mim. Obrigada.

Ao meu irmão caçula, Victor, que sempre fez questão de me motivar e expressar sua admiração e orgulho; e meus irmãos mais velhos Alex, Gislaine e Neiva, por todo o cuidado e conselhos. À minha avó Maria Clara, que carrego em meu nome e que me mantém protegida pelas suas orações.

Aos meus padrinhos Ana e Valber por todo o amparo e acolhimento desde sempre. Ao meu primo Lucas Felipe, que despertou minha admiração pela ciência e sempre me apoiou em todos os caminhos que escolhi seguir.

Ao meu querido e amado Samuel, meu companheiro durante esses últimos anos da graduação. A jornada final foi muito mais fácil e leve com você ao meu lado. Obrigada por me ouvir, acalmar e sempre acreditar em mim. Meu descanso veio de você e as melhores memórias também.

Aos meus amigos Larissa, Bianca, Douglas, João e Gabriela, a família que construímos em Floripa. Também meu afilhado Mateo, ser sua madrinha é fruto dessa amizade tão verdadeira. Esses anos sem vocês não fariam sentido! Amei viver cada momento da Universidade ao lado de vocês e o que mais quero é que continuemos caminhando juntos.

Ao meu orientador Juliano Ferreira, que me recebeu no LAFEX de braços abertos e me proporcionou aprendizados e vivências que levarei para toda vida. Às minhas mentoras e companheiras de laboratório, Ana, Roberta, Marcella, Mainara, Manuella e Clarice, que me ensinaram praticamente tudo que sei sobre pesquisa sempre com paciência e amor. Esse trabalho não existiria sem vocês e sou muito grata por todos os anos que trabalhamos juntas.

Um muito obrigada muito especial para a Universidade Federal de Santa Catarina por mudar minha vida, me trazer pessoas que hoje são minha família, e me proporcionar um ensino público, gratuito e de qualidade! Viva o ensino público, viva a saúde pública, viva o SUS!

## RESUMO

A neuropatia sensorial periférica (NS-HIV) é a complicação dolorosa mais frequente dos pacientes portadores do vírus HIV. O único tratamento que comprovadamente reduz esta condição são formulações contendo capsaicina, um agonista do TRPV1, um receptor expresso em subtipos de neurônios sensoriais (TRPV1+). A capsaicina resulta em efeito analgésico longo dependente da estimulação de calpaínas, porém vem acompanhado de efeitos adversos que limitam a adesão dos pacientes ao tratamento. Sabendo que o anestésico local dibucaína é um estimulador de calpaínas, hipotizamos que o seu reposicionamento em uma formulação tópica ácida poderia direcionar sua ação aos neurônios TRPV1+ e restringir sua toxicidade. Assim, desenvolvemos esta formulação e investigamos sua toxicidade e sua eficácia analgésica em modelo murino de NS-HIV. O modelo de NS-HIV foi induzido pela administração da proteína viral HIV-gp120 e o antirretroviral estavudina (d4T) em camundongos. Os aspectos sensoriais reflexos e afetivo-motivacionais da nocicepção foram avaliados através de aplicações de filamentos de Von Frey. Testes de tolerância local (dérmica) foram avaliados após administração tópica de creme ácido (pH 4, veículo) ou de creme ácido contendo dibucaína (0,1%) em camundongos C57/BL6 machos e fêmeas. Verificamos que o veículo ou a dibucaína resultaram em edema de baixa intensidade nas orelhas, mas não nas patas tratadas, sem causar eritema ou causar descamação, após dose única e ou repetida. O tratamento com dibucaína não aumentou marcadores moleculares de hipersensibilidade em linfonodos. O tratamento repetido com o veículo ou com dibucaína induziram efeito tipo-analgésico, prolongando os efeitos quando tratado com a dibucaína. Nossos resultados demonstram que a formulação tópica ácida com dibucaína em dose 0,1% é pouco tóxica e eficaz no modelo de NS-HIV, indicando que seu reposicionamento poderia ser útil no tratamento de dores neuropáticas.

**Palavras-chave:** TRPV1, dor, HIV, neuropatia sensorial periférica, dibucaína, reposicionamento, analgésicos.

## ABSTRACT

Peripheral sensory neuropathy (NS-HIV) is the most frequent painful complication in patients with the HIV virus. The only treatment proven to reduce this condition are formulations containing capsaicin, a TRPV1 agonist, a receptor expressed in subtypes of sensory neurons (TRPV1+). Capsaicin results in a long analgesic effect dependent on calpain stimulation, but it is accompanied by adverse effects that limit patients' adherence to treatment. Knowing that the local anesthetic dibucaine is a calpain stimulator, we hypothesized that its repositioning in an acidic topical formulation could direct its action to TRPV1+ neurons and restrict its toxicity. Therefore, we developed this formulation and investigated its toxicity and analgesic efficacy in a murine model of NS-HIV. The NS-HIV model was induced by the administration of the viral protein HIV-gp120 and the antiretroviral stavudine (d4T) in mice. The reflexive and affective-motivational sensory aspects of nociception were evaluated through applications of Von Frey filaments. Local (dermal) tolerance tests were evaluated after topical administration of acid cream (pH 4, vehicle) or acid cream containing dibucaine (0.1%) in male and female C57/BL6 mice. We verified that the vehicle or dibucaine resulted in low intensity edema in the ears, but not in the treated paws, without causing erythema or causing desquamation, after a single and/or repeated dose. Dibucaine treatment did not increase molecular markers of hypersensitivity in lymph nodes. Repeated treatment with vehicle or with dibucaine induced analgesic-like effect, prolonging the effects when treated with dibucaine. Our results demonstrate that the topical acid formulation with 0.1% dibucaine is little toxic and effective in the NS-HIV model, indicating that its repositioning could be useful in the treatment of neuropathic pain.

**Keywords:** TRPV1, pain, HIV, peripheral sensory neuropathy, dibucaine, repositioning, analgesics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Comparação entre o desenvolvimento e descobrimento de novos fármacos versus reposicionamento de medicamentos (Traduzido de Ashburn e Karl, 2004).....	<b>16</b>
<b>Figura 2</b> - Estratégia para o desenvolvimento do novo produto.....	<b>18</b>
<b>Figura 3</b> - Variação de peso em machos e fêmeas após tratamento único com o creme de dibucaína.....	<b>28</b>
<b>Figura 4</b> - Decurso temporal da variação do edema das orelhas em camundongos machos e fêmeas causado pelo tratamento único com formulação tópica ácida contendo dibucaína e seu veículo.....	<b>29</b>
<b>Figura 5</b> - Decurso temporal do edema causado pelo tratamento com isotiocianato de alila em fêmeas C57BL/6.....	<b>30</b>
<b>Figura 6</b> - Eritema após tratamento único com creme ácido contendo dibucaína e controles positivos.....	<b>31</b>
<b>Figura 7</b> - Variação de peso em machos e fêmeas durante tratamento repetido com creme de dibucaína ou veículo.....	<b>32</b>
<b>Figura 8</b> - Decurso temporal da variação do edema da orelha de machos e fêmeas C57BL/6, causado pelo tratamento repetido com formulação tópica ácida contendo dibucaína e seu veículo.....	<b>34</b>
<b>Figura 9</b> - Decurso temporal da variação do edema da pata de machos e fêmeas C57BL/6, causado pelo tratamento repetido com formulação tópica ácida contendo dibucaína e seu veículo.....	<b>35</b>
<b>Figura 10</b> - Eritema após tratamentos repetidos com creme ácido contendo dibucaína.....	<b>37</b>
<b>Figura 11</b> - Avaliação da expressão de marcadores pró-inflamatórios em camundongos C57BL/6 tratados com creme ácido contendo dibucaína.....	<b>38</b>
<b>Figura 12</b> - Decurso temporal do efeito do tratamento com creme ácido com dibucaína em fêmeas e machos C57BL/6 submetidos ao modelo de NS-HIV, demonstrado pela queda no limiar de retirada da pata 50% (g), avaliado pelo teste de von Frey.....	<b>42</b>
<b>Figura 13</b> - Decurso temporal do efeito do tratamento com creme ácido dibucaína e	

veículo em machos e fêmeas C57BL/6 submetidos ao modelo de NS-HIV, demonstrado pela avaliação do comportamento afetivo motivacional (AMB).....**45**

**Figura 14** - Decurso temporal do efeito do tratamento com creme ácido com dibucaína e veículo em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de NS-HIV, demonstrado pelo resultado da avaliação da hiperalgesia térmica ao calor.....**47**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>NS-HIV</b>	Neuropatia sensorial periférica relacionada ao HIV
<b>TRPV1</b>	Receptor vanilóide transitório subtipo 1 (do inglês, <i>Transient receptor potential vanilloid 1</i> )
<b>P&amp;D</b>	Pesquisa e Desenvolvimento
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
<b>gp-120</b>	Glicoproteína 120
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>NP</b>	Neuropatia periférica
<b>D4T</b>	Estavudina
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>LAFEX</b>	Laboratório de Farmacologia Experimental
<b>FDA</b>	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>TRPV1+</b>	Terminais com o Receptor de Potencial Transitório vanilóide 1 (do inglês, <i>Transient receptor potential vanilloid 1</i> )
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ARRIVE</b>	Pesquisa Animal: Relato de Experimentos In Vivo (do inglês: <i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i> )
<b>B</b>	Basal
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais

<b>IL</b>	Interleucina
<b>qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (do inglês, <i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico Mensageiro (do inglês, <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> )
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>TSLP</b>	Linfopoietina estromal tímica (do inglês, <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1 NEUROPATIA SENSORIAL PERIFÉRICA RELACIONADA AO HIV.....	10
1.2 CAPSAICINA NO TRATAMENTO DA NS-HIV.....	12
1.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS.....	13
1.2 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANALGÉSICOS.....	15
1.5 DIBUCAÍNA.....	16
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 ANIMAIS.....	19
4.2 FÁRMACOS E REAGENTES.....	20
4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CUTÂNEA INDUZIDA PELA FORMULAÇÃO.....	20
4.6 ANÁLISE MOLECULAR E COLETA DE AMOSTRAS.....	21
4.3 MODELO DE NEUROPATIA SENSORIAL RELACIONADA AO HIV E AO TRATAMENTO COM ANTIRRETROVIRAIS (NS-HIV).....	22
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO.....	23
<b>4.4.1 Sensibilidade mecânica.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4.2 Comportamento afetivo-motivacional (AMB) relacionado à         dor.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4.5 Sensibilidade térmica ao calor.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4.6 Efeitos adversos.....</b>	<b>25</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CREME ÁCIDO.....	25
<b>5.1.1. Avaliação da toxicidade em tratamento único.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.2. Avaliação da toxicidade em tratamentos repetidos.....</b>	<b>30</b>
5.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS	

EM ANIMAIS TRATADOS COM CREME ÁCIDO CONTENDO DIBUCAÍNA.	36
5.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANALGÉSICA DO CREME ÁCIDO COM DIBUCAÍNA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE NEUROPATIA SENSORIAL PERIFÉRICA (NS-HIV).....	38
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 6.000 condições médicas com fenótipos moleculares já definidos, porém apenas 500 delas possuem terapias aprovadas, e muitas apresentam eficácia sub-ótima ou toxicidade inaceitável (PRITCHARD et al. 2017). Além disso, o desenvolvimento de novos fármacos é algo desafiador, uma vez que o tempo e custos aumentam, enquanto as taxas de sucesso são baixas. De fato, o número de novos medicamentos aprovados por bilhões de dólares gastos em pesquisa e desenvolvimento, pela Food and Drug Administration (FDA) caiu pela metade a cada 9 anos desde 1950 (SCANNELL et al. 2012), caindo cerca de 80 vezes se ajustado à inflação. Considerando a magnitude e duração desse fenômeno, é possível entender que as abordagens atuais estão demonstrando um fraco efeito, e alternativas viáveis são necessárias para que a pesquisa continue em movimento.

### 1.1 NEUROPATIA SENSORIAL PERIFÉRICA RELACIONADA AO HIV

Dentro deste cenário, tem-se o vírus da imunodeficiência humana (HIV), um retrovírus classificado na subfamília Lentiviridae, que produz a base patológica da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), que permanece como um problema de saúde mundial com dimensões sem precedentes. Este vírus apresenta período de incubação prolongado antes do surgimento de sintomas da doença, causa infecção das células sanguíneas, do sistema nervoso e causa supressão do sistema imune. As células mais atingidas são os linfócitos T CD4+, e o mecanismo se dá pela ligação da proteína do envelope viral, a glicoproteína 120 (gp120), com a molécula CD4 nas células dendríticas (CHEN, 2019).

Conhecido há pouco mais de 39 anos, o HIV já causou cerca de 41 milhões de mortes no mundo (HIV data Global Report, 2021). Segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), desde o início da epidemia do HIV, aproximadamente 84,2 milhões de pessoas foram infectadas e, dessas, 40,1 milhões morreram de AIDS no mundo. Só no Brasil, desde o início da epidemia em 1980, foram notificados 360.323 óbitos tendo o HIV/aids como causa básica. Cerca

de 14 mil mortes são registradas todos os anos no país (Boletim Epidemiológico - HIV/AIDS, 2021). A infecção pelo HIV é considerada um grande problema de saúde pública mundial e necessita de investimento na procura de novos tratamentos para a tentativa de erradicar a doença. Toda esta morbi-mortalidade estimulou o desenvolvimento e a introdução global da terapia antirretroviral, o que impactou na sobrevivência de portadores de HIV, a qual tem aumentado drasticamente. Entretanto, apesar da alta potência que os medicamentos oferecem, existe uma falência terapêutica que é consequência da persistência e alta mutagenicidade do HIV, associadas ao uso de antivirais por um período prolongado. Também, os medicamentos atualmente em uso nem sempre são bem tolerados e exibem uma série de efeitos adversos, reduzindo a aderência e a continuidade do regime terapêutico complexo, que resulta em uma maior incidência de sequelas e comorbidades (WARRINER et al., 2014). Existem diversas complicações neurológicas relacionadas à infecção e ao tratamento antirretroviral, sendo a NS-HIV a mais comum forma de neuropatia periférica (NP) experimentada por pacientes HIV positivos. A prevalência agrupada de NP em pacientes que não fazem uso de terapia antirretroviral (TARV) foi estabelecida em 29% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 9%–62%) e aumentou para 38% (IC 95%: 29%–48%) quando observados pacientes em vários estágios da doença. Mais da metade dos pacientes com neuropatia relacionada ao HIV são sintomáticos (53%, IC 95%: 41%–63%). O manejo da neuropatia relacionada ao HIV é principalmente sintomático, embora haja evidências de que a interrupção de alguns tipos de TARV, como a didanosina, pode melhorar ou resolver os sintomas (JULIAN et al., 2021). Embora seja predominantemente encontrada em estágios avançados da infecção, a evidência patológica de neuropatia é universal entre os pacientes infectados pelo HIV na autópsia.

A neuropatia sensorial periférica (NS-HIV) é marcada por danos nos nervos que afetam as funções motora e sensorial, com dor espontânea ou evocada que pode seguir um padrão agudo ou crônico, incluindo sintomas de dormência, fraqueza, dor em queimação, sensação de formigamento e reflexos reduzidos. Os sintomas presentes nas extremidades periféricas geralmente progridem em gravidade e localização ao longo tempo em casos crônicos. (EGAN et al., 2021). A dor associada à NP pode levar à ansiedade, depressão, distúrbios do sono e outras comorbidades, reduzindo a qualidade de vida de um indivíduo. A etiologia dessa

neuropatia é associada à infecção viral, pela degeneração axonal distal resultante da ligação da glicoproteína 120 (gp120) do envelope viral a receptores de quimiocinas e a desregulação de macrófagos, que faz com que ocorra a liberação de citocinas neurotóxicas (KAMERMAN et al. 2012; JAZEBI et al., 2021). A neuropatia pode estar relacionada também ao tratamento com antirretrovirais, principalmente a estavudina (d4T) (KAMERMAN et al., 2012; BENNET et al., 2014; JAZEBI et al., 2021).

## 1.2 CAPSAICINA NO TRATAMENTO DA NS-HIV

Altos níveis de evidência clínica (meta-análises e ensaios clínicos controlados) demonstram que tanto os analgésicos tradicionais (antiinflamatórios não esteroides e opioides) quanto os fármacos eficazes no tratamento de outros tipos de dores neuropáticas (antidepressivos e anticonvulsivantes) são ineficazes na NS-HIV (PHILLIPS et al., 2014). Atualmente, o único tratamento que comprovadamente reduz a NS-HIV é baseado em formulações tópicas (cremes ou adesivos) contendo o princípio ativo da pimenta vermelha, a capsaicina (PHILLIPS et al., 2014; DERRY et al., 2017). Após a aplicação na pele, a capsaicina causa sensibilidade aumentada, seguida de um período com sensibilidade reduzida e, após aplicações repetidas, dessensibilização persistente. Ainda, adesivos de capsaicina de alta concentração (8%) foram desenvolvidos para aumentar a quantidade de substância liberada; a entrega rápida foi pensada para melhorar a tolerância, visto que os nociceptores cutâneos são desfuncionalizados rapidamente. A aplicação única evita a rejeição. Apenas a formulação em adesivo de capsaicina a 8% está disponível, com uma concentração de fármaco cerca de 100 vezes maior do que os cremes convencionais. A capsaicina tópica de alta concentração é administrada como uma única aplicação de adesivo na parte afetada. Deve ser aplicado sob condições altamente controladas, muitas vezes após anestesia local, devido à intensa sensação de queimação inicial que causa. Espera-se que os benefícios durem cerca de 12 semanas, quando outra aplicação pode ser feita. Ou seja, apesar da longa eficácia analgésica (até 3 meses) após aplicação na área de pele onde o paciente reporta dor, efeitos adversos limitam a adesão ao seu uso, especialmente a rápida sensação de queimação e vermelhidão da pele onde é aplicado o medicamento (DERRY et al., 2017).

A capsaicina é um agonista do receptor TRPV1, que, na pele, é expresso em terminais periféricos de um subtipo de neurônios sensoriais, os nociceptores TRPV1 positivos (TRPV1+). A capsaicina estimula esses nociceptores, o que é responsável pelos efeitos adversos transitórios e, posteriormente, causa a disfunção reversível de terminais neuronais TRPV1+, sendo responsável pelo efeito analgésico de longo prazo (ANAND e BLEY, 2011; CHUNG e CAMPBELL, 2016). Essa disfunção reversível é dependente da estimulação das calpaínas, que são uma classe de cisteína proteases ativadas por influxo de cálcio (WANG et al., 2017). Além disso, os terminais desses neurônios TRPV1+ se tornam hiperativos e hipersensíveis com o aumento na atividade e expressão do TRPV1 com o agonista (ÜÇEYLER e SOMMER, 2014), o que também pode explicar tanto a eficácia analgésica como os efeitos adversos. Assim, fármacos e medicamentos que desfuncionalizem o TRPV1 e que sejam mais eficazes e seguros são urgentemente necessários. Uma estratégia interessante para este desenvolvimento é o reposicionamento de fármacos.

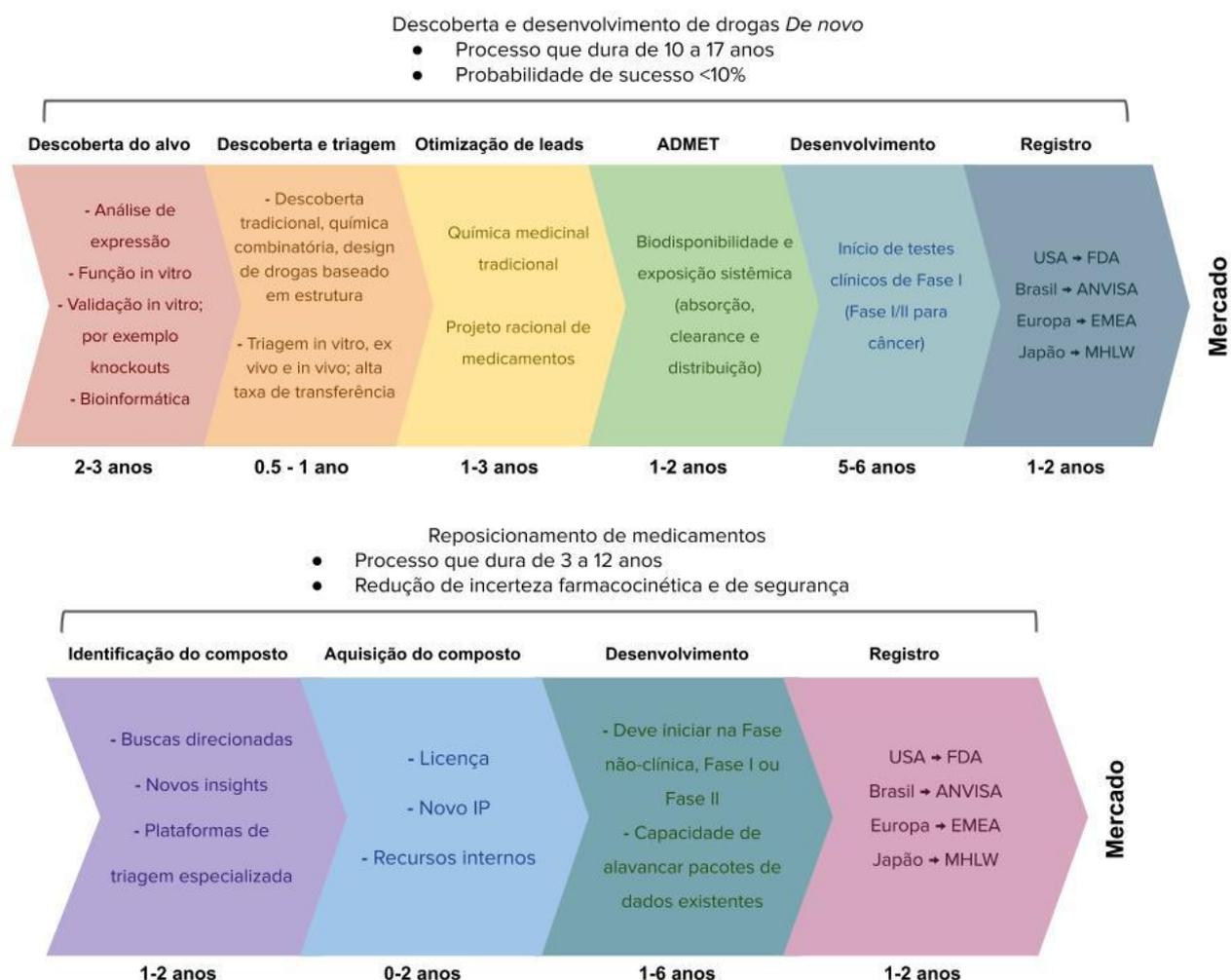
### 1.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

O processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é lento e oneroso, além de ser composto de várias etapas. Inicia-se com a identificação de potenciais alvos terapêuticos e o melhor modelo de validação em animais de experimentação. Em seguida, novos compostos são investigados para o tratamento e é mensurado o efeito terapêutico, em fase não-clínica (antigamente chamada de pré-clínica). A partir disso, os compostos selecionados são submetidos a refinamento e modificações para melhorar os parâmetros farmacológicos para que, assim, possam ir para testes toxicológicos em animais e depois para testes clínicos em humanos. Os ensaios clínicos de Fase I consistem em estudos de segurança do medicamento em pessoas saudáveis. Nos ensaios de Fase II, é testado se o medicamento atua em uma pequena parcela de indivíduos afetados pela doença. Os estudos de Fase III, finalmente, testam em um grande número de pacientes. Para finalizar o processo, é feito o pedido de registro em agência regulatória. Todo este processo dura em torno de 10 a 17 anos e tem um custo de 12 bilhões de dólares, e a probabilidade de sucesso é menor que 10% (XUE et al., 2018).

A indústria farmacêutica enfrenta um problema: a produção não tem acompanhado os gastos crescentes com Pesquisa e Desenvolvimento (P & D). Existe uma lacuna de produtividade, mesmo que empresas farmacêuticas tenham investido em novas tecnologias que prometem melhorá-la, como design de fármacos baseado em estruturas químicas, triagem biológica automatizada em alta escala (HTS), genômica e química combinatória (ASHBURN e KARL, 2004; XUE et al., 2018). Este problema, juntamente com obstáculos regulatórios e pressão mundial sobre os preços, trouxe a necessidade urgente de buscar a criatividade no desenvolvimento de fármacos, o que inclui novos usos, combinações de fármacos terapêuticamente complementares e versões melhoradas de medicamentos já existentes.

Nesse contexto, está o reposicionamento de medicamentos, conceito que emergiu com Ashburn e Karl em 2004 e que define o processo de encontrar novos usos fora do escopo da indicação médica original para medicamentos existentes. Essa estratégia oferece possibilidade de escapar do alto risco associado às tentativas de reduzir os prazos de P & D para corrigir a problemática da lacuna de produtividade (Figura 1), já que visa o reaproveitamento de fármacos mais antigos ou aqueles que falharam em testes iniciais. Essa definição original, desde então, foi ampliada para incluir substâncias ativas que falharam na fase clínica do seu desenvolvimento devido à sua toxicidade ou eficácia insuficiente, bem como drogas retiradas do mercado por questões de segurança (JOURDAN et al. 2020).

Especificamente esta alternativa tem riscos reduzidos, uma vez que os candidatos a este processo muitas vezes já passaram pelos vários estágios de desenvolvimento clínico e, assim, apresentam perfis farmacocinéticos e de segurança bem conhecidos (JOURDAN et al. 2020). Além disso, caminhos mais curtos para a clínica são possíveis devido à conclusão prévia de etapas importantes como triagem in vitro e in vivo, otimização química, toxicologia, fabricação a granel, desenvolvimento de formulações e até mesmo estágios iniciais do desenvolvimento clínico. Isso resulta em economia de tempo e custos, além da redução de riscos substanciais.



**Figura 1.** Comparação entre o desenvolvimento e descobrimento de novos fármacos versus reposicionamento de medicamentos (traduzido de Ashburn e Karl, 2004).

## 1.2 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANALGÉSICOS

Apesar de uma proporção significativa de pacientes com dor responder adequadamente a analgésicos opioides ou antiinflamatórios não-esteroidais, alguns pacientes não respondem e outros sofrem com efeitos adversos importantes (SISIGNANO et al. 2016). Por isso, a busca por alternativas de analgésicos eficazes e seguros é urgentemente necessária. Porém, particularmente difícil, uma vez que a variedade de contratempos que surgem no desenvolvimento de novos analgésicos levam muitas empresas farmacêuticas a abandonarem os estudos, o que resulta na falta de novos tratamentos promissores no campo da dor. Ainda que existam muitos alvos potenciais, há a dificuldade da tradução de compostos antinociceptivos para a

clínica, que é prejudicada pela falta de modelos preditivos em animais e humanos. Até mesmo receptores-alvo promissores ou canais iônicos, como o receptor vanilóide transitório subtipo 1 (TRPV1), o qual foi funcionalmente relacionado a estados de dor fisiopatológica em estudos pré clínicos (PATAPOUTIAN et al., 2009; YANG et al., 2023), são difíceis de atingir. Apesar do uso clínico generalizado e do sucesso da capsaicina (agonista do TRPV1), por exemplo, no tratamento da neuropatia pós-herpética, um antagonista de TRPV1 seletivo e seguro para uso clínico ainda é indisponível. Isso se reflete no fato de que agora, 18 anos após a primeira descrição funcional do TRPV1 no sistema nociceptivo, feita por Michael Caterina e o ganhador do prêmio Nobel de 2021, David Julius (CATERINA et al., 1997), ainda nenhum antagonista do TRPV1 é clinicamente disponível.

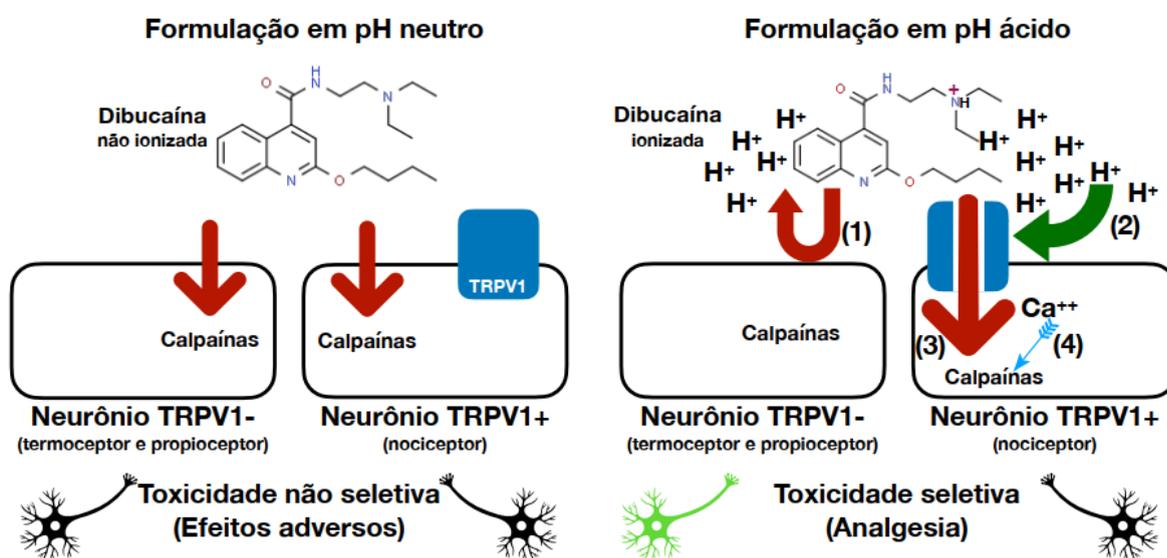
## 1.5 DIBUCAÍNA

A dibucaína é um anestésico local potente que atua primariamente pelo bloqueio intracelular de canais de sódio (SMITH e MOODIE, 1988). É atualmente usada para o tratamento de doenças proctológicas, como hemorróidas, em aplicação tópica em formulação 0,5%. A inibição dos canais de sódio previne a despolarização das membranas das células nervosas e inibe a propagação subsequente de impulsos ao longo do trajeto do nervo, limitando assim a excitação das terminações nervosas. Isso resulta em perda de sensibilidade. A inibição dos canais de sódio previne a despolarização das membranas das células nervosas e inibe a propagação subsequente de impulsos ao longo do trajeto do nervo, limitando assim a excitação das terminações nervosas. Isso resulta em perda de sensibilidade (PubChem, 2022).

Não existe indicação clínica para o uso da dibucaína na dor neuropática. O grande problema é que este fármaco apresenta a maior neurotoxicidade observada dentre os anestésicos locais (KASABA et al., 2003; YU et al., 2019). Porém, curiosamente, o mecanismo desta neurotoxicidade parece ser dependente da ação *off-target* na ativação de calpaínas, como a capsaicina faz, e não relacionado ao bloqueio intracelular dos canais de sódio. Assim, o efeito neurotóxico de uma formulação neutra de dibucaína na pele dos pacientes seria indesejável, então o ideal seria encontrar uma formulação que otimize o efeito analgésico e reduzisse os

efeitos adversos neurotóxicos.

Em relação aos aspectos químicos, a dibucaína é uma base fraca de pKa 8,85 e possui o grupamento funcional amina terciária. As formulações com esse fármaco são feitas normalmente em base neutra, na qual a molécula se encontra em sua maioria em estado não ionizado, o que facilita a difusão passiva por membranas de todos os neurônios sensoriais, o que causa efeitos tanto desejáveis como adversos. Então, a estratégia para reposicionar este medicamento é aumentar a seletividade do fármaco para direcionar sua ação aos neurônios TRPV1+ (Figura 2). Em formulação ácida, grande parte da dibucaína está ionizada e não passaria pelas membranas neuronais por difusão passiva e, assim, evitaria a neurotoxicidade não seletiva. A formulação mais ácida também pode promover a abertura de canais TRPV1 nos neurônios TRPV1+, uma vez que o pH ácido é um agonista do receptor. Com este canal aberto, poderá ocorrer a captação seletiva da forma ionizada da dibucaína (quaternário de amônio), pois o poro do TRPV1 é grande e permite a passagem de solutos de maior peso molecular. Além disso, a acidificação também irá induzir influxo de cálcio pelo TRPV1, que pode ajudar na ativação de calpaínas pela dibucaína e consequente diminuição da dose e toxicidade.



**Figura 2.** Estratégia para o desenvolvimento do novo produto (Figura elaborada pelo orientador).

Garantindo a participação de alvos para a dibucaína, resultados prévios de nosso laboratório também indicam que animais com NS-HIV possuem expressão

aumentada do RNAm do receptor TRPV1 e das calpaína 1 e 9 nos corpos celulares de neurônios sensoriais (resultados não publicados). Assim, acredita-se que a versão ionizada da dibucaína poderá ser captada de maneira seletiva em neurônios TRPV1+, causando efeito analgésico rápido, pelo bloqueio intracelular de canais de sódio, e de longa duração pela desfuncionalização mediada pela ativação de calpaínas, o que seria desejável em pacientes com dor relacionada a NS-HIV.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Considerando que i) existe uma crescente lacuna de produção que se instaura na indústria farmacêutica e deixa de acompanhar o dinheiro gasto, ii) parte dos pacientes com condições de dor crônica e neuropática não aderem ao tratamento disponível pelos efeitos adversos existentes, iii) a pesquisa por analgésicos seguros e eficazes, com menores efeitos colaterais e com alvos mais específicos é urgente para a inovação e acolhimento de maior gama de pacientes no campo da dor e iv) os escassos fármacos eficazes no tratamento de outros tipos de dores neuropáticas são ineficazes na NS-HIV, estudos pré-clínicos com objetivo de investigar o efeito tipo analgésico e a toxicidade desta nova formulação de dibucaína reposicionada, podem sugerir um novo alvo terapêutico e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Validar pré-clinicamente uma formulação ácida tópica com dibucaína para desenvolver um novo produto eficaz e seguro para o tratamento da dor em pacientes com NS-HIV.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Produzir formulação tópica estável com dibucaína, acidificada em pH 4,0;

- Verificar a toxicidade cutânea da formulação em camundongos saudáveis;
- Avaliar os possíveis efeitos tipo-analgésicos da formulação em camundongos submetidos ao modelo de NS-HIV.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem C57BL/6-UFSC (15-30g) machos e fêmeas, com oito a doze semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram acondicionados em caixas de acrílico com dois a seis animais por caixa, sendo mantidos em microisoladores, com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas e com acesso livre a água e ração. Os experimentos foram conduzidos de acordo com considerações éticas para a investigação experimental de dor em animais (ZIMMERMAN, 1983). O número de animais empregados e os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos procedimentos e dos tratamentos. Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados por monóxido de carbono (CO). Alguns procedimentos foram aplicados para maximizar a reprodutibilidade e minimizar vieses experimentais, tais como: cálculo prévio do número de animais, cegamento, randomização, definição de critérios de exclusão e os experimentos foram realizados na forma de blocos, em dias diferentes (HUANG et al., 2013). Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (1704260819).

O tamanho da amostra foi calculado baseando-se no desfecho primário, a sensibilidade mecânica verificada com filamentos de von Frey (ARMITAGE e BERRY, 1987; DEUIS et al., 2017), onde a amostra para um experimento com nível de significância de 5%, poder de teste 90%, sendo o teste de hipótese bicaudal, foi estimada considerando-se o desvio padrão (que foi baseado em dados prévios obtidos em estudo-piloto), e a diferença é detectada entre as médias dos grupos (pelo menos 30 %). Deste modo, resultados obtidos em estudo-pilotos conduzidos

em nosso laboratório revelaram, para o desfecho primário em questão, um desvio padrão médio de 0,5, e uma diferença a ser detectada entre os grupos de 0,6 gramas (pelo menos 30%). Diante desses dados e considerando o nível de significância e poder de teste acima descritos, estimou-se o tamanho da amostra como 8 animais, a fim de garantir a validade dos experimentos, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas poderão existir, nem tão pouco estar observando diferenças onde elas não poderão existir. Análise de Variâncias (ANOVA) de duas vias foi utilizada para comparação das variáveis, de medidas repetidas, seguida do teste de Sidak ou Dunnett. O Software GraphPad Prism 9 (graphPad, USA) foi utilizado para a realização dessas análises. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de “p” foram menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ). O teste de Chi-quadrado foi utilizado para dados não paramétricos (efeitos adversos).

## 4.2 FÁRMACOS E REAGENTES

A formulação tópica de dibucaína 0,1% foi desenvolvida com creme base Lanette (pH 6,0) e ajustado para pH 4,0 com a solução tampão amônio-glicolato (KILIC et al., 2019; PROKSCH et al., 2019). A proteína do envelope viral glicoproteína 120 (HIV-gp120) foi administrada por via intratecal nos modelos posteriormente descritos. Além disso, o antirretroviral estavudina (d4t) foi também administrado, por via endovenosa. As soluções de trabalho foram diluídas imediatamente antes da realização dos experimentos.

## 4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CUTÂNEA INDUZIDA PELA FORMULAÇÃO

A avaliação da possível toxicidade cutânea provocada pela formulação foi feita em dois momentos: em um tratamento único e em tratamentos repetidos. No tratamento único, os animais foram tratados com o creme ácido nas orelhas, sendo a direita com o fármaco e a esquerda apenas com creme veículo. Observou-se então o edema, eritema e descamação dos animais nos tempos de 1, 2, 4, 24, 48 e

72 horas após o tratamento. Na ausência de alterações no tecido após esse período, o experimento foi encerrado. Na etapa dos tratamentos repetidos, dois grupos de animais (sendo um veículo) foram tratados diariamente nas patas e orelhas direitas, e os mesmos parâmetros foram avaliados. Para monitorar o bem-estar animal, o peso também foi avaliado diariamente em ambas fases.

A medida do edema foi expressa como aumento da espessura da orelha após a aplicação de irritantes químicos. Para obtenção dessa mensuração, a orelha foi medida antes (basal) e após indução da resposta inflamatória utilizando um micrômetro digital (Mitutoyo® S-293) em animais anestesiados com isoflurano. O micrômetro foi aplicado perto da ponta da orelha, distal dos sulcos cartilagosos e sempre higienizado entre um animal e outro. A espessura foi registrada em milímetros. Para reduzir variações, um único pesquisador realizou todas as medidas ao longo de cada experimento. O nível de eritema foi pontuado utilizando uma tabela de comparação, contendo manchas vermelhas, da qual foi obtida uma escala de eritema, onde 0, nenhum; 1, leve; 2, moderado; 3, grave; 4, muito grave, como descrito por van der Fits e colaboradores (2009). Posteriormente, para avaliar o potencial de sensibilidade dérmica da formulação, foi realizado PCR em tempo real (qPCR) conforme Anderson et al. (2020), para a pesquisa de indicadores de hipersensibilidade: a proteína de ligação ao cálcio S100A8, as interleucinas 4 e 10, além do receptor TLR4.

#### 4.4. ANÁLISE MOLECULAR E COLETA DE AMOSTRAS

A coleta de amostras para testes moleculares (qPCR) foi realizada de animais cujos decurso do tratamento foram avaliados previamente. Nos procedimentos de coleta de material biológico para as análises moleculares, os animais foram eutanasiados com a utilização de algodão embebido no anestésico isoflurano. Não foi utilizada a solução contendo cetamina e xilazina.

No final dos experimentos (dia 8), os animais foram eutanasiados com isoflurano e amostras de linfonodo auricular foram coletadas para testes moleculares.

A fim de quantificar o RNA de genes relacionados à hipersensibilidade, foram testados a proteína de ligação ao cálcio S100 A8, o receptor TLR4, e as

interleucinas 4 e 10, as quais medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias. A proteína S100A8 é produzida por células imunes como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, que estão envolvidas na resposta imune inata à infecção e inflamação (WANG et al., 2018). Promove o recrutamento e ativação de células imunes, e modula a produção de mediadores inflamatórios. Seus níveis podem servir como um biomarcador de inflamação em várias doenças, incluindo artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e sepse. Também, o receptor TLR4 é uma proteína receptora transmembranar que está envolvida no reconhecimento de vários patógenos e sinais endógenos de perigo e, quando o receptor reconhece esses ligantes, ele desencadeia uma cascata de sinalização que leva à ativação de várias células imunes e à produção de mediadores inflamatórios (LUCAS e MAES, 2013). Assim, sua expressão está associada à indução de uma resposta pró-inflamatória, sendo crucial sua avaliação neste experimento, junto com a proteína S100A8 e as interleucinas 4 e 10, as quais medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias.

O RNA foi isolado utilizando o kit ReliaPrep™ RNA tissue Mini Prep System (Promega) baseado no protocolo do fabricante e o RNA foi quantificado utilizando um Nanodrop (ND-1000). Para cada amostra, a razão A260/280 e A260/230 foi utilizada para verificar a pureza do RNA. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e utilizado nas reações de qPCR (Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real). A quantificação dos produtos específicos foi feita utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), um equipamento StepOne™ (Applied Biosystems) de acordo com a reação: 10 min 95 °C e 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos). Um passo final foi incluído para obter a curva de dissociação (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos, 95 °C por 15 segundos). Os valores de Cq (ciclos de quantificação) foram normalizados utilizando a média de dois genes de referência,  $\beta$ -actina (Actb) e hipoxantina guanina fosforibosil transferase (Hprt). A quantidade relativa de RNA foi calculada utilizando o método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e a especificidade de cada oligonucleotídeo em todas as amostras foi confirmado por um único pico na análise da curva de melting (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### 4.5. MODELO DE NEUROPATIA SENSORIAL RELACIONADA AO HIV E AO TRATAMENTO COM ANTIRRETROVIRAIS (NS-HIV)

O modelo experimental de NS-HIV, elucidado por Lückemeyer et al. em 2023, foi induzido pela administração sistêmica do agente inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa estavudina (d4T) (JOSEPH *et al.*, 2004; WALLACE *et al.*, 2007) (dia 0 e 4), de forma concomitante com a administração intratecal (HYLDEN; WILCOX, 1980) da proteína HIV-gp120 (MILLIGAN *et al.*, 2001) (dia 0, 3 e 6), de acordo com Huang *et al.* (2013). No 13º dia após a indução deste modelo ocorre o auge do efeito hiperalgésico, com isso, os animais receberam os tratamentos neste dia onde: metade dos animais receberam a formulação tópica contendo o fármaco (dibucaína 0,1%), e a outra metade recebeu apenas o creme base lanette (veículo). Posteriormente seguiram sendo feitas as avaliações dos parâmetros nociceptivos como descrito posteriormente. A fim de aumentar a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, o modelo foi induzido em machos e em fêmeas.

#### 4.6. TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO

##### 4.6.1 Sensibilidade mecânica

A avaliação da sensibilidade mecânica foi feita com o uso de filamentos de von Frey (CHAPLAN *et al.*, 1994; TEODORO *et al.*, 2013; DEUIS *et al.*, 2017). A hiperalgesia mecânica foi avaliada com filamentos de von Frey (0,008 - 4 g). O limiar de 50% de resposta foi determinado pelo método de up-and-down de Dixon (1980), de acordo com Chaplan *et al.* (1994). Para isso, a pata traseira dos animais é estimulada com um de uma série de filamentos de von Frey com incrementos logarítmicos crescentes. O primeiro filamento utilizado é aquele que normalmente é capaz de evocar a resposta de retirada em 50% dos animais testados (0,4 g). O filamento é aplicado durante 5 segundos. Na ausência de retirada da pata, a resposta será considerada negativa, e o próximo filamento, mais calibroso, será então utilizado. No caso de resposta de retirada positiva, o filamento imediatamente menos calibroso será então aplicado. É considerada como resposta positiva a retirada da pata do contato com o filamento ou comportamento de sacudir ou lambear

a pata no momento ou imediatamente após a estimulação. Em casos de ambulação ou de movimentos não relacionados à resposta nociceptiva no momento da aplicação do filamento, a resposta é considerada ambígua, e é realizada nova estimulação com um intervalo de 1 minuto. São realizadas 6 medidas, com um intervalo de aproximadamente 1 minuto entre cada uma. No caso de 6 respostas positivas desde a primeira aplicação, o teste é finalizado (CHAPLAN *et al.*; 1994; DEUIS *et al.*, 2017). O conjunto de 6 respostas obtido é utilizado para o cálculo do limiar 50% de resposta (DIXON, 1965; DEUIS *et al.*, 2017), como mostrado a seguir:

$$\text{Limiar 50\% (g)} = 10^{[X + (K \cdot \delta)]}$$

Onde:

X = valor do último filamento de von Frey usado (em log);

K = valor tabelado para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (DIXON, 1965);

$\delta$  = diferença média (em log) entre os estímulos.

#### 4.6.2 Comportamento afetivo-motivacional (AMB) relacionado à dor

Neste teste os animais são ambientados por 30 minutos, em caixas de acrílico, separados individualmente, sobre uma plataforma cuja superfície de malha de arame permite o acesso às patas dos animais. Após o período de ambientação é iniciado o procedimento, o qual consiste em observar a pata do animal por um período de 1 minuto, imediatamente após a aplicação de cada filamento de von Frey. De acordo com a posição da pata durante o período de observação, três escores diferentes são atribuídos: Escore 0: pata do animal toca completamente a superfície da plataforma; Escore 1: superfície plantar do animal toca a superfície da plataforma parcialmente ou com a porção lateral da pata; Escore 2: elevação da pata, o animal não toca a superfície da plataforma com a pata; Escore 3: o animal chacoalha, lambe ou morde a pata.

Como é realizada uma medida após cada aplicação do filamento de von Frey, no final do teste temos um total de 6 medidas, sendo o resultado final expresso como o somatório dos escores obtidos nas 6 medidas (XU e BRENNAN, 2010; CORDER *et al.*, 2017), dividido pelo número de respostas positivas a exposição ao

filamento de von Frey. Estas avaliações ocorrem em conjunto com as medidas do teste de von Frey e todos os animais passam por esta avaliação, sendo considerada uma avaliação secundária ao teste de von Frey.

#### **4.6.5 Sensibilidade térmica ao calor**

A avaliação da sensibilidade ao calor foi feita com estimulação de calor radiante (HARGREAVES et al., 1988; DEUIS et al., 2017) brevemente na pata ou cauda dos animais. O tempo necessário para a retirada da pata do estímulo foi cronometrado. Posteriormente, foram realizados os tratamentos e, após diferentes tempos, foram feitas novas medições do tempo de retirada da pata ou da cauda dos animais frente ao mesmo estímulo. Uma redução no tempo de retirada da pata ou da cauda foi considerada como hiperalgesia térmica (percepção exagerada do estímulo nocivo), enquanto que aumento nesse tempo foi considerado como efeito antinociceptivo ou hipoalgesia. A fim de evitar dano tecidual, foi permitido um tempo máximo de exposição à fonte de calor de 20 segundos. Os resultados foram expressos em segundos (s).

#### **4.6.6 Efeitos adversos**

Os efeitos adversos locais relacionados ao tratamento foram avaliados pela observação de edema, eritema e comportamentos sensoriais e motores anormais. A função motora-sensorial foi avaliada por reflexo de pisar (do inglês, *stepping* - elevação da pata causada pelo contato do dorso da pata tratada na borda da mesa) (TERASHIMA et al., 2013), pelo reflexo de retirada ao pinçamento da pata ipsilateral, e pelo teste de agarrar (do inglês, *grasping test*) no qual o animal é colocado em uma grade que é imediatamente rotacionada para verificação da capacidade de permanecer agarrado à mesma (ATTAL et al., 1990).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CREME ÁCIDO**

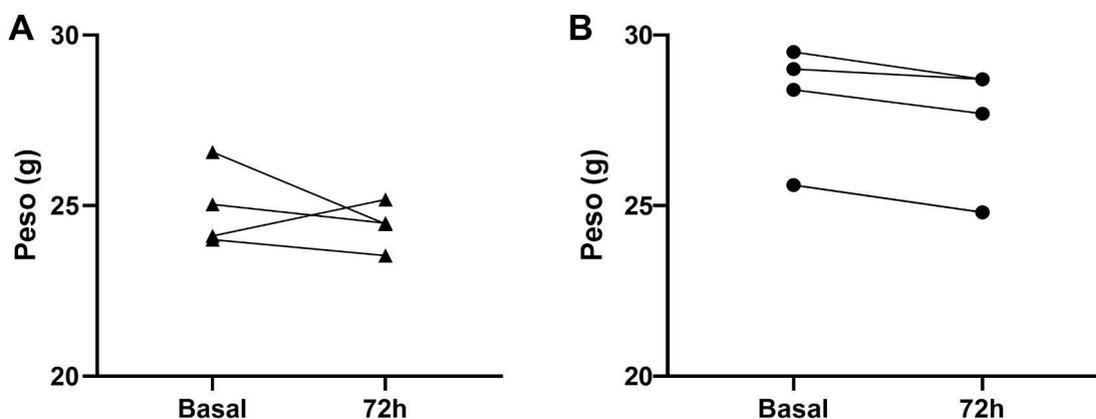
A dibucaína é um dos anestésicos locais mais potentes disponíveis, mas não é amplamente utilizado em formulações farmacêuticas pela elevada neurotoxicidade que apresenta (KASABA et al., 2003; YU et al., 2019). Para direcionar sua ação e restringir essa neurotoxicidade, a estratégia utilizada neste trabalho foi a de acidificar a formulação contendo o fármaco. Assim, o pH baixo, agonista dos receptores TRPV1, pode encaminhar o fármaco através dos poros desses receptores para que ocorra uma captação seletiva da forma ionizada da dibucaína, que não passaria pelas membranas neuronais por difusão passiva por conta de seu peso molecular. Além disso, o pH ajudaria a induzir influxo de cálcio que pode ajudar na ativação de calpaínas, mecanismo do efeito analgésico. O presente estudo mostra que a aplicação tópica da formulação acidificada em orelhas e patas de camundongos não causa respostas inflamatórias agudas com formação de edema ou eritema, mas produz efeito tipo-analgésico nos animais submetidos ao modelo NS-HIV.

#### **5.1.1. Avaliação da toxicidade em tratamento único**

Estudos prévios evidenciaram que a aplicação de uma emulsão água/óleo com pH 4 tem efeitos benéficos na hidratação da pele, regeneração das lamelas lipídicas e conteúdo lipídico, além de reacidificar a pele após dano à barreira epidérmica (KILIC et al., 2019). A aplicação de uma emulsão de pH 4 demonstrou melhorar a barreira epidérmica, bem como a organização do estrato córneo. Além disso, essa acidificação por meio de tampão glicolato demonstrou ser a única que reduziu significativamente o aumento do pH da pele relacionado com a ruptura da barreira da pele (PROKSCH et al., 2019). A formulação utilizada, então, foi produzida adicionando dibucaína na concentração de 0,1% ao creme base Lanette - uma emulsão - e acidificada com tampão amônio-glicolato em pH 4,0.

Inicialmente, verificamos se o tratamento único com o creme acidificado em pH 4,0 de dibucaína (em uma orelha) e com veículo (na outra orelha), poderia causar algum tipo de toxicidade sistêmica que pudesse alterar o peso dos animais (Figura 3). O tratamento em camundongos fêmeas não alterou significativamente o peso dos animais 72 horas após a aplicação quando comparado com os valores basais (Teste t de Student,  $t=0,79$ ,  $df=3$ ,  $P=0,48$ ). O mesmo ocorreu em animais machos que não tiveram alteração do peso 72 horas após o tratamento quando

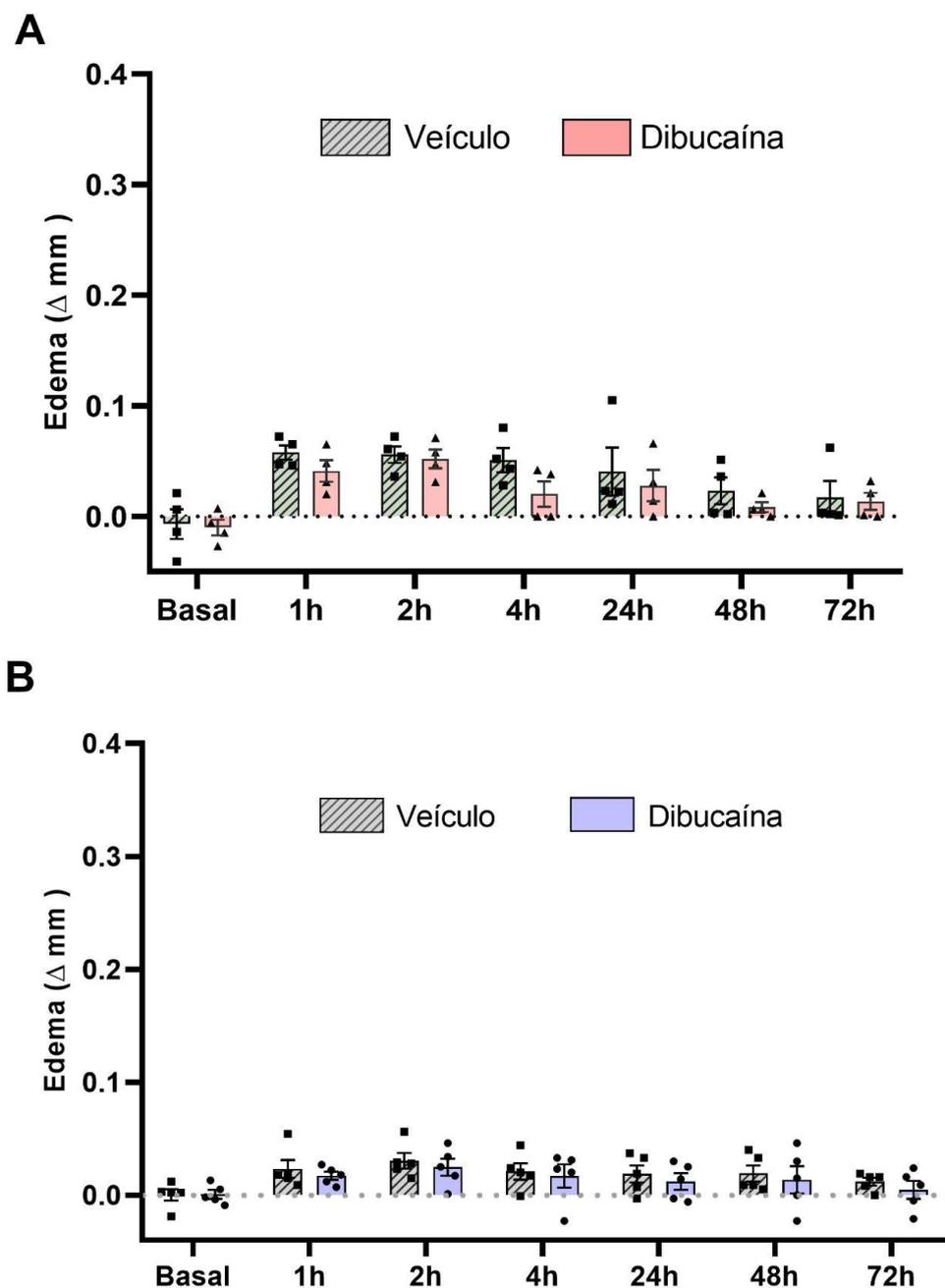
comparado aos valores basais (ANOVA de uma via,  $F(3, 16) = 0,12$ ,  $P=0,94$ ). Assim, o tratamento único pareceu não causar toxicidade sistêmica que acarretasse na diminuição do peso corporal.



**Figura 3. Variação de peso em machos e fêmeas após tratamento único com o creme de dibucaína.** Efeito do tratamento único com o creme de dibucaína (em uma orelha) e com veículo (na outra orelha) no peso dos camundongos fêmeas (em A, N=4) ou machos (em B, N=5) antes (basal) e 72h após tratamento. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram avaliados com Teste *t* de Student pareado.

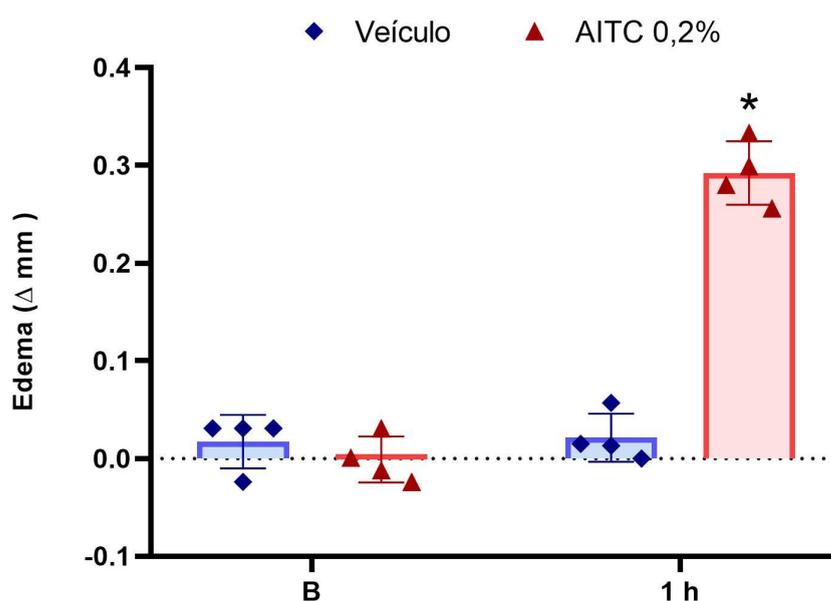
Posteriormente, investigamos se o tratamento único também com o creme de dibucaína em uma orelha e com veículo na outra orelha, poderia causar irritação na pele tratada (Figura 4). O tratamento com dibucaína ou veículo aumentou a espessura das orelhas tratadas quando comparado aos valores basais tanto em camundongos fêmeas (Figura 4A) ( $F(1,58, 9,50) = 9.371$ ,  $P<0,01$ ) quanto machos (Figura 4B) ( $F(2,93, 23,46) = 3.404$ ,  $P=0.03$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de *F* para o fator tempo). Porém, a espessura das orelhas tratadas com dibucaína não foi diferente da espessura das orelhas tratadas com veículo em nenhum tempo analisado (1 a 72 horas), tanto em fêmeas ( $F(6, 36) = 0,4848$ ,  $p=0,81$ ) quanto em machos ( $F(6, 48) = 0,08$ ,  $P=0,99$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de *F* para a interação entre os fatores tempo x tratamento). Assim, apesar do tratamento tópico com veículo ou dibucaína causarem edema de orelha (provavelmente devido à fricção do tecido durante a aplicação), a dibucaína não aumentou o mesmo quando comparada ao veículo, indicando que a dibucaína não é um agente irritante

per se.



**Figura 4. Decurso temporal da variação do edema das orelhas em camundongos machos e fêmeas causado pelo tratamento único com formulação tópica ácida contendo dibucaína e seu veículo.** Resultado da avaliação da espessura da orelha, em micrômetros, de camundongos fêmeas (N=8, em A) ou machos (N=10, em B) antes (Basal) e até 72 horas após tratamento, comparados com o veículo, creme lanette acidificado em pH 4,0. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

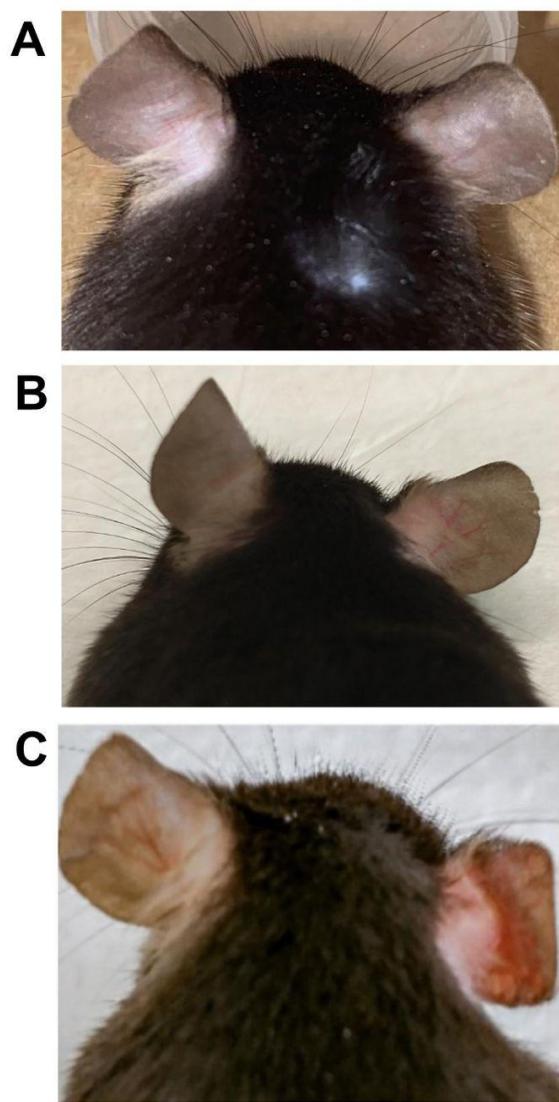
Para verificar a sensibilidade do nosso ensaio, verificamos intensidade do edema produzido pelo tratamento com o agente irritante isotiocianato de alila (AITC, princípio ativo do óleo de mostarda) quando aplicado topicamente em camundongos fêmeas. Quando comparado ao veículo, o tratamento único com AITC causou grande aumento na espessura da orelha 30 minutos e 1 hora após a aplicação ( $F(3, 12) = 45,86$ ,  $P < 0,01$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de  $F$  para a interação entre os fatores tempo x tratamento). Assim, nosso ensaio demonstrou ser sensível para detectar o efeito edematogênico de um agente sabidamente irritante em animais e em seres humanos.



**Figura 5. Decurso temporal do edema causado pelo tratamento com isotiocianato de alila em fêmeas C57BL/6.** Resultado da avaliação da espessura da orelha, em micrômetros, influenciada pelo tratamento (4 animais) comparados com o veículo (2 animais), resultantes de 1 bloco experimental no tempo basal (B) e 1h após tratamento. As linhas verticais mostram o erro padrão da média (E.P.M) de 1 bloco experimental piloto analisado por ANOVA de duas vias com medidas repetidas. \* $P < 0,01$  quando comparado aos valores basais.

Além de edema, agentes irritantes também podem causar eritema na pele tratada. Confirmando os dados anteriores, não fomos capazes de detectar eritema nas orelhas tratadas com veículo ou com dibucaína (como pode ser visto em foto representativa da Figura 6A), pois os escores de eritema foram iguais a zero em todos os tempos analisados (1 a 72 horas)

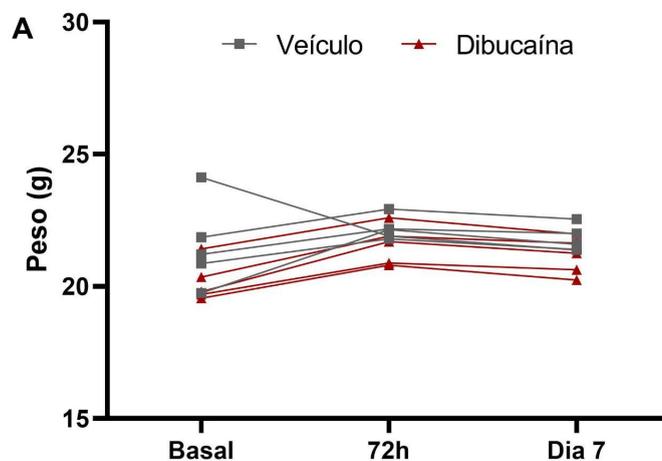
tanto em machos quanto em fêmeas (dados não mostrados). Por outro lado, o tratamento com AITC produziu eritema nas orelhas tratadas (como pode ser visto em foto representativa da Figura 6B, que teve escore de eritema igual a 2 e na figura 6C, com escore 4). Analisados em conjunto, verificamos que a administração de dibucaína não causou efeito irritante de pele superior ao veículo em camundongos, indicando sua segurança quando administrada somente uma vez na pele da orelha.

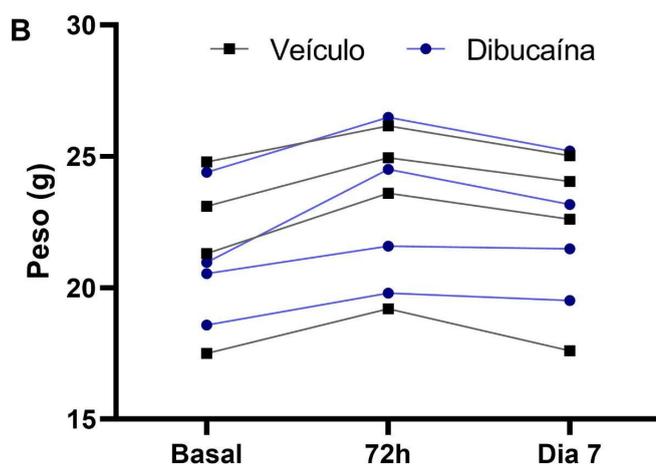


**Figura 6. Eritema após tratamento único com creme ácido contendo dibucaína e controles positivos.** Camundongos machos e fêmeas foram tratados com creme ácido (veículo) ou contendo dibucaína 0,1% (n=18). Em A, foto representativa da irritação 72h após o tratamento com creme ácido com dibucaína, escore 1. Em B, a foto representativa do escore 2 e em C de escore 4, resultantes de irritação causada após tratamento com AITC 0,2%.

### 5.1.2. Avaliação da toxicidade em tratamentos repetidos

Posteriormente, verificamos se o tratamento repetido 1 vez ao dia, por 7 dias, com o creme de dibucaína ou com veículo (em grupos diferentes de animais), poderia alterar o peso dos animais tratados (Figura 7). O tratamento foi aplicado nas orelhas e patas direitas dos animais. Similar ao tratamento único, o tratamento repetido com dibucaína não alterou o peso dos animais quando comparado ao tratamento com veículo em nenhum tempo avaliado, tanto em fêmeas (Figura 7A) ( $F(6, 48) = 1,43, P=0,22$ ) quanto em machos (Figura 7B) ( $F(6, 36) = 1,62, P=0,17$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de F para a interação entre os fatores tempo x tratamento). Assim, o tratamento repetido com dibucaína também pareceu não causar toxicidade sistêmica que pudesse causar perda de peso nos animais.

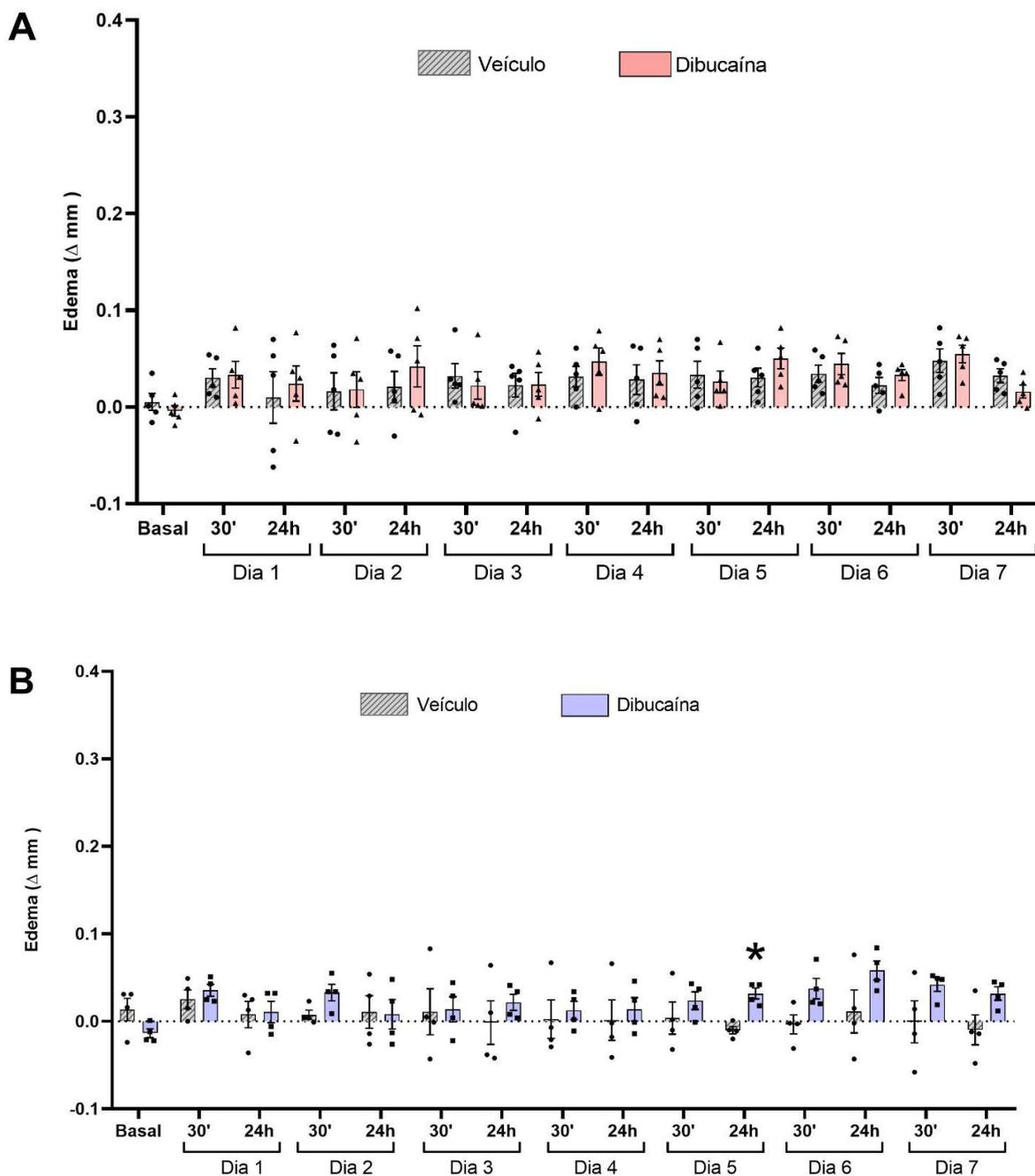




**Figura 7. Variação de peso em machos e fêmeas durante tratamento repetido com creme de dibucaína ou veículo.** Em A, peso em gramas das fêmeas (N=10) na medida basal, 72h e no sétimo dia de tratamento. Em B, peso em gramas dos machos (N=8) nos mesmos tempos. Resultados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

Também investigamos se o tratamento repetido com o creme de dibucaína pode causar irritação na orelha tratada (Figura 8). O tratamento com dibucaína ou veículo aumentou a espessura das orelhas tratadas quando comparado aos valores basais em camundongos fêmeas ( $F(4,23, 36,21) = 2,78, P < 0,01$ ), mas não em machos ( $F(2,90, 17,39) = 1,51, P = 0,24$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de F para o fator tempo). Porém, a espessura das orelhas tratadas com dibucaína não foi diferente da espessura das orelhas tratadas com veículo em nenhum tempo analisado (1 a 72 horas) em fêmeas ( $F(14, 112) = 0,63, P = 0,84$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de F para a interação entre os fatores tempo x tratamento). Por outro lado, a espessura das orelhas tratadas com dibucaína foi maior do que nas orelhas tratadas com veículo em machos ( $F(14, 84) = 2,03, P = 0,02$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de F para a interação entre os fatores tempo x tratamento). A análise post-hoc (teste de Sidak) revelou diferença significativa entre os tratamentos somente 24 horas após a quinta aplicação ( $P = 0,03$ ).

Assim, a dibucaína aplicada repetidamente na pele da orelha causou edema maior do que o veículo somente transitoriamente, indicando um baixo potencial irritante da dibucaína.

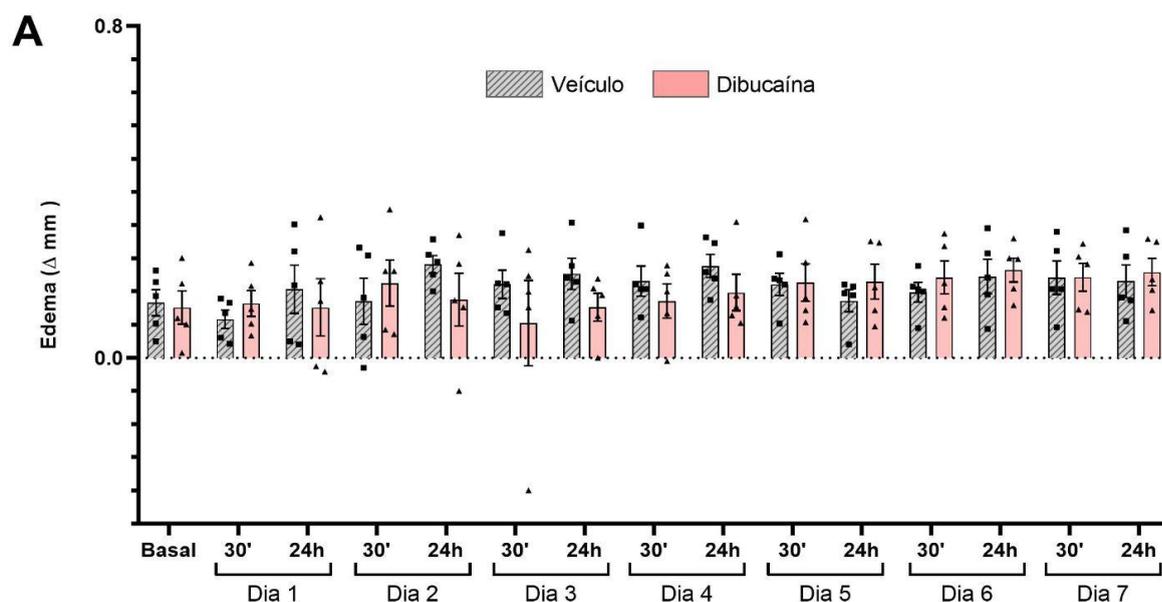


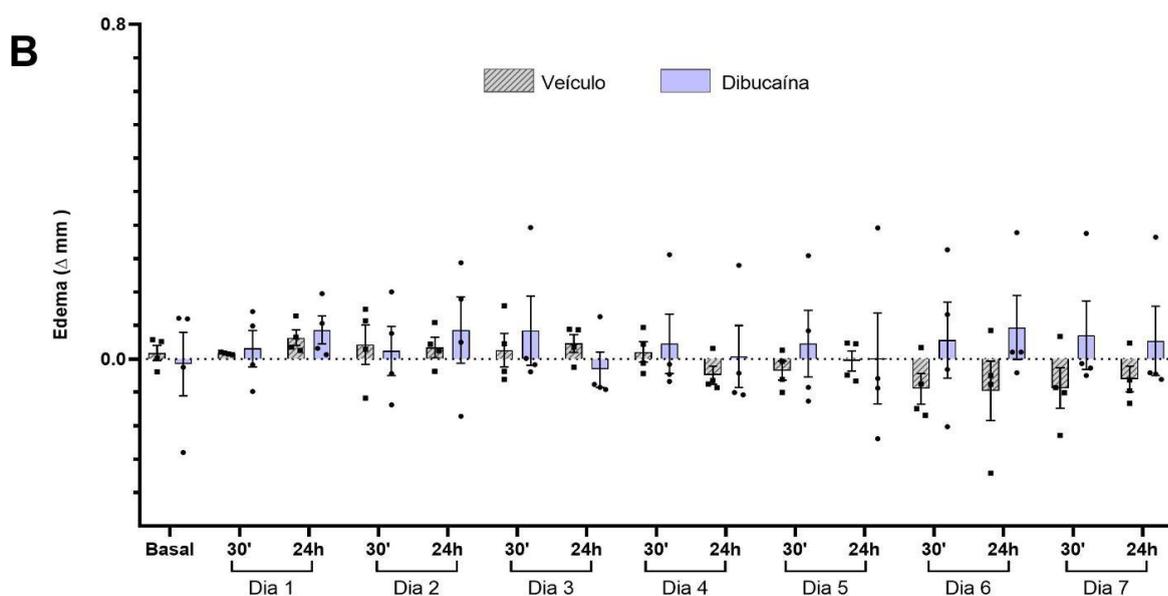
**Figura 8. Decurso temporal da variação do edema da orelha de machos e fêmeas C57BL/6, causado pelo tratamento com formulação tópica ácida contendo dibucaína e seu veículo.** Resultado da avaliação da espessura da orelha de fêmeas (N=10) e machos (N=8), em micrômetros, influenciada pelo tratamento comparados com o veículo, resultantes de 1 bloco experimental e as linhas verticais mostram o erro padrão da média (E.P.M) de 1 bloco experimental piloto analisado por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Sidak. \*P <0,05 quando comparado aos valores basais.

Além disso, verificamos se o tratamento repetido com o creme de dibucaína pode causar irritação na pele da pata tratada. O tratamento com

dibucaína ou veículo não aumentou a espessura das patas tratadas quando comparado aos valores basais tanto em camundongos fêmeas ( $F(3,21, 25,65) = 1,44, P=0,25$ ), quanto em machos ( $F(2,52, 15,11) = 0,64, P=0,57$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de F para o fator tempo). Também a espessura das patas tratadas com dibucaína não foi diferente da espessura das patas tratadas com veículo em nenhum tempo analisado (1 a 7 dias) em fêmeas ( $F(14, 112) = 1,20, P=0,28$ ) ou em machos ( $F(14, 84) = 1,04, P=0,42$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de F para a interação entre os fatores tempo x tratamento).

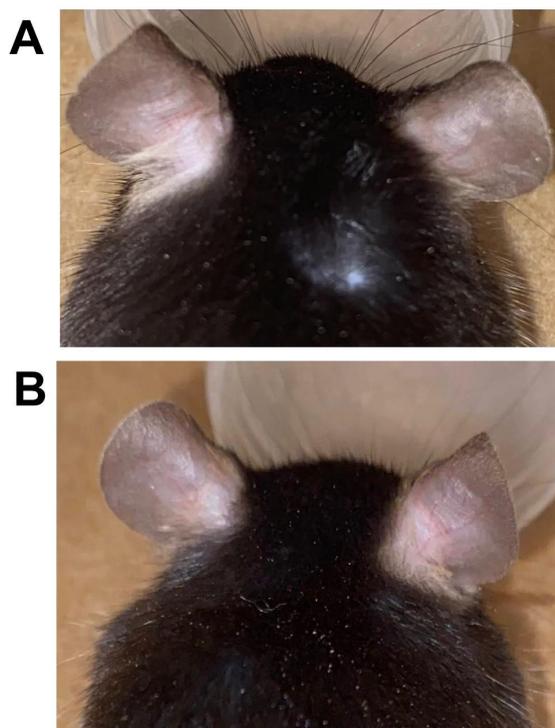
Assim, a dibucaína aplicada repetidamente na pele da pata não causou edema, indicando ausência de efeito irritante da dibucaína neste tecido.





**Figura 9. Decurso temporal da variação do edema da pata de machos e fêmeas C57BL/6, causado pelo tratamento com formulação tópica ácida contendo dibucaína e seu veículo.** Resultado da avaliação da espessura da pata, em micrômetros, influenciada pelo tratamento comparados com o veículo, resultantes de 1 bloco experimental. Em A, fêmeas (N=10) e em B, machos (N=8). As linhas verticais mostram o erro padrão da média (E.P.M) de 1 bloco experimental piloto analisado por ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

Confirmando os dados anteriores, não fomos capazes de detectar eritema nas orelhas ou nas patas tratadas repetidamente com veículo ou com dibucaína, como pode ser visto em fotos representativas (Figura 10A e 10B), pois os escores de eritema foram iguais a zero em todos os tempos analisados (1 a 72 horas) tanto em machos quanto em fêmeas (dados não mostrados). Analisados em conjunto, verificamos que a administração de dibucaína em aplicação única ou repetida causou pouca ou nenhuma irritação de pele, indicando sua segurança para uso tópico.



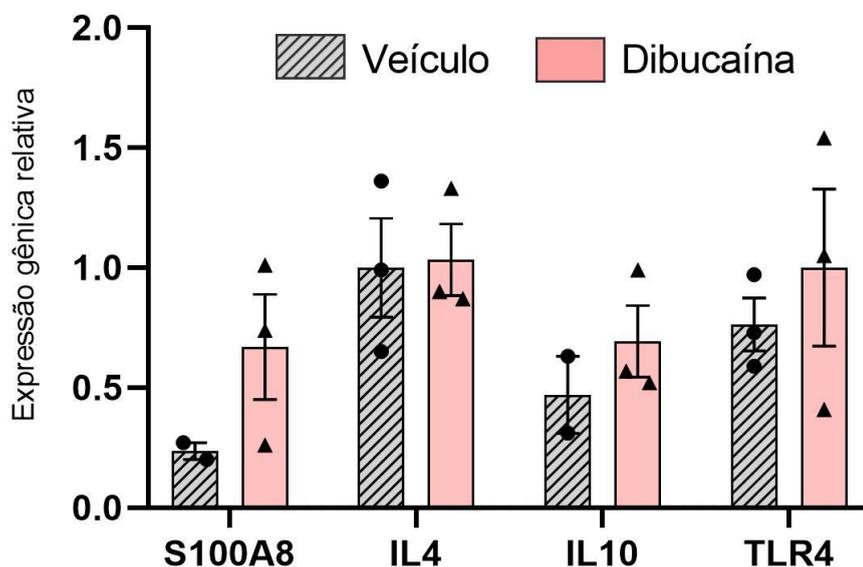
**Figura 10. Eritema após tratamentos repetidos com creme ácido contendo dibucaína.** Fotos representativas de irritação após 7 dias de tratamento com creme ácido (veículo) ou contendo dibucaína 0,1% (n=18). Camundongos machos e fêmeas foram submetidos ao tratamento. Em A e B, escore zero observado nos grupos experimentais.

Após os 7 dias de aplicação repetida foram coletadas as orelhas e patas tratadas, bem como seus linfonodos drenantes. Estes tecidos foram processados para detecção de inflamação ou imunogenicidade por padrão de expressão gênica utilizando a técnica de qPCR (ANDERSON et al., 2020).

### 5.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ANIMAIS TRATADOS COM CREME ÁCIDO CONTENDO DIBUCAÍNA

Avaliamos os linfonodos auriculares de camundongos fêmeas que foram coletados ao final dos tratamentos repetidos. A análise de PCR em tempo real não demonstrou variação de expressão dos marcadores entre os grupos, o que revela que o tratamento não é imunogênico. Também, a expressão gênica relativa não foi diferente em nenhum tempo analisado ( $F(3,12) = 0,23$ ,  $P = 0,88$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas). Assim, nosso tratamento não alterou marcadores

moleculares de inflamação e de imunogenicidade no linfonodo que drenou os tecidos tratados.



**Figura 11. Avaliação da expressão de marcadores pró-inflamatórios em camundongos C57BL/6 tratados com creme ácido contendo dibucaína.** Dados expressos como a média de N=3 para cada grupo analisado. As linhas verticais mostram o erro padrão da média (E.P.M).

Segundo resultados de Anderson et al. em 2020, após a exposição por via cutânea de camundongos a produtos químicos sensibilizadores e irritantes, a expressão das interleucinas 4 e 10 aumentou significativamente após 7 dias de exposição em todas as concentrações de teste, o que não foi encontrado em nossos resultados. O receptor TLR4 também foi avaliado e apenas a exposição a um agente, o Triclosan, aumentou sua expressão na pele, uma vez que desempenha papel na resposta imune contra esse agente. Esses achados também contrastam com nosso estudo, que não detectou aumento significativo na expressão do TLR4 ou diferença entre os grupos.

Além disso, a expressão do sinal de perigo linfopoiética estromal tímica (TSLP) foi analisada e foi observada nenhuma expressão ou pouca, que cessa após o quarto dia de exposição. No entanto, ao contrário da expressão de TSLP, a expressão da proteína S100a8 continua a aumentar durante os 7 dias de exposição para todas as concentrações dos produtos químicos testados. Portanto, a expressão gênica observada no nosso estudo não foi significativa, o que vai em desacordo

com o comportamento da proteína S100a8 em situação de dano tecidual e hipersensibilidade, e demonstra a segurança da formulação ácida desenvolvida por nós.

## 5.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANALGÉSICA DO CREME ÁCIDO COM DIBUCAÍNA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE NEUROPATIA SENSORIAL PERIFÉRICA (NS-HIV)

Dados prévios do nosso grupo já demonstraram que o modelo experimental NS-HIV utilizado neste projeto, caracterizado no Laboratório de Farmacologia Experimental, causa nocicepção prolongada (por pelo menos 28 dias), indicando que o mesmo possui boa validade facial e de constructo (LÜCKEMEYER et al., 2023). Além disso, este modelo também apresentou alta validade preditiva (sensível a um fármaco que causa analgesia em seres humanos com neuropatia sensorial, a ziconotida). Testes comportamentais para detectar diferenças quanto às atividades corriqueiras de roedores também foram aplicados a este modelo e não foram observadas alterações motoras que prejudicam atividades conservadas em roedores (comportamento de fazer toca) ou prejuízo motor nestes animais (teste de força e teste do ninho). A caracterização da dor induzida pelo vírus HIV e por antirretrovirais foi realizada utilizando a HIV-gp120, uma proteína do envelope viral do HIV e a estavudina, antirretroviral (LÜCKEMEYER et al., 2023). Também é importante salientar que embora o sexo feminino seja um preditor de NS-HIV e a incidência de NS-HIV seja maior em mulheres do que em homens (MEHTA et al., 2011), a maioria dos estudos com modelos animais de NS-HIV foram realizados em roedores machos e não compararam a relação entre sexo e o desenvolvimento de comportamentos dolorosos.

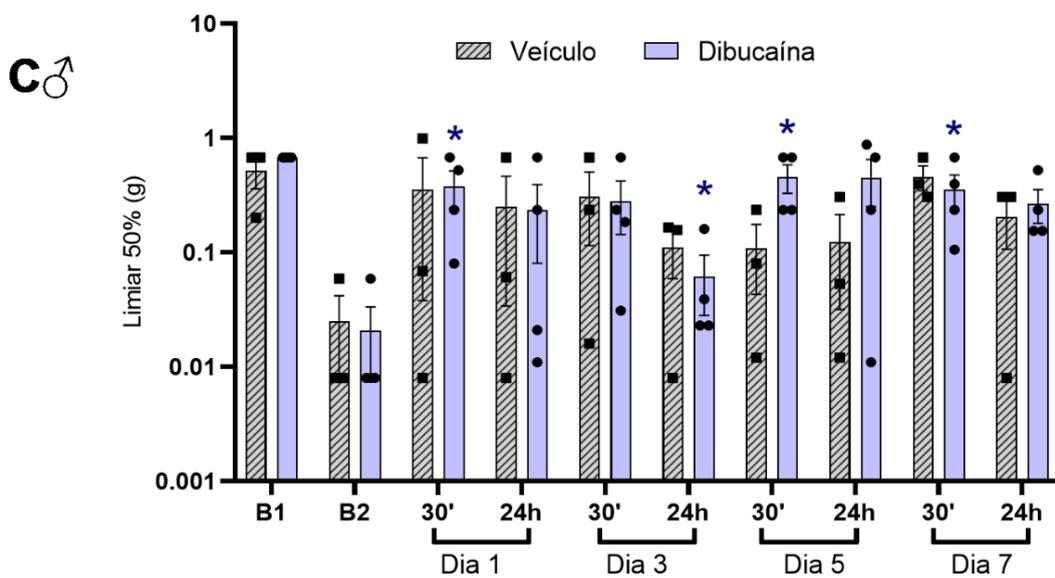
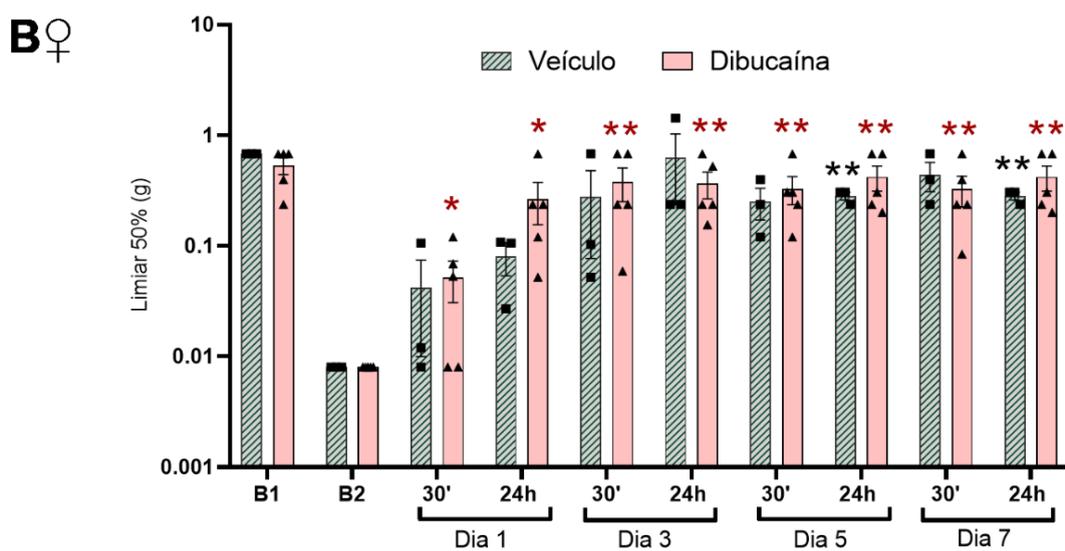
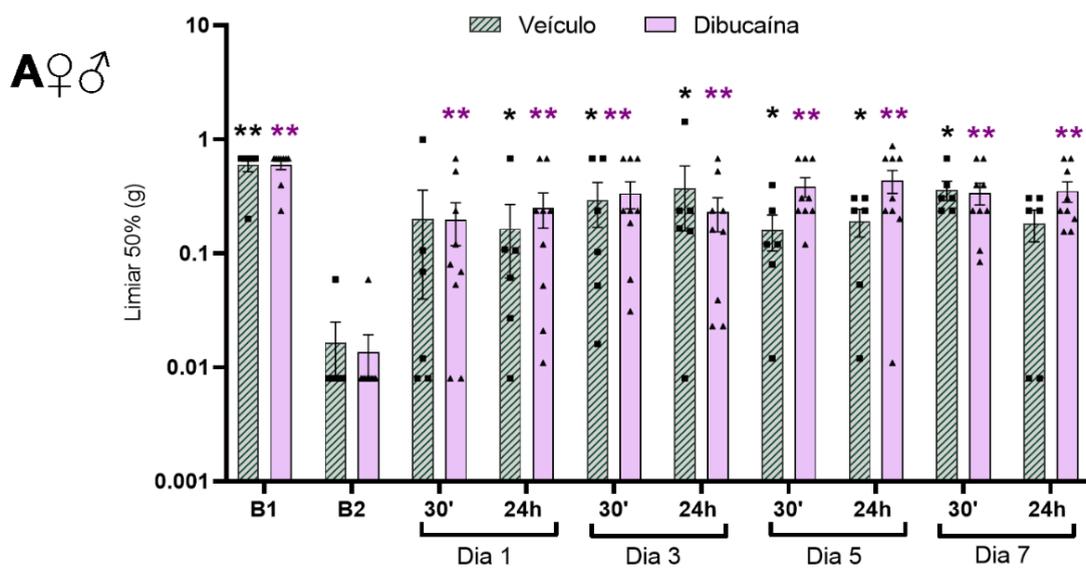
Recentemente a definição de dor foi atualizada pela primeira vez desde 1979 como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a dano tecidual real ou potencial, foi ampliada com a adição de seis notas principais e elevou a etimologia da palavra dor para um contexto valioso adicional o qual nos diz que a dor é sempre uma experiência individual influenciada em vários graus por fatores biológicos e também sociais, portanto, dor e nocicepção são fenômenos diferentes. A dor não pode ser inferida apenas a partir

da atividade nos neurônios sensoriais, mas através de experiências individuais (IASP, 2020). Esse conceito reforça nossa ideia de que ao utilizar uma espécie como modelo animal para estudar a dor neuropática, devemos nos atentar para a avaliação de comportamentos típicos de dor expressados pelos roedores. A manifestação dos sintomas de dor é muito variável. Com isso, o presente projeto utilizou testes comportamentais para avaliar a nocicepção frente a diferentes estímulos. O teste de von Frey avalia a sensibilidade mecânica evocada por estímulos. O teste de AMB avalia também a sensibilidade mecânica, relacionado a parte emocional da dor, é um teste secundário ao von Frey, realizado durante as próprias aplicações de filamento de von Frey. Após os tratamentos, os animais passaram por testes comportamentais para verificação da nocicepção. Cada teste comportamental consiste em uma avaliação diferente de nocicepção, com isso, todos os animais submetidos ao presente projeto passaram pelos testes de von Frey (que foi utilizado como desfecho primário para o cálculo do n) e AMB (teste secundário ao von Frey).

Com objetivo de confirmar comportamentos relacionados à dor pelo modelo NS-HIV, os animais foram submetidos à avaliação da hiperalgesia mecânica pelo teste de Von Frey (Figura 12). Devido ao N reduzido no grupo veículo, 3 fêmeas e 3 machos, inicialmente focamos nossa análise nos dados de fêmeas e machos agrupados (Figura 12A). A análise de variância de duas vias com medidas repetidas revelou que somente o fator tempo, mas não o fator tratamento ou a interação, foi significativa para explicar a variação [ $F(4,15;53,4)=14,56$ ,  $P<0,01$ ]. De fato, o pós-teste indicou que a indução da NS-HIV causou uma redução dos limiares de retirada (hiperalgesia mecânica) quando comparados com os valores antes da indução do modelo (diferença entre B2 e B1). Este resultado está de acordo com dados prévios do laboratório onde observamos uma intensa e prolongada hiperalgesia mecânica em camundongos tratados com gp120 e estavudina (LÜCKEMEYER et al., 2023). Também semelhante ao estudo anterior, verificamos que a hiperalgesia mecânica foi mais intensa nas fêmeas tratadas. Diferenças sexuais em pacientes com NS-HIV muitas vezes resultam de neuropatia tóxica induzida por drogas antirretrovirais, cuja incidência é tipicamente maior em mulheres e é mais prevalente com fármacos antirretrovirais mais antigos e tóxicos (como a estavudina). Os mecanismos envolvidos neste dimorfismo sexual são pouco conhecidos e são atribuídos a diferenças de peso ou índice de massa corporal, bem

como a alterações hormonais que podem afetar a distribuição e o metabolismo dos fármacos.

Por outro lado, o tratamento tanto com creme base lanette acidificado em pH 4,0 (veículo) quanto com o creme lanette com dibucaína 0,1% também acidificado em pH 4,0 reverteram esta hiperalgesia, com este efeito aparecendo mais precocemente (já aos 30 minutos do dia 1) e durando mais tempo (até 24 horas do dia 7). Quando os sexos foram analisados isoladamente, também foi detectado que o fator tempo foi significativo em fêmeas ou machos [ $F(3,00;18,01)=24,21$ ;  $P<0,01$  e  $F(3,08;15,42)=5,09$ ;  $P=0,01$ ; respectivamente].



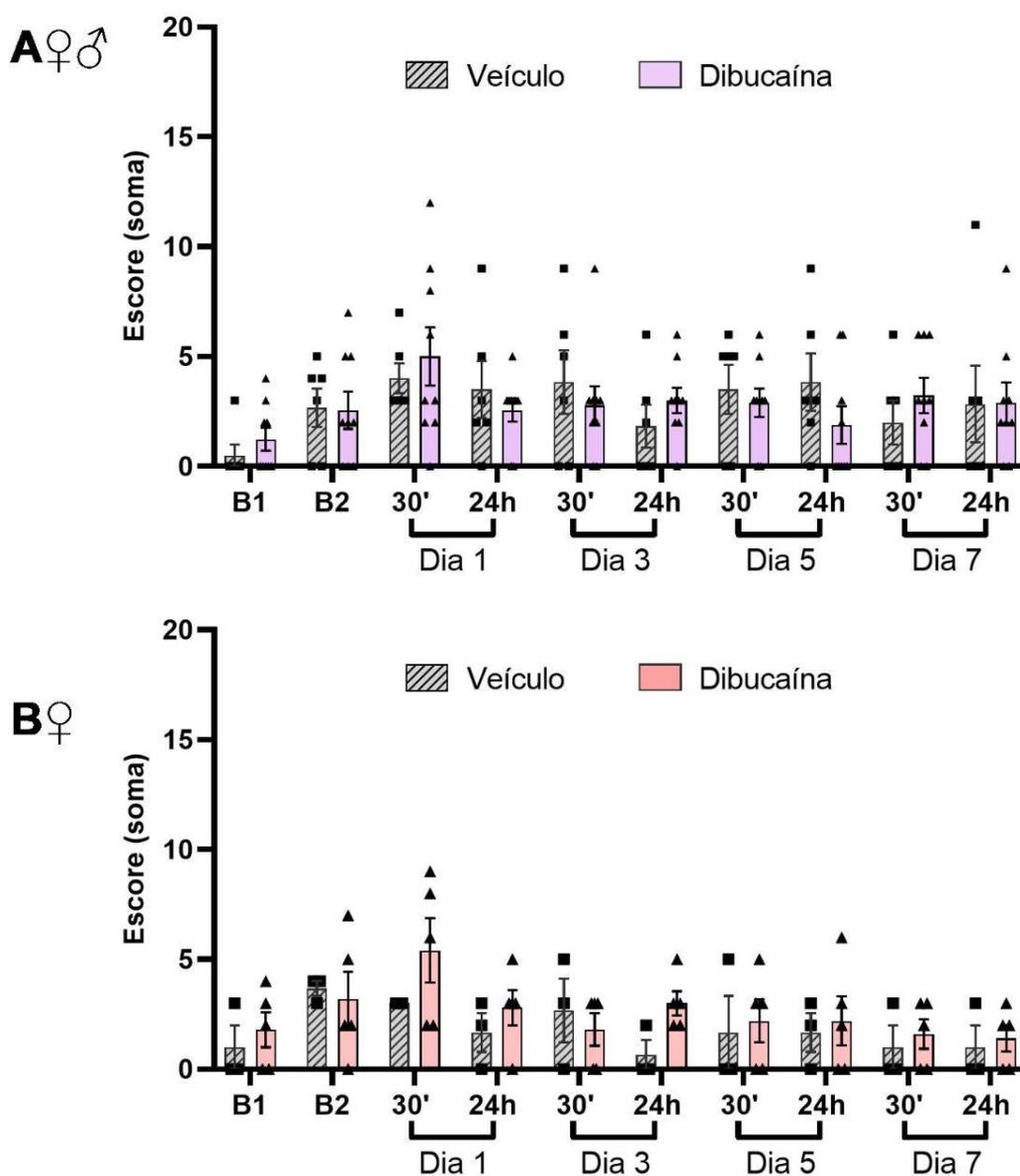
**Figura 12. Decurso temporal do efeito do tratamento com creme ácido com dibucaína em fêmeas e machos C57BL/6 submetidos ao modelo de NS-HIV, demonstrado pela queda no limiar de retirada da pata 50% (g), avaliado pelo teste de von Frey.** Em A, dados de machos e fêmeas agrupados, em B, fêmeas e em C, machos. As linhas verticais mostram o erro padrão da média (E.P.M) de 1 bloco experimental piloto analisado por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Dunnet. B1 - medida basal antes da indução do modelo NS-HIV, e B2 - medida após a indução, no pico da hiperalgesia. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 quando comparados a valores de B2.

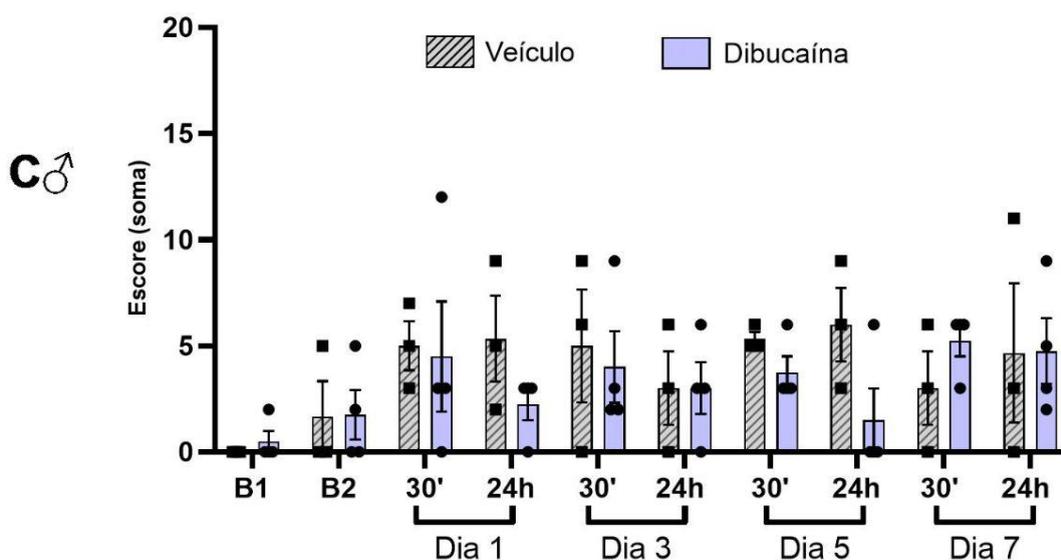
O efeito anti-hiperalgésico causado pelo creme contendo dibucaína confirmou nossa hipótese inicial. Porém, foi curioso que o creme ácido veículo também causou efeito anti-hiperalgésico. A causa deste efeito *per se* é ainda desconhecida, mas o mesmo pode ser explicado por, pelo menos duas maneiras: i) o creme acidificado poderia reduzir a ativação de neurônios TRPV1 positivos, já que o pH baixo também é um agonista que dessensibiliza o receptor TRPV1 (SANZ-SALVADOR et al., 2012); ii) o ácido glicólico utilizado para acidificar o creme poderia reduzir a ativação de neurônios TRPV1 positivos, já que o ácido glicólico ativa queratinócitos via estimulação do TRPV1 (DENDA et al., 2010). É importante também salientar que estudos clínicos demonstraram que cremes acidificados (pH) com glicolato (sem dibucaína) produzem efeitos benéficos na pele de idosos, nominalmente restaura a barreira epidérmica rompida e melhora a estrutura das lamelas lipídicas (ANGELOVA-FISCHER et al., 2018; KILIC et al., 2019).

Além disso, pode-se dizer que as retiradas reflexas não refletem adequadamente os fenômenos clínicos da dor, que envolvem não apenas uma dimensão sensorial, mas também afetiva (KLINCK et al., 2017). Aqui, além de um reflexo de retirada da pata, observamos que a aplicação do filamento de von Frey também induziu AMB relacionada à dor em camundongos tratados com gp120 + estavudina. As respostas motivacionais afetivas são comportamentos complexos, cujo aparecimento indica a motivação e a excitação do sujeito para fazer cessar as sensações aversivas, protegendo o tecido ou buscando uma rota de fuga. Esses comportamentos foram usados para detectar as dimensões afetivas da experiência de dor em camundongos (CORDER et al., 2017).

Assim, a partir das respostas positivas (retirada da pata) após o teste de von Frey, foi observado por 1 minuto o comportamento afetivo-motivacional (AMB) dos animais (Figura 13). Contrastando com nossos resultados anteriores

(LÜCKEMEYER et al., 2023), não fomos capazes de detectar aumento no comportamento afetivo-motivacional após a indução da neuropatia ou após o tratamento, quando analisados os animais machos e fêmeas, em conjunto ou isoladamente ( $F(9, 117) = 0,7891, P=0,63$ ) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e valores de F para a interação entre os fatores tempo x tratamento, seguido do teste de Sidak). Esta claramente foi uma limitação do presente estudo, que não foi capaz de detectar comportamento afetivo-motivacional, provavelmente pela natureza subjetiva da medida e pela reduzida experiência do avaliador.

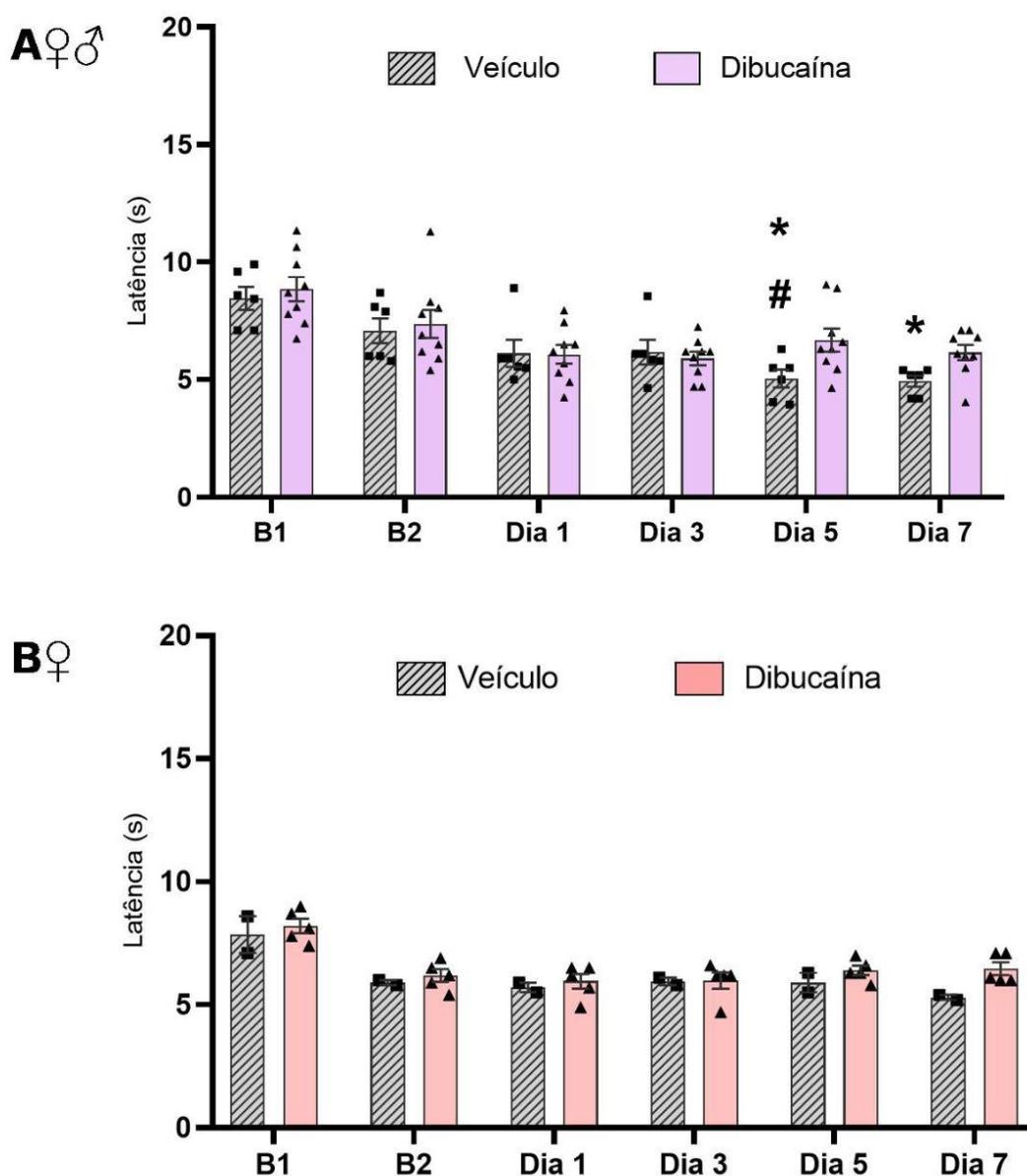


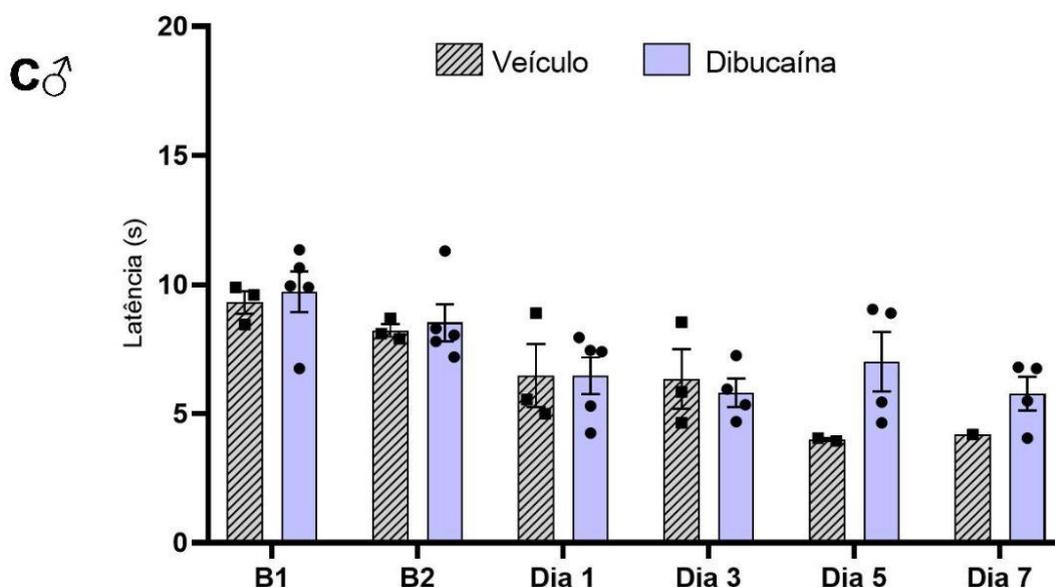


**Figura 13. Decurso temporal do efeito do tratamento com creme ácido dibucaína e veículo em machos e fêmeas C57BL/6 submetidos ao modelo de NS-HIV, demonstrado pela avaliação do comportamento afetivo motivacional (AMB).** As medidas foram expressas em escores e os dados expressos como a média de N=6 camundongos veículo e N=9 camundongos tratados C57BL/6, resultantes de 1 bloco experimental. Em A, dados de machos e fêmeas agrupados, em B, apenas fêmeas e em C, apenas machos. As linhas verticais mostram o erro padrão da média (E.P.M). B - basal do dia 13. AMB – comportamento afetivo motivacional - do inglês *Affective motivational behaviour*.

Ainda com objetivo de avaliar o possível efeito analgésico, foi avaliada a hiperalgesia térmica ao calor (Hargreaves), previamente descrita (Figura 14). A análise de variância de duas vias com medidas repetidas revelou que somente o fator tempo, mas não o fator tratamento ou a interação, foi significativa para explicar a variação não somente quando analisados os dados de machos e fêmeas em conjunto [ $F(5,65)=13,23$ ,  $P<0,01$ ], mas também analisados separadamente ( $F(2,25)=16,46$ ,  $P<0,01$  para fêmeas e  $F(1,97;9,45)=7,94$ ,  $P<0,01$  para machos). Porém, o pós-teste indicou que a indução da NS-HIV não causou uma redução dos limiares de retirada (hiperalgesia térmica) quando comparados com os valores antes da indução do modelo (diferença entre B2 e B1). Este resultado está de acordo com dados prévios do laboratório onde não observamos hiperalgesia térmica em camundongos tratados com gp120 e estavudina (LÜCKEMEYER et al., 2023). Isso é consistente com dados clínicos que mostram que pacientes com neuropatia dolorosa relacionada ao HIV geralmente não apresentam hiperalgesia térmica (PHILLIPS et al., 2014)

Por outro lado, o pós-teste revelou que ocorreu uma hiperalgesia térmica 5 e 7 dias após o tratamento nos animais tratados com veículo, mas não com dibucaína. Esta hiperalgesia térmica pode estar relacionada ao fato de os prótons causarem dor na pele de seres humanos por mecanismos que parecem ser independentes do TRPV1 (JONES et al., 2004). A dibucaína provavelmente não foi capaz de induzir hiperalgesia térmica pelo seu efeito anestésico local (KURODA et al., 1996).





**Figura 14. Decurso temporal do efeito do tratamento com creme ácido com dibucaína e veículo em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de NS-HIV, demonstrado pelo resultado da avaliação da hiperalgesia térmica ao calor.** Em A, fêmeas e machos agrupados, em B, fêmeas e em C, machos. Dados expressos como a média de N=6 camundongos veículo e N=9 camundongos tratados com dibucaína. As linhas verticais mostram o erro padrão da média. B1 - de basal, e B2 do basal após indução do modelo, no dia 13, pico da hiperalgesia. \*P<0,05 quando comparado aos valores de B2. #P<0,05 quando comparado aos valores do grupo Dibucaína.

Quanto aos possíveis efeitos adversos da formulação, até o presente momento, nenhum tratamento utilizado alterou parâmetros neurológicos e motores avaliados pelos testes de pinçar, pisar e agarrar, em nenhum dos blocos experimentais.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que:

- a) Foi possível produzir uma formulação tópica estável com dibucaína, acidificada em pH 4,0;
- b) A administração do veículo ou dibucaína causam edema de baixa intensidade nas orelhas, mas não nas patas tratadas, sem causar eritema ou causar descamação, após dose única e ou repetida.
- c) O tratamento com dibucaína também não aumentou marcadores moleculares de hipersensibilidade em linfonodos;
- d) A administração do veículo ou da dibucaína causaram efeito tipo-analgésico no modelo de NS-HIV, com a dibucaína produzindo efeito mais precoce e prolongado.
- e) A dibucaína em aplicação única ou repetida causou pouca ou nenhuma irritação de pele, indicando sua segurança para uso tópico.

Avaliados em conjunto, nossos resultados demonstram que a formulação tópica ácida com dibucaína em dose 0,1% é pouco tóxica e eficaz no modelo de NS-HIV, indicando que seu reposicionamento poderia ser útil no tratamento de dores neuropáticas.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, Stacey E. et al. Potential classification of chemical immunologic response based on gene expression profiles. **Journal of immunotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 122-134, 2020.
- ANGELOVA-FISCHER, I. et al. Accelerated barrier recovery and enhancement of the barrier integrity and properties by topical application of a pH 4 vs. a pH 5-8 water-in-oil emulsion in aged skin. **British Journal of Dermatology**, v. 179, n. 2, p. 471-477, 2018.
- ARMITAGE P, Berry G. The planning of statistical investigations. In: Armitage P, Berry G, editors. **Statistical methods in medical research**. 2 ed. Oxford: Blackwell; p. 179- 85. 1987.
- ARORA, Vipin; CAMPBELL, James N.; CHUNG, Man-Kyo. Fight fire with fire: Neurobiology of capsaicin-induced analgesia for chronic pain. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 220, p. 107743, 2021.
- ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.
- BENNETT GJ, Doyle T, Salvemini D. Mitotoxicity in distal symmetrical sensory peripheral neuropathies. **Nat Rev Neurol**. v. 10(6), p. 326-336, 2014.
- Brasil, Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico - AIDS e DST**, 2021, disponível em <http://www.aids.gov.br>, acesso em Novembro 2022.
- BURDO, Tricia H.; MILLER, Andrew D. Animal models of HIV peripheral neuropathy. **Future virology**, v. 9, n. 5, p. 465-474, 2014.
- CATERINA, M.J. et al. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature** 389, 816–824
- CHEN, Bing. Molecular mechanism of HIV-1 entry. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 10, p. 878-891, 2019.
- CHAPLAN, S.R., Pogrel, J.W., Yaksh, T.L. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, p. 1117-1123, 1994.
- CORDER, Gregory et al. Loss of  $\mu$  opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. **Nature medicine**, v. 23, n. 2, p. 164-173, 2017.
- DENDA, Sumiko et al. Glycolic acid induces keratinocyte proliferation in a skin equivalent model via TRPV1 activation. **Journal of dermatological science**, v. 57, n. 2, p. 108-113, 2010.
- DERRY S, Rice AS, Cole P, Tan T, Moore RA. Topical capsaicin (high concentration)

for chronic neuropathic pain in adults. **Cochrane Database Syst Rev.** Jan 13;1: p. CD007393, 2017.

DEUIS, Jennifer R.; DVORAKOVA, Lucie S.; VETTER, Irina. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 284, 2017.

DIXON, W.J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.20; p.441-462, 1980.

EGAN, Kaitlyn E.; CALDWELL, Gregory M.; ECKMANN, Maxim S. HIV Neuropathy—a Review of Mechanisms, Diagnosis, and Treatment of Pain. **Current Pain and Headache Reports**, v. 25, p. 1-7, 2021.

GOTO, Taichi et al. Longitudinal peripheral tissue RNA-Seq transcriptomic profiling, hyperalgesia, and wound healing in the rat plantar surgical incision model. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 10, 2021.

HARGREAVES, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

HUANG W, Calvo M, Karu K, Olausen HR, Bathgate G, Okuse K, Bennett DL, Rice AS. A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. **Pain**. v. 154(4), p. 560-575, 2013.

HYLDEN, J.L.; Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**, v. 67, p. 313-316, 1980.

JAZEBI, Noushin et al. HIV-related Neuropathy: pathophysiology, treatment and challenges. **Journal of neurology and experimental neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 15, 2021.

JONES, Nicholas G. et al. Acid-induced pain and its modulation in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 48, p. 10974-10979, 2004.

JOSEPH, E.K.; Chen, X.; Khasar, S.G.; Levine, J.D. Novel mechanism of enhanced nociception in a model of AIDS therapy-induced painful peripheral neuropathy in the rat. **Pain**, v. 107, p. 147-158, 2004

JOURDAN, Jean-Pierre et al. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145-1151, 2020.

JULIAN, Thomas et al. Human immunodeficiency virus–related peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Neurology**, v. 28, n. 4, p. 1420-1431, 2021.

KAMERMAN PR, Moss PJ, Weber J, Wallace VC, Rice AS, Huang W. Pathogenesis of HIV-associated sensory neuropathy: evidence from in vivo and in vitro experimental models. **J Peripher Nerv Syst**. v. 17(1), p. 19-31, 2012.

KASABA T, Onizuka S, Takasaki M. Procaine and mepivacaine have less toxicity in vitro than other clinically used local anesthetics. **Anesth Analg**. 2003 v. 97(1), p. 85-90, 2003.

KILIC A, Masur C, Reich H, Knie U, Dähnhardt D, Dähnhardt-Pfeiffer S, Abels C. Skin acidification with a water-in-oil emulsion (pH 4) restores disrupted epidermal barrier and improves structure of lipid lamellae in the elderly. **J Dermatol**. v. 46(6), p. 457-465, 2019.

KLINCK, Mary P. et al. Translational pain assessment: could natural animal models be the missing link?. **Pain**, v. 158, n. 9, p. 1633-1646, 2017.

KURODA, Yoshihiro et al. Locations of local anesthetic dibucaine in model membranes and the interaction between dibucaine and a Na<sup>+</sup> channel inactivation gate peptide as studied by 2H- and 1H-NMR spectroscopies. **Biophysical journal**, v. 71, n. 3, p. 1191-1207, 1996.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUCAS, Kurt; MAES, Michael. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. **Molecular neurobiology**, v. 48, n. 1, p. 190-204, 2013.

LÜCKEMEYER, Debora Denardin et al. Critical Pronociceptive Role of Family 2 Voltage-Gated Calcium Channels in a Novel Mouse Model of HIV-Associated Sensory Neuropathy. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 5, p. 2954-2968, 2023.

MEHTA, Sapna A. et al. Sex differences in the incidence of peripheral neuropathy among Kenyans initiating antiretroviral therapy. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 5, p. 490-496, 2011.

MILLIGAN, E.D.; Mehmert, K.K.; Hinde, J.L.; Harvey, L.O.; Martin, D.; Tracey, K.J.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain Research**, v. 861, p. 105-116, 2000.

National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 3025, Dibucaine" **PubChem**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dibucaine>. Acesso em: 7 Novembro, 2022.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. ARRIVE guidelines - Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments. 2019. **Bethesda: National Center for Biotechnology Information**, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7038260/>. Acesso em: 10 de maio de 2023.

ATTAL N., F. Jazat, V. Kayser, G. Guilbaud, Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy, **Pain**, Volume 41, Issue 2, 1990.

PATAPOUTIAN, Ardem; TATE, Simon; WOOLF, Clifford J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2009.

PHILLIPS, Tudor JC et al. Sensory, psychological, and metabolic dysfunction in HIV-associated peripheral neuropathy: a cross-sectional deep profiling study. **PAIN®**, v. 155, n. 9, p. 1846-1860, 2014.

PRITCHARD JE, O'Mara TA, Glubb DM. Enhancing the Promise of Drug Repositioning through Genetics. **Front Pharmacol.** v. 8, p. 896, 2017.

PROKSCH E, Soeberdt M, Neumann C, Kilic A, Reich H, Abels C. Influence of Buffers of Different pH and Composition on the Murine Skin Barrier, Epidermal Proliferation, Differentiation, and Inflammation. **Skin Pharmacol Physiol.** v. 32(6), p. 328-336, 2019.

RAJA, Srinivasa N. et al. The revised IASP definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976, 2020.

SANZ-SALVADOR, Lucía et al. Agonist-and Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 23, p. 19462-19471, 2012.

SCANNELL JW, Blanckley A, Boldon H, Warrington B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. **Nat Rev Drug Discov.** v. 11(3), p.191-200, 2012.

SISIGNANO, M.; Parnham, M.J.; Geisslinger, G. Drug Repurposing for the development of novel analgesics. **Trends Pharmacol Sci.** v. 37(3), p. 172-183, 2016.

TEODORO, F.C.; Tronco Junior, M.F.; Zampronio, A.R.; Martini, A.C.; Rae, G.A.; Chichorro, J.G. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. **Neuropeptides**, v. 47, p. 199-206, 2013.

TERASHIMA, T.; Xu, Q.; Yamaguchi, S.; Yaksh, T. Intrathecal P/Q- and R-type calcium channel blockade of spinal substance P release and c-Fos expression. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 1-8, 2013.

UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), Global Report: **UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic: 2021**, Dezembro 2021, ISBN 978-92-9173-871-7, disponível em: <https://www.unaids.org>. Acesso em 23 de novembro de 2022.

WALLACE, V.C.; Blackbeard, J.; Segerdahl, A.R.; Hasnie, F.; Pheby, T.; McMahon, S.B.; Rice, A.S. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. **Brain**, v. 130, p. 2688-2702, 2007.

WARRINER AH, Burkholder GA, Overton ET. HIV-related metabolic comorbidities in the current ART era. **Infect Dis Clin North Am.** v. 28(3), p. 457-476, 2014.

XUE, Hanqing et al. Review of drug repositioning approaches and resources. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232, 2018.

XU, J., Brennan, T.J. Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. **Anesthesiology**, v. 112(1), p. 153-64, 2010.

YANG, Felix et al. Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Pain, Neuropsychiatric Disorders, and Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4714, 2023.

YU, Siyi et al. The development of local anesthetics and their applications beyond anesthesia. **Int J Clin Exp Med**, v. 12, n. 12, p. 13203-13220, 2019.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** v. 16, p. 109-110, 1983

WANG, Siwen et al. S100A8/A9 in Inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1298, 2018.

