



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas MG. CEP 37130-000  
Fone (035)3292-2377  
Lanned



**NATALIE LANGE CANDIDO**

**EFEITO DA CROTALFINA ASSOCIADA À ELETROACUPUNTURA NA DOR  
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS WISTAR**

**ALFENAS / MG**

**2024**

**NATALIE LANGE CANDIDO**

**EFEITO DA CROTALFINA ASSOCIADA À ELETROACUPUNTURA NA DOR  
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS WISTAR**

**Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Biociências aplicada à  
saúde pela Universidade Federal de  
Alfenas.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço  
da Silva**

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Candido, Natalie Lange .

Efeito da crotalina associada à eletroacupuntura na dor neuropática induzida por paclitaxel em ratos wistar / Natalie Lange Candido. - Alfenas, MG, 2024.

39 f. -

Orientador(a): Marcelo Lourenço da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Dor neuropática. 2. Eletroacupuntura. 3. Crotalina. 4. Paclitaxel. I. Silva, Marcelo Lourenço da , orient. II. Título.

NATALIE LANGE CANDIDO

EFEITO DA CROTALFINA ASSOCIADA À ELETROACUPUNTURA NA DOR  
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS WISTAR

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Aprovada em: 16 de fevereiro de 2024.

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Ricardo Radighieri Rascado  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Luciano Maia Alves Ferreira  
Instituição: Egas Moniz School of Health & Science  
EGAS MONIZ



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Lourenço da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 16/02/2024, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1183325** e o código CRC **E741BF67**.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Além disso, é com enorme alegria que agradeço a todos que estiveram comigo durante a execução deste trabalho, com ênfase à minha família, meu amigos e meu orientador.

## RESUMO

A dor representa um dos principais desafios do sistema de saúde, seja de forma aguda ou crônica, demandando investigações contínuas para compreender seus mecanismos e estratégias de controle. A dor crônica, frequentemente multifatorial, engloba diversas origens, como nociceptiva, neuropática e nocioplástica. Um exemplo comum de dor neuropática é induzido pela quimioterapia com paclitaxel (PAC), medicamento amplamente utilizado em tratamentos oncológicos. Modelos de dor induzidos por paclitaxel refletem a dor neuropática relatada por pacientes após tratamentos quimioterápicos. Nesse contexto, a crotalfina (CRO), um peptídeo sintético derivado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, demonstrou um potente e prolongado efeito antinociceptivo em diversos modelos de dor. Estudos farmacológicos detalharam suas propriedades e protocolos de dosagem, indicando um mecanismo de ação mediado por receptores opióides. Além disso, a eletroacupuntura (EA) em frequências de 2 Hz e 2/15 Hz também exibem efeitos dependentes de mediadores opióides. Diante disso, este estudo tem como propósito investigar a interação potencial entre a eletroacupuntura de baixa frequência e diferentes doses de crotalfina em animais com dor neuropática induzida por paclitaxel. O objetivo é explorar como essa combinação terapêutica pode influenciar a resposta analgésica, visando contribuir para um melhor entendimento do potencial desses tratamentos combinados no manejo da dor neuropática pós-quimioterapia.

**Palavras-chave:** Dor neuropática; Eletroacupuntura; Crotalfina; Paclitaxel.

## ABSTRACT

Pain represents one of the main challenges in the healthcare system, whether in an acute or chronic form, requiring ongoing investigations to understand its mechanisms and control strategies. Chronic pain, often multifactorial, encompasses various origins such as nociceptive, neuropathic, and nociplastic. A common example of neuropathic pain is induced by chemotherapy with paclitaxel (PAC), a widely used medication in oncological treatments. Pain models induced by paclitaxel reflect neuropathic pain reported by patients after chemotherapy treatments. In this context, crotalphine (CRO), a synthetic peptide derived from the venom of the snake *Crotalus durissus terrificus*, has demonstrated a potent and prolonged antinociceptive effect in various pain models. Pharmacological studies have detailed its properties and dosage protocols, indicating a mechanism of action mediated by opioid receptors. Furthermore, electroacupuncture (EA) at frequencies of 2 Hz and 2/15 Hz also exhibits effects dependent on opioid mediators. Given this, this study aims to investigate the potential interaction between low-frequency electroacupuncture and different doses of crotalphine in animals with paclitaxel-induced neuropathic pain. The objective is to explore how this therapeutic combination may influence the analgesic response, aiming to contribute to a better understanding of the potential of these combined treatments in managing post-chemotherapy neuropathic pain.

**Keywords:** Neuropathic pain; Electroacupuncture; Crotalphine; Paclitaxel

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Peptídeo da crotalina .....	13
Figura 2 - Desenho experimental.....	21
Gráfico 1 - Limiar mecânico dos grupos com administração da ..... dose CRO2	23
Gráfico 2 - Limiar de alodinia ao frio dos grupos com administração da ..... dose CRO2	23
Gráfico 3 - Limiar mecânico dos grupos com administração da..... dose CRO3	24
Gráfico 4 - Limiar de alodinia ao frio dos grupos com administração da..... dose CRO3	25
Gráfico 5 - Limiar mecânico dos grupos com administração da..... dose CRO1	26
Gráfico 6 - Limiar de alodinia ao frio dos grupos com administração da..... dose CRO1	26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2</b>	<b>Indução do modelo de dor neuropática induzida por quimioterápico.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3</b>	<b>Teste do limiar mecânico - pressão contínua na pata.....</b>	<b>18</b>
<b>4.4</b>	<b>Teste da alodinia ao frio com acetona.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5</b>	<b>Drogas.....</b>	<b>19</b>
<b>4.6</b>	<b>Eletroacupuntura.....</b>	<b>19</b>
<b>4.7</b>	<b>Crotalina.....</b>	<b>20</b>
<b>4.8</b>	<b>Grupos Experimentais.....</b>	<b>20</b>
<b>4.9</b>	<b>Protocolo experimental.....</b>	<b>21</b>
<b>4.10</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeitos da administração de CRO 2 nos acupontos E36 e B60 sobre a hiperalgesia induzida por PAC.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2</b>	<b>Efeitos da administração de CRO 3 nos acupontos E36 e B60 sobre a hiperalgesia induzida por PAC.....</b>	<b>25</b>
<b>5.3</b>	<b>Efeitos da administração de CRO 1 nos acupontos E36 e B60 sobre a hiperalgesia induzida por PAC.....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
-------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) descreve dor com sendo uma “experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”, levando em consideração o estado biopsicossocial de cada indivíduo (Desantana *et al.*, 2020). Por ser uma sensação desagradável, sua função é sinalizar o organismo e assim, ativar o mecanismo de defesa do indivíduo, fazendo com que o estímulo nocivo não cause maiores danos teciduais (Oliveira, 2016).

O mecanismo doloroso requer cinco etapas: I) Transdução; II) Condução; III) Transmissão; IV) Percepção; V) Modulação. A transdução converte o estímulo periférico em uma reação tissular química no tecido, conhecida como potencial de ação, que é transformada em eventos elétricos nos neurônios que são transduzidos nas sinapses, propagados centralmente. A condução ocorre através de fibras que impulsionam a informação no sentido da raiz dorsal da medula, as fibras podem ser colocadas em 3 grupos, Fibra A $\beta$  (diâmetro grande, mielinizada, condução rápida), Fibras A $\delta$  (diâmetro intermediário, mielinizadas com condução intermediária) e Fibras C (diâmetro pequeno, não mielinizadas, com velocidade de condução lenta). Até esse momento o indivíduo ainda não possui sensação dolorosa. Já na transmissão ocorre a transferência dos estímulos elétricos pela via neural, na fenda sináptica entre os neurônios por mediadores bioquímicos excitatórios (glutamato, substância P, fatores de crescimento) e inibitórios (opióides, GABA e glicina), que por sua vez são oriundos de fibra aferente primária, interneurônios ou fibra descendente. Logo após, acontece a percepção, na qual toda essa informação chega nas áreas corticais e sistema límbico, gerando a noção de dor. Enquanto isso, a etapa de modulação acontece por todo trajeto das vias nociceptivas, por meio de um neurônio aferente, nesse momento o organismo possui uma adaptabilidade, podendo também ser influenciada por questões sociais e crenças (Dubin; Patapoutian, 2010; Yam *et al.*, 2018).

Por definição, a dor recorrente com duração superior a três meses, com uma duração relativamente amplificada do tempo de cicatrização, é conhecida como dor crônica. Estimativas sugerem que 20% dos adultos sofrem de dor em todo o mundo e a dor crônica é diagnosticada em 10% dos indivíduos (Lucena; McDougall, 2021). No Brasil, cerca de dois terços da população sofrem de dor crônica em algum

momento da vida, fazendo com que haja uma grande procura aos serviços de saúde (Carvalho *et al.*, 2018). Tais fatores fizeram com que a dor gerasse uma consequência na economia do país, pois além da demanda no sistema de saúde, indivíduos com quadros dolorosos persistentes tendem a ter uma menor qualidade de vida, menor produtividade, absenteísmo e presenteísmo, afetando negativamente suas atividades no dia a dia (Rocha *et al.*, 2021; Shaygan *et al.*, 2022).

De acordo com a literatura, a dor neuropática (DN) é aquela caracterizada por diferentes sensações dolorosas, como hiperalgesia, ocasionada por alguma lesão primária que danifique a condução nervosa ou alguma doença que afete o sistema somatossensorial, podendo ser observadas, modificações estruturais nos neurônios, incluindo o aumento da expressão de receptores, como o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1), um canal iônico permeável a cátions ativado por uma série de estímulos nocivos, como calor, acidificação e agentes irritantes como a capsaicina. Este receptor é responsável pela detecção e transmissão da dor aguda e crônica (Calixto *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2011). Na maioria dos casos clínicos, o diagnóstico é dado através de questionários e escalas, além de um exame físico que constata tal excesso ou déficit somatossensorial. Após o resultado afirmativo dos itens acima, trabalhos mostram que o tratamento necessita ser interdisciplinar, voltado ao recurso farmacológico (Baron *et al.*, 2010)

Extraído da casca do Teixo, uma espécie de planta conífera, o paclitaxel (PAC) é um utilizado como medicamento de primeira e segunda linha para o tratamento de diversos tipos de câncer, como linfomas (Wilson *et al.*, 1994), de pulmão (Cui *et al.*, 2020), de mama e ovário (Spencer *et al.*, 1994). Seu mecanismo de ação se baseia na estratégia de fazer com que células tumorais sejam incapazes de se dividirem, através da fixação dos microtúbulos de actina, estruturas necessárias para que os cromossomos se movimentem durante a mitose descontrolada caracterizada pela patologia cancerígena.

No entanto, seu evento adverso é a neurotoxicidade cumulativa, capaz de gerar algumas neuropatias periféricas, podendo inclusive ser um fator limitante para o uso clínico, já que seus efeitos colaterais são amplamente relatados pelos pacientes (Authier *et al.*, 2000; Chaudhry *et al.*, 1994; Van Den Bent; Hilkens 1997; Kaplan *et al.*, 1993; Helsing; Pace 1997; Rowinsky *et al.*, 1993B). Essa droga também pode interromper o transporte baseado em microtúbulos nos axônios dos neurônios sensoriais (Hanani; Warwick 2012) induzindo DN, caracterizada por

desenvolver alodínia mecânica, alodínia ao frio e uma dor relatadas pelos pacientes como ardente e espontânea nas extremidades distais (Lee; Swain, 2006). Após a administração única de PAC ocorre aumento da sensibilização e expressão do receptor TRPV1 que contribui para o desenvolvimento de alodínia mecânica e hiperalgesia ao calor (Kalynovska *et al.*, 2017).

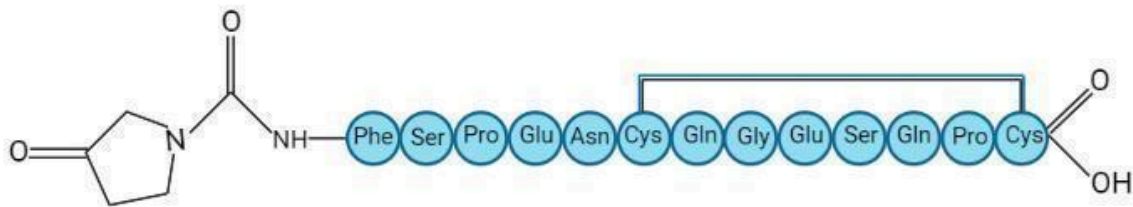
A injeção sistêmica de PAC induz uma ativação rápida e persistente de astrócitos espinhais avaliada pelo aumento da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador comum para ativação de astrócitos (Ji *et al.*, 2013) e regulação negativa dos transportadores de glutamato astrocíticos (Zhang *et al.*, 2012). Além disso, o PAC induz aumentos robustos da fosforilação da quinase N-terminal c-jun (p-JNK) (Xu *et al.*, 2016), um membro da família da proteína quinase ativada por mitógeno que está associada à produção de citocinas astrocíticas, aumentando a hiperatividade na medula espinhal, circuitos de dor e promover a DN.

Visto sua toxicidade, o PAC também passou a ser usado para indução de dor neuropática em modelos animais para estudos científicos. Visando a evolução nos ensaios para evidências que promovam uma analgesia periférica e aliviam os sintomas causados pelo medicamento (Cardoso, 2003).

A descoberta e utilização de componentes de veneno animal com ações analgésicas não é novidade; relatos mostram que o uso da prática se estende pela história e por diversas culturas (Brazil, 1972). No Brasil, a serpente *Crotalus durissus terrificus* ganhou notoriedade pela sua peçonha ter uma molécula capaz de produzir atividades em receptores opióides do tipo kappa ( $\kappa$ ) e/ou delta ( $\delta$ ), os quais são responsáveis pela analgesia a nível espinhal (Brigatte *et al.*, 2001; Giorgi *et al.*, 1993; Picolo *et al.*, 1998). Apesar de estarem envolvidos nessas ações, os efeitos adversos por ação nestes receptores, pelo menos central, é bem menor que por ação em receptores mu ( $\mu$ ).

Nominada como crotalfina (CRO), a molécula com tais propriedades foi levada a purificação e isolamento, expondo sua natureza peptídica de 14 aminoácidos, ligados por uma ponte dissulfídica e um ácido piroglutâmico (Aird *et al.*, 1990; Bon *et al.*, 1989; Faure *et al.*, 1991).

Figura 1 - Crotalphine



Fonte: da autora.

A CRO se mostrou um componente com ação de longa duração; os ensaios mostraram a capacidade de analgesia sistêmica do peptídeo por até 72h após a administração em animais com dor neuropática crônica após indução por constrição do nervo isquiático. Em baixas doses por via oral, intraplantar ou intravenosa, os pesquisadores obtiveram um alto efeito analgésico nos modelos de dor aguda e crônica. Quando aplicada em animais com hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina E<sub>2</sub>, os resultados mostraram efeito com duração de 5 dias (Gutierrez *et al.*, 2008; Konno *et al.*, 2008).

Estudos adicionais foram realizados para averiguar uma possível hipersensibilidade tardia após o uso extenso e interrupção do veneno crotalídeo, e mesmo sendo mediado por receptores opióides, a crotalfina não induz aumento de sensibilidade, assim como não acarreta tolerância periférica e sintomas de abstinência (Freitas *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2014).

Não é de hoje que a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) vem sendo cada vez mais utilizada nos tratamentos ocidentais para dores, com a acupuntura não seria diferente. Tal técnica, que possui mais de dois mil anos, consiste na inserção de agulhas no corpo em pontos específicos ricos em terminações sensoriais, denominados acupontos, já pré-estabelecidos pela MTC (Park *et al.*, 2008).

Inúmeros estudos já demonstraram através de modelos animais e aplicações clínicas os efeitos benéficos da acupuntura em diversos quadros. Logo, o efeito analgésico tem grande relevância e aceitação, gerando várias hipóteses sobre seus mecanismos neurais (Han, 2004).

Em paralelo, a eletroestimulação de alta ou baixa frequência, também muito difundida como recurso terapêutico para dores, foi associada à acupuntura, gerando a eletroacupuntura (EA). A estimulação das agulhas pelo aparelho de EA afetam estruturas corticais capazes de estimular o controle descendente da dor (Hess *et al.* 2007), uma vez que a corrente liberada é suficiente para excitar fibras A-beta

responsáveis pela primeira fase na condução da dor em direção ao sistema nervoso central (Han *et al.*, 2003).

No entanto, outros mediadores também podem estar envolvidos na antinocicepção induzida por EA como a serotonina (5HT) (Han; Terenius, 1982;), noradrenalina (NA) (Kim *et al.*, 2005), glutamato (GLU) (Huang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003) e ácido gama-amino butírico (GABA) (Fusumada *et al.*, 2007; Han *et al.*, 1999).

## 2 JUSTIFICATIVA

É de grande conhecimento os impactos da dor na sociedade, uma vez que envolve fatores psicossociais, comportamentais e fisiopatológicos, responsável pela maior parte da demanda no serviço de saúde (MAJITHIA *et al.*, 2016). Tendo em vista que a EA e a administração de CRO geram um efeito antinociceptivo em modelos de dor separadamente, ambos por vias opioidérgicas, logo se vê a possibilidade de iniciar estudos relacionando ambas as propostas terapêuticas combinadas em modelos animais de DN, especificamente no modelo de DN induzida por PAC. Assim, através das doses de CRO avaliamos se há efeito somatório da EA em diferentes frequências é capaz de levar à analgesia com uma menor dose da droga.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente estudo tem como objetivo avaliar a interação entre EA de diferentes frequências e doses de CRO em animais com modelo de dor por PAC.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

São objetivos do presente estudo:

- a) verificar se diferentes doses de CRO alteram o efeito da EA 2 Hz no limiar mecânico na pata direita no modelo de dor neuropática induzida por PAC;
- b) verificar se diferentes doses de CRO alteram o efeito da EA 2/15 Hz no limiar mecânico na pata direita no modelo de dor neuropática induzida por PAC;
- c) investigar a atividade comportamental dos ratos antes e após a intervenção.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as diferentes técnicas descritas a seguir.

### **4.1 Animais**

Para o presente estudo foram utilizados ratos Wistar, vindos do Biotério Central do Campus da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), machos e com peso inicial de 200g. Os experimentos estão de acordo com as normas de ética recomendadas pela IASP (Zimmermann, 1983) de ética e da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurociência, Neuromodulação e Estudo da Dor (LANNED), em sala apropriada, com isolamento acústico, sob condições de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} + 1$ ) e ciclo claro/escuro (12:12 h) controlados, com livre acesso à ração e água até o dia do experimento.

### **4.2 Indução do modelo de dor neuropática por quimioterápico**

A dor neuropática por quimioterápico foi induzida pelo tratamento com PAC, segundo metodologia proposta por Polomano *et al.* (2001). O PAC foi administrado, após anestesia por isoflurano, por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 2 mg/Kg, 1 vez ao dia, em dias alternados para um total de quatro injeções, de acordo com o protocolo experimental. Os animais controle receberam veículo (solução salina estéril a 0,9%). Estudos prévios, mostraram que animais tratados com PAC apresentaram uma diminuição significativa no limiar de retirada mecânica mais pronunciada no 14<sup>o</sup> dia. Os animais de controle receberam um volume equivalente de veículo com solução salina para atingir uma concentração semelhante aos animais tratados com PAC (Boyette-Davis *et al.*, 2011; Polomano *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 2016).

### **4.3 Teste do limiar mecânico - pressão contínua na pata**

Consiste no teste de filamentos de *Von Frey*, descrito por Möller e colaboradores (1998), em que avalia o limiar nociceptivo após aplicar estímulos

mecânicos na pata do animal. Durante a realização, os ratos foram colocados em uma sala silenciosa, separados em recipientes de acrílico com a base de grade vazada de aço não maleável com 5 mm<sup>2</sup> de espaço entre as malhas, para que se consiga ter acesso à pata traseira direita do animal e por fim aplicar uma pressão crescente utilizando a ponta de uma haste com diferentes espessuras (estesiômetro). O estímulo foi feito no centro plantar até que produza uma resposta de retirada, a incitação é seis vezes para a obtenção do valor de log correspondente (Chaplan *et al.*, 1994).

#### 4.4 Teste da alodinia ao frio com acetona

Com uma seringa foi aplicado 20 µL de acetona no centro da região plantar da pata posterior direita do animal, segundo descrito por Flatters e Bennett (2004) o comportamento varia entre os escores: 0 – nenhuma resposta; 1 – rápida retirada ou movimento brusco da pata; 2 – retirada prolongada ou agitação repetida da pata; 3 – agitação repetida seguida de lambida da pata. São necessárias três repetições do protocolo, intervaladas por 5 minutos cada e a soma dos resultados será levada à estatística.

#### 4.5 Drogas

- a) Veículo Salina- NaCl- a 0,9%;
- b) Isoflurano 1ml/ml (Cristália);
- c) CRO (Proteimax, Brasil - Lote: P170717-HS595874), obtida por meio de síntese peptídica em fase sólida, através de estratégia Fmoc. A CRO foi diluída em água destilada e administrada por via oral através de gavagem (p.o.) nas doses 1, 5 e 50 µg/kg em 200 µL de salina (Proteimax).
- d) Paclitaxel (6 mg/ml diluído com solução salina estéril a 0,9% para 1 mg/ml).

#### 4.6 Eletroacupuntura

Com os animais levemente anestesiados por vaporização de Isoflurano (2 a 4%), e posicionados para exposição dos pontos *Zusanli* (E36) e *Kunlun* (B60) em aplicação bilateral na pata direita (Li *et al.*, 2019) com agulhas de acupuntura (DBC, de 0,18 mm de espessura e 8 mm de comprimento). Para a execução da eletroestimulação será utilizado o aparelho EL 608 (NKL) com frequência de 2 Hz e

2Hz/15 Hz com duração de 30 minutos cada. Animais falso-estimulados (grupos EA Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto que o aparelho de eletroacupuntura foi mantido desligado durante os 30 minutos de falsa estimulação (Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013).

#### 4.7 Crotalina

A CRO foi administrada oralmente por gavagem nas seguintes doses: 1, 5 e 50 µg/kg. A CRO foi gentilmente cedida pela Profa. Gisele Picolo do Instituto Butantan de São Paulo.

#### 4.8 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos 24 em grupos de 10 animais, sendo eles:

- PAC + CRO1 + EA 2Hz
- PAC + CRO1 + EA 2/15Hz
- PAC + CRO1 + EA Sham
- PAC + CRO2 + EA 2Hz
- PAC + CRO2 + EA 2/15Hz
- PAC + CRO2 + EA Sham
- PAC + CRO3 + EA 2Hz
- PAC + CRO3 + EA 2/15Hz
- PAC + CRO3 + EA Sham
- PAC + SAL + EA 2Hz
- PAC + SAL + EA 2/15Hz
- PAC + SAL + EA Sham
- SAL + CRO1 + EA 2Hz
- SAL + CRO1 + EA 2/15Hz
- SAL + CRO1 + EA Sham
- SAL + CRO2 + EA 2Hz
- SAL + CRO2 + EA 2/15Hz
- SAL + CRO2 + EA Sham
- SAL + CRO3 + EA 2Hz
- SAL + CRO3 + EA 2/15Hz

- SAL + CRO3 + EA Sham
- SAL + SAL + EA 2 Hz
- SAL + SAL + EA 2/15Hz
- SAL + SAL + EA Sham

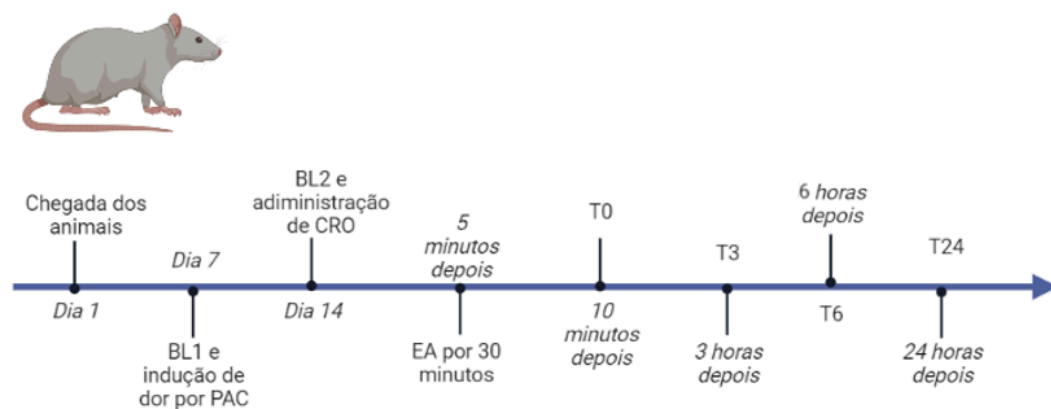
#### **4.9 Protocolo experimental**

Foi aguardado um prazo de 7 dias para ambientalização após a chegada dos animais. Em seguida, os mesmos tiveram as medidas basais (BL1) do limiar mecânico e alodinia ao frio avaliadas previamente à indução da dor neuropática por quimioterápico e foram divididos em grupos conforme demonstrado anteriormente no tópico 4.8. Com a instalação da dor após 14 dias, foi realizada a segunda medida basal (BL2) do limiar mecânico e alodinia ao frio e a administração oral da crotalina por gavagem. Subsequente, em cinco minutos, foi aplicada a eletroacupuntura nos pontos B60 e E36 em todos os animais durante 30 minutos cada.

Todos os grupos foram submetidos aos mesmos testes, sendo eles: Teste do limiar mecânico - pressão contínua na pata, Teste da alodinia ao frio com acetona e Teste de Campo Aberto. Sendo este último realizado apenas no T0 e em metade dos animais de cada grupo, uma vez que ele foi aplicado apenas para demonstrar que a dose utilizada não causa sedação e assim, o animal poderá seguir para os próximos testes (T3, T6 e T24). Enquanto os testes de limiar mecânico e alodinia ao frio foram realizados em todos os animais do grupo no BL1, BL2, T0, T3, T6 e T24.

Para as análises de Western Blotting foram coletadas amostras de 1 animal em BL1, BL2, T0 e T24 a cada grupo.

Figura 2 - Cronograma experimental.



Fonte: da autora

#### 4.10 Análise estatística

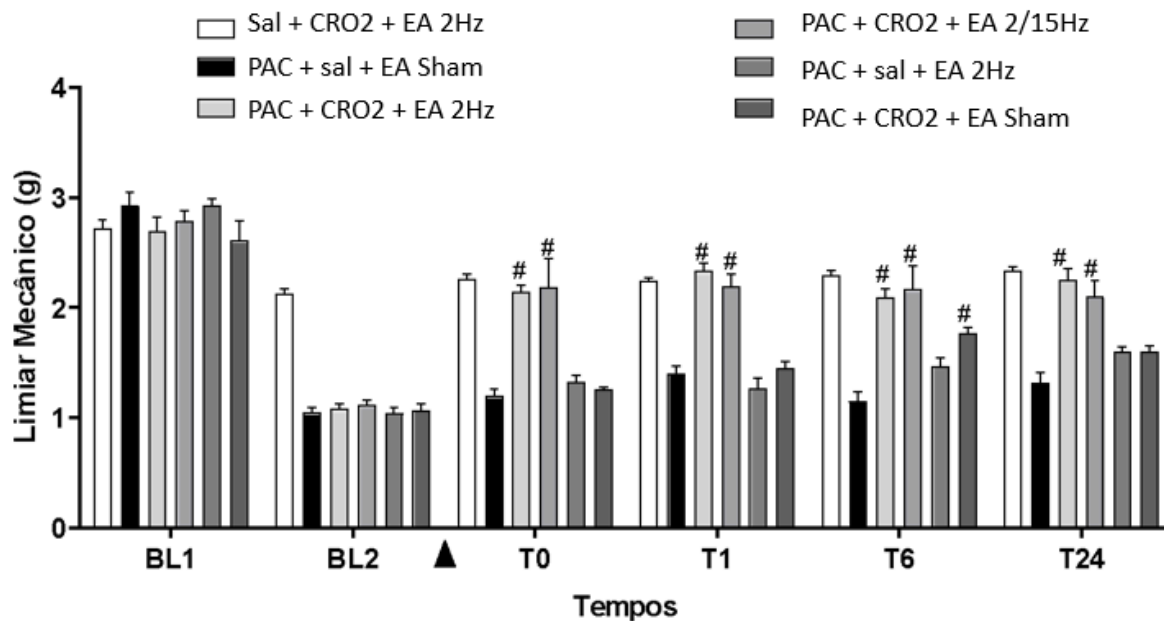
Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  EPM. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA). Já, para o tratamento estatístico dos dados obtidos pelos ensaios moleculares foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA). Ambas as análises foram seguidas pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativos os valores de  $P < 0,05$ . As análises estatísticas e elaboração de gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos da administração de CRO 2 nos acupontos E36 e B60 sobre a hiperalgesia induzida por PAC

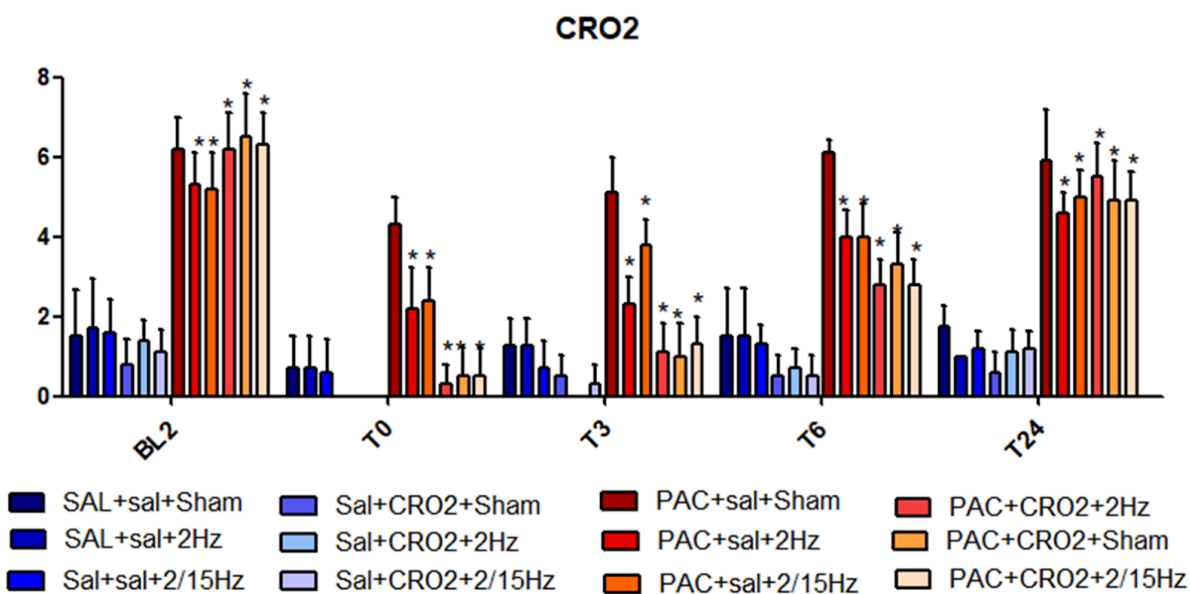
Os desfechos deste experimento estão representados no Gráfico 3. Após a administração de PAC, houve uma diminuição no limiar mecânico da dor, resultando em um aumento na resposta de retirada da pata quando submetida a uma pressão por filamentos de menor gramatura, especialmente evidente no tempo BL2 após a indução da hiperalgesia. O uso de CRO 2 demonstrou a capacidade de reduzir significativamente os comportamentos hiperalgésicos induzidos por PAC nos momentos T0 e T3, iniciando o retorno ao estado hiperalgésico em T6 e retomando plenamente em T24. Observa-se que, nos animais tratados com CRO 2 e EA 2Hz nos pontos de acupuntura E36 e B60, houve uma redução do quadro de hiperalgesia induzida por PAC em todos os intervalos de tempo analisados (T0, T1, T6 e T24 horas). No entanto, esse mesmo efeito não foi observado com a aplicação da frequência de EA 2/15Hz. As curvas presentes no Gráfico 1 exibiram diferenças significativas relacionadas ao tipo de tratamento ( $F_{4,125} = 6,78$ ;  $p < 0,01$ ) e ao tempo ( $F_{5,125} = 65,35$ ;  $p < 0,01$ ), além de demonstrarem uma interação significativa entre o tratamento e o tempo ( $F_{20,125} = 5,06$ ;  $p < 0,01$ ).

Gráfico 1 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de CRO 2 ou administração EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz nos acupontos *E36* e *B60* em ratos após administração de PAC. As colunas representam média + E.P.M de 10 animais. (#) Diferentes do grupo PAC+Salina ( $p < 0,05$ ).



Fonte : da autora.

Gráfico 2 - Efeito na alodinia ao frio produzido pela aplicação de CRO 2 ou administração EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz nos acupontos *E36* e *B60* em ratos após administração de PAC. As colunas representam média + E.P.M de 10 animais. (#) Diferentes do grupo PAC+Salina ( $p < 0,05$ ).

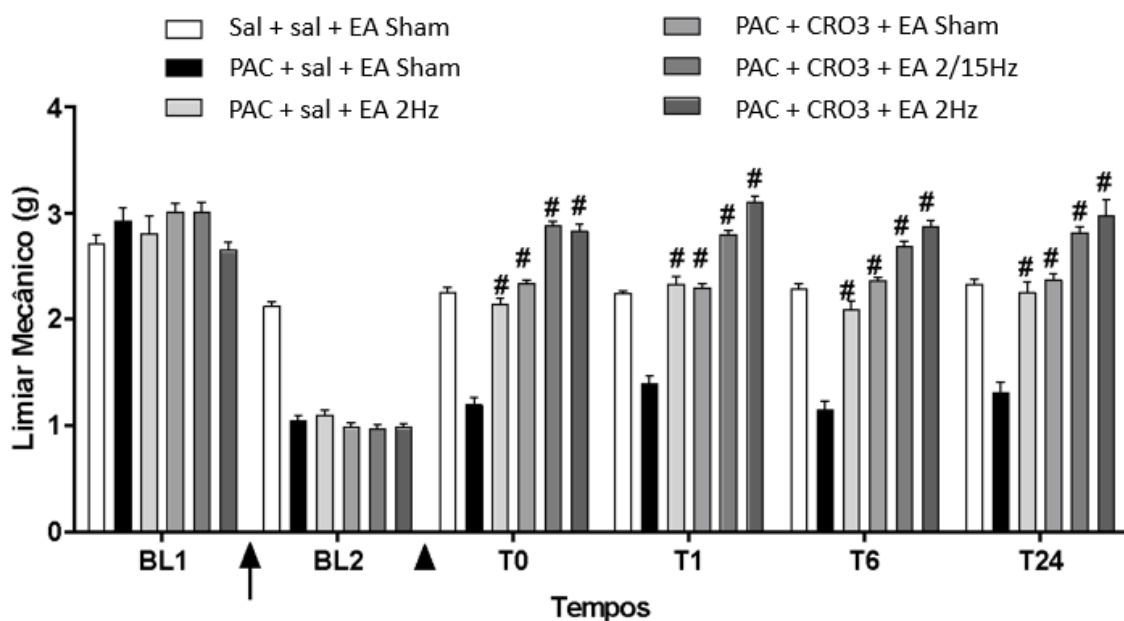


Fonte: da autora.

## 5.2 Efeitos da administração de CRO 3 nos acupontos E36 e B60 sobre a hiperalgesia induzida por PAC

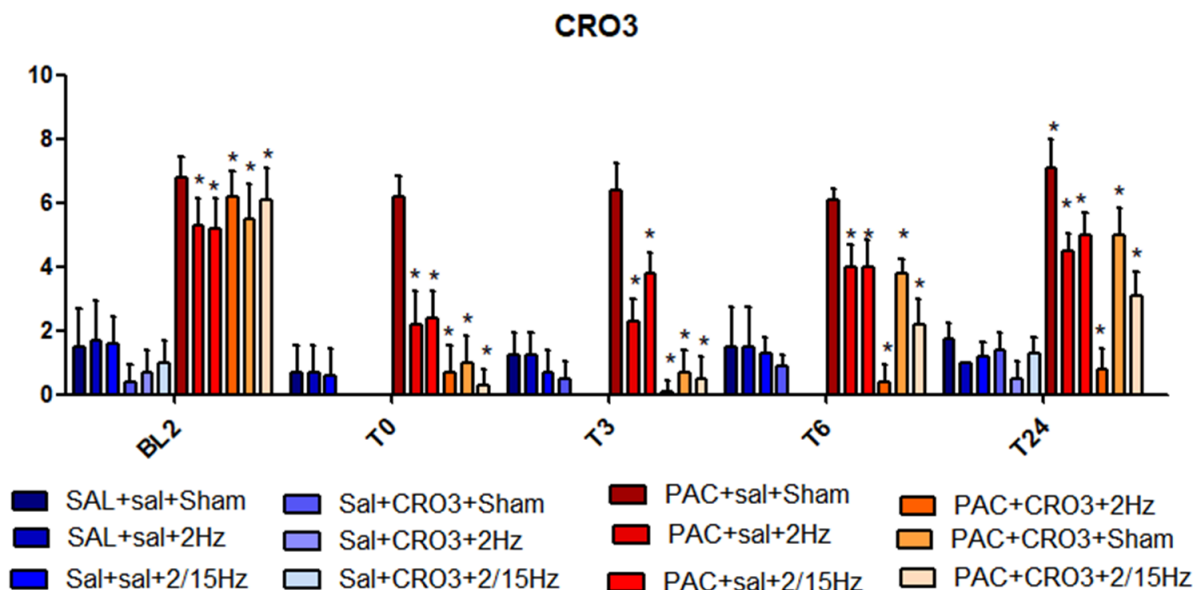
Os resultados deste experimento estão apresentados no Gráfico 4. A administração de PAC induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após a indução da hiperalgesia observado no tempo BL2. A aplicação de CRO 3 foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela administração de PAC significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz sobre os acupontos E36 e B60, houve alteração dos limiars nos seguintes tempos (T0, T1, T6 e T24 horas). Também é possível observar que a diminuição das respostas provenientes de quadro doloroso é ainda mais significativa na interação da dose CRO3 e EA 2Hz. As curvas do Gráfico 4 foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5,35}=76,194$ ;  $p < 0,01$ ) e tempo ( $F_{5,175}=196,397$ ;  $p < 0,01$ ) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ( $F_{30,125}=11,281$ ;  $p < 0,05$ ).

Gráfico 3 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de CRO 3 ou administração EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz nos acupontos E36 e B60 em ratos após administração de PAC. As colunas representam média + E.P.M de 10 animais. (#) Diferentes do grupo PAC+Salina ( $p < 0,05$ ).



Fonte: da autora.

Gráfico 4 - Efeito sobre a alodinia ao frio produzido pela aplicação de CRO 2 ou administração EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz nos acupontos *E36* e *B60* em ratos após administração de PAC. As colunas representam média + E.P.M de 10 animais. (#) Diferentes do grupo PAC+Salina ( $p < 0,05$ ).

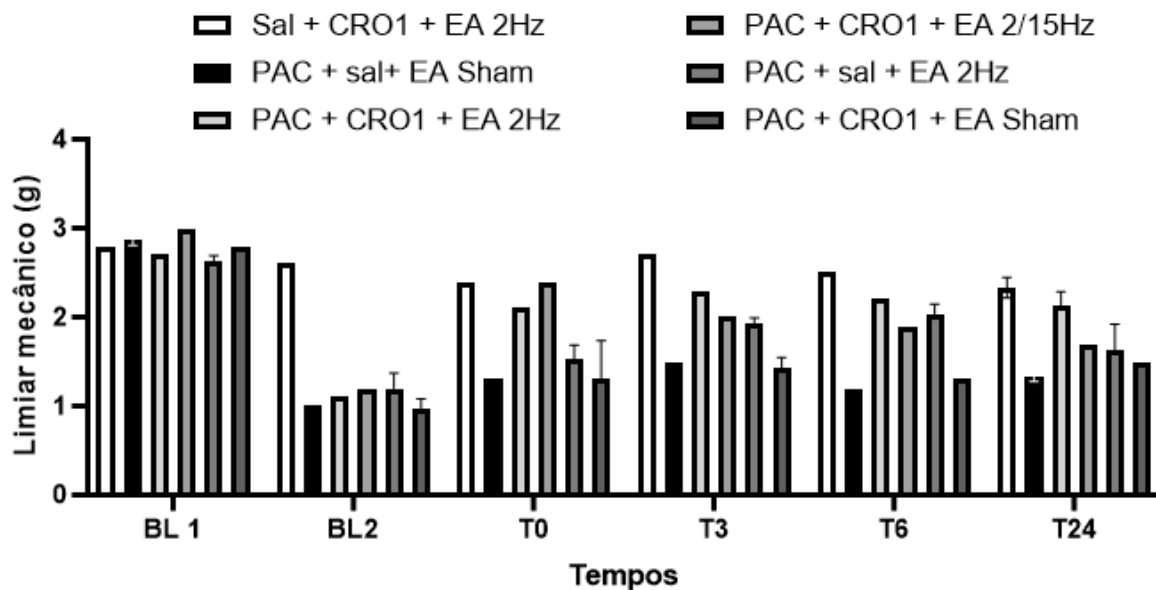


Fonte: da autora.

### 5.3 Efeitos da administração de CRO 1 nos acupontos *E36* e *B60* sobre a hiperalgesia induzida por PAC

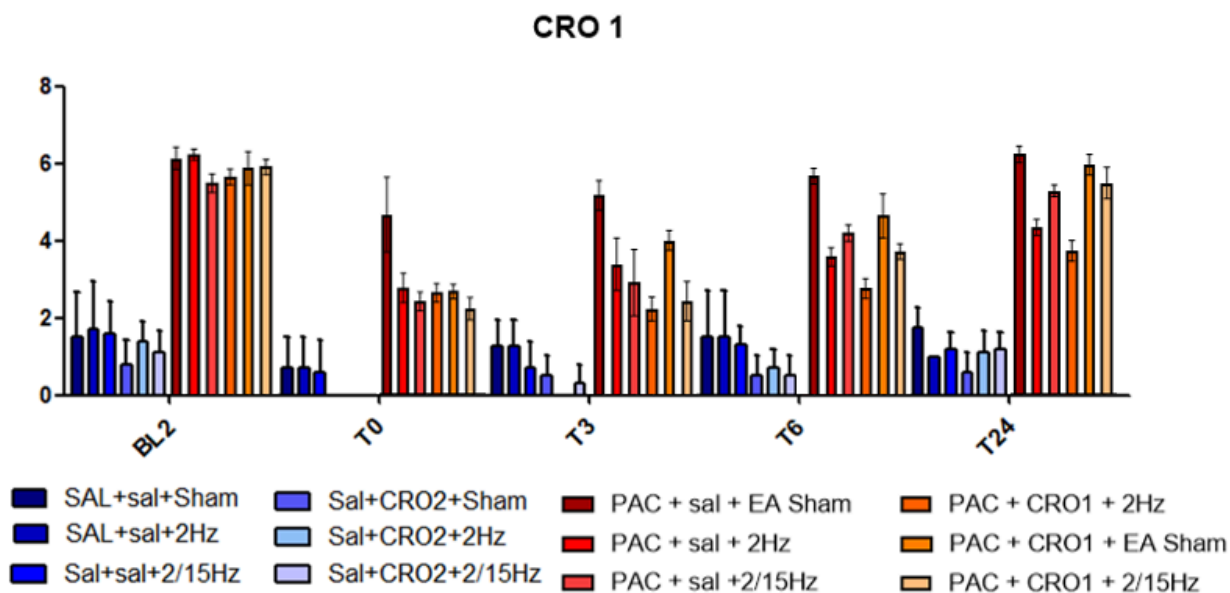
Os resultados deste estudo estão ilustrados no Gráfico 6. Após a administração de PAC, observou-se uma diminuição no limiar mecânico de dor, refletida pelo aumento da resposta de retirada da pata, particularmente evidente no tempo BL2. A aplicação de CRO 1 conseguiu atenuar os comportamentos hiperalgésicos gerados pela administração de PAC, embora essa redução não tenha sido estatisticamente significativa em todos os intervalos de tempo monitorados (T0, T1, T6 e T24 horas). Nos animais tratados com EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz nos acupontos *E36* e *B60*, observou-se uma modificação nos limiares de dor nos intervalos de tempo mencionados (T0, T1, T6 e T24 horas). Vale ressaltar que a diminuição das respostas associadas ao quadro de dor foi ainda mais notável na combinação da dose CRO1 com EA 2Hz. As curvas representadas no Gráfico 4 divergiram de acordo com o tipo de tratamento ( $F_{5,35}=76,194$ ;  $p < 0,01$ ) e o período de tempo ( $F_{5,175}=196,397$ ;  $p < 0,01$ ), exibindo uma notável interação significativa entre o tratamento e o tempo ( $F_{30,125}=11,281$ ;  $p < 0,05$ ).

Gráfico 5 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de CRO 1 ou administração EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz nos acupontos *E36* e *B60* em ratos após administração de PAC. As colunas representam média + E.P.M de 10 animais. (#) Diferentes do grupo PAC+Salina ( $p<0,05$ ).



Fonte: da autora.

Gráfico 6 - Efeito sobre a alodinia ao frio produzido pela aplicação de CRO 1 ou administração EA nas frequências de 2 Hz e 2/15Hz nos acupontos *E36* e *B60* em ratos após administração de PAC. As colunas representam média + E.P.M de 10 animais. (#) Diferentes do grupo PAC+Salina ( $p<0,05$ ).



Fonte: da autora.

## 6 DISCUSSÃO

Em vista dos resultados observados durante este estudo, é possível analisar cada dose e frequência de maneira singular. Tendo em vista que a crotalfina é considerada um composto de grande estabilidade e sendo possível sua administração oral de baixas doses, é visado o interesse em diminuir a dose e alcançar um objetivo terapêutico através de associações de vias opiodérgicas, como por exemplo a eletroacupuntura.

Estudos prévios demonstraram que a crotalfina exibe propriedades analgésicas notáveis dentro de uma faixa de doses específicas, tipicamente entre 0,2 a 5µg/kg. Estes estudos utilizaram modelos animais nos quais a administração deste composto resultou na inibição de comportamentos indicativos de dor, como lambidas e levantamento de patas. Por exemplo, conforme evidenciado, a crotalfina demonstrou efeitos analgésicos consistentes nessa faixa de dosagem. Adicionalmente, o estudo explorou o uso do veneno bruto da cobra brasileira, fonte da crotalfina, por via oral, que por sua vez também indicou analgesia prolongada, embora com uma menor eficácia quantitativa na inibição da nocicepção nos animais (Gutierrez *et al.*, 2008).

No entanto, mesmo diante desses resultados promissores, a determinação exata da dose terapêutica ideal da crotalfina permanece incerta. Observa-se que o peptídeo isolado, em comparação com a utilização do veneno bruto, parece sugerir uma maior eficácia analgésica. Isso levanta questões cruciais sobre a concentração e a forma de administração mais efetivas desse composto para alcançar os melhores resultados analgésicos (Konno *et al.*, 2008)

Os testes realizados em intervalos de tempo específicos, como T0, T3, T6 e T24, buscam replicar um tratamento agudo da dor neuropática. Esses intervalos de tempo referem-se à coleta de dados durante as primeiras 24 horas de interação com os tratamentos aplicados. É crucial salientar que estudos de curto prazo, que envolvem o uso de opioides no tratamento da dor neuropática, frequentemente apresentam resultados contraditórios. Em muitos casos, pacientes participantes de ensaios clínicos optaram por abandonar o tratamento, mesmo que os sintomas não representassem uma ameaça à vida do indivíduo (Moore *et al.*, 2011)

Por outro lado, pesquisas que empregam protocolos de médio prazo observaram uma considerável diferença na eficácia dos opioides em comparação

com o placebo no contexto da dor neuropática. Como observado, em estudos com uma duração mais prolongada, a taxa de eficácia dos opioides tende a ser significativamente maior. Esse padrão levanta questões pertinentes sobre a interpretação dos resultados em diferentes prazos de estudo e ressalta a necessidade de considerar a cronologia do tratamento na avaliação de sua eficácia e tolerabilidade pelos pacientes (McNicol *et al.*, 2013).

Logo, a investigação trazida sobre pequenas doses e associações é amplamente contundente no âmbito farmacológico agudo, das primeiras 24h de interação. No primeiro gráfico, é possível ver a concentração de dose chamada CRO 2, ou seja, de 5µg/kg em diferentes frequências de eletroacupuntura. É visível a manutenção da crise nociceptiva instalada no modelo animal, no grupo Pac+sham+EA sham, comprovando a dor neuropática através do quimioterápico, que por sua vez declinou o limiar dos grupos que fizeram seu uso. Também é possível enxergar que apenas a dose CRO 2 ou a EA não alcançam os bons resultados da administração das duas terapias combinadas.

Um estudo realizado em 2000 destacou a interação entre a morfina, um opióide, e a eletroacupuntura. Neste estudo, foi observado que o uso prolongado de morfina resultou na ativação de marcadores apoptóticos em timócitos, células que desempenham um papel crucial na regulação do sistema imunológico. No entanto, quando a morfina foi combinada com a eletroacupuntura, os dados indicaram uma diminuição na ocorrência de morte celular. Esses resultados sugerem que a combinação das duas terapias reduziu os marcadores de danos celulares associados ao uso prolongado de opióides, indicando um potencial de redução da dose necessária para efeitos terapêuticos a longo prazo (Zhang *et al.*, 2000).

A pesquisa apontou para uma perspectiva promissora ao unir a eletroacupuntura à administração de opioides como a morfina. Ao reduzir os marcadores de apoptose em timócitos, o estudo sugere a possibilidade de mitigar os efeitos adversos do uso prolongado de opióides no sistema imunológico. Isso poderia representar uma estratégia potencial para minimizar o risco de danos teciduais associados ao uso prolongado dessas substâncias que são amplamente utilizadas na prática clínica, indicando a relevância de abordagens combinadas para reduzir a dose dessas substâncias, especialmente em tratamentos de longo prazo.

Os resultados iniciais apresentados no primeiro gráfico sugerem que todas as frequências combinadas com a crotalfina na dose de 5µg/kg demonstraram eficácia no alívio da dor. No entanto, ao analisar as diferentes modulações da corrente utilizadas, foram observadas discrepâncias nos comportamentos nociceptivos dos animais. Por exemplo, o uso da frequência 2/15 Hz mostrou resultados mais imediatos em comparação com a frequência de 2Hz. Surpreendentemente, a frequência de 2Hz exibiu um efeito analgésico mais prolongado. Essa distinção nos padrões de resposta sugere diferenças na forma como as diferentes frequências de estimulação interagem com a ação da crotalfina, impactando a resposta nociceptiva dos animais.

Essas discrepâncias são corroboradas pelos gráficos três e cinco, uso das doses 1 e 50 µg/kg reforçando a influência das diferentes frequências de eletroestimulação na resposta nociceptiva dos animais. Esses resultados apontam para uma relação complexa entre a frequência da corrente na eletroacupuntura, a duração e rapidez dos efeitos analgésicos quando combinados com a crotalfina. Tal distinção nos padrões de resposta sugere a necessidade de uma análise mais aprofundada dos mecanismos de ação juntamente à interação entre as frequências de estimulação e os efeitos da crotalfina no alívio da dor.

A análise dos efeitos da corrente de 2 Hz destaca sua classificação como uma frequência de baixa intensidade que se repete ao longo do protocolo de tratamento. Essa modulação é reconhecida por desencadear a liberação de encefalina e endorfina, dois opióides endógenos notavelmente eficazes no controle da dor. Ambos se ligam ao receptor Mu, o qual é amplamente predominante no organismo humano (Han, 2003). Tal receptor também é responsável pela ligação com a crotalfina, podendo ser o motivo de não haver tantas ligações imediatas após a administração da substância e seu crescente poder analgésico duradouro. Além disso, essa mesma frequência é capaz de estimular a liberação de corticosteróides, substâncias influenciadas hormonalmente que desempenham várias funções, incluindo a regulação da resposta inflamatória, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar (Scherholz *et al.*, 2019). A sinergia entre esses mecanismos de ação parece estar em consonância com os resultados positivos observados na elevação do limiar nociceptivo em animais com dor neuropática após o tratamento com eletroacupuntura.

Essa análise destaca os mecanismos específicos que acompanham a frequência de 2 Hz na eletroacupuntura, demonstrando como ela influencia a liberação de opióides endógenos e corticosteróides, ambos associados a efeitos analgésicos e anti-inflamatórios. A correlação desses efeitos com a melhora do limiar nociceptivo em animais com dor neuropática após o tratamento sugere a relevância desses mecanismos na eficácia da eletroacupuntura no alívio da dor. Porém, não se comporta igualmente em relação à alodinia ao frio, vista nos gráficos 2, 4 e 6. Uma vez que a vasodilatação pode não ser o mecanismo mais indicado nesse caso.

A frequência de 2/15 Hz demonstrou consistência em sua interação com as três doses distintas de crotalina, nomeadas como CRO1, CRO2 e CRO3, como evidenciado nos gráficos 1, 3 e 5. As representações gráficas indicam uma tendência uniforme, destacando um desempenho mais eficaz imediatamente após a aplicação quando comparado à frequência mais baixa, 2 Hz. No entanto, nota-se uma diminuição dessa eficácia ao longo do último intervalo de tempo, indicando uma queda no efeito analgésico no ponto final da observação. Essa tendência é visualmente perceptível nas barras do gráfico, sugerindo uma resposta inicial mais intensa da frequência 2/15 Hz, porém, com uma redução de sua eficácia ao longo do tempo, em comparação com a frequência mais baixa ao final do período analisado.

A oscilação entre 2 Hz e 15 Hz a cada pulso utilizada na eletroacupuntura pode explicar o comportamento observado. A frequência de 15Hz, é classificada como intermediária, logo, se aproxima mais a um mecanismo de alta frequência. Essa condição tem sido associada à liberação de dinorfina, um opióide endógeno, e serotonina, um neurotransmissor que desempenha um papel significativo na modulação da dor. A dinorfina, ligante dos receptores Kappa, que por sua vez não é tão numeroso quanto o receptor Mu, porém, apresenta afinidade distinta em relação à crotalina. Após a administração oral, ambos os receptores opióides são inicialmente ocupados, mas algumas horas depois, apenas aquele em menor quantidade permanece estimulado (Gao *et al.*, 2022).

Essa oscilação entre frequências parece influenciar a liberação de diferentes substâncias, incluindo dinorfina e serotonina (Han *et al.*, 1982), que desempenham papéis cruciais na modulação da dor. A especificidade da dinorfina ao receptor Kappa, mesmo não sendo o mais abundante, sugere uma interação peculiar com a

crotalfina, indicando uma sequência temporal na ativação dos receptores opióides após a administração, o que pode ter implicações na eficácia e na duração do alívio da dor proporcionado pela crotalfina.

Ao examinar as diferentes doses de crotalfina, destaca-se que a dose mais eficaz com a menor quantidade de substância é a CRO2. Embora seja dez vezes menor que a dose CRO3, a CRO2 apresentou resultados comparáveis, e é apenas cinco vezes maior que a CRO1, proporcionando melhorias significativas na resposta analgésica. Os resultados promissores indicam que mesmo a menor dose administrada em conjunto com a eletroacupuntura alcançou resultados positivos.

Esses achados são encorajadores, especialmente considerando a aplicação clínica. É consenso na prática médica a busca pela melhor analgesia para o paciente com a menor dose de medicamento possível. Essa abordagem pode ser ainda mais crucial para pacientes após o uso de quimioterapia, que muitas vezes apresentam um organismo debilitado e sensível aos efeitos dos fármacos. A associação de uma terapia não farmacológica, como a eletroacupuntura, mesmo com doses reduzidas de crotalfina, representa uma perspectiva promissora no contexto do alívio da dor em pacientes clinicamente sensíveis.

## 7 CONCLUSÃO

Após a análise detalhada dos resultados e discussões, fica evidente a eficácia do tratamento combinado de crotalina e eletroacupuntura no controle da dor neuropática induzida pela quimioterapia. Os resultados obtidos com as três doses testadas, administradas por via oral e em conjunto com frequências de 2 Hz e 2/15 Hz nos pontos de acupuntura E36 e B60, revelam resultados promissores. Notavelmente, observou-se que, para alcançar a melhor resposta analgésica com a menor dose possível, a concentração de 5 µg/kg de crotalina apresentou resultados consistentes e alinhados com as expectativas estabelecidas na literatura.

É importante ressaltar que este estudo foi conduzido em um contexto experimental com animais, o que demanda cautela ao extrapolar para aplicações clínicas. Embora os resultados sejam promissores, são necessários mais testes e investigações clínicas para validar a eficácia e segurança desse tratamento em pacientes humanos. A continuidade dessa pesquisa é crucial para o desenvolvimento futuro e a possível implementação dessa abordagem terapêutica no cenário clínico, visando oferecer alternativas eficazes e de baixo impacto para pacientes com dor neuropática pós-quimioterapia.

## REFERÊNCIAS

- AIRD, S. D. *et al.* **The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin.** *Biochimica Et Biophysica Acta, Virginia*, v. 1040, n. 2, p. 217–224, 3 set. 1990.
- AUTHIER, N. *et al.* **Description of a short-term Taxol®-induced nociceptive neuropathy in rats.** *Brain Research, Auvergne*, v. 887, n. 2, p. 239–249, dez. 2000.
- BON, C. *et al.* **Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin.** *Acta Physiologica Et Pharmacologica Latinoamericana: Organo De La Asociacion Latinoamericana De Ciencias Fisiologicas Y De La Asociacion Latinoamericana De Farmacologia, Pasteur*, v. 39, n. 4, p. 439–448, 1989.
- BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. **Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment.** *The Lancet Neurology, Schleswig-Holstein*, v. 9, n. 8, p. 807–819, ago. 2010.
- BOYETTE-DAVIS, J. *et al.* **Intraepidermal nerve fiber loss corresponds to the development ao taxol-induced hyperalgesia and can be prevented by treatment with minocycline.** *Pain, Guangzhou*, v. 152, n. 2, p. 308-313, fev. 2011.
- BRAZIL, O. V. **Neurotoxins from the South American rattle snake venom.** *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi. Journal of the Formosan Medical Association, Taiwan*, v. 71, n. 6, p. 394–400, 28 jul. 1972.
- BRIGATTE, P. *et al.* **Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms.** *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, São Paulo*, v. 39, n. 9, p. 1399–1410, 1 set. 2001.
- CALIXTO, J. *et al.* **Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions.** *Pharmacology & Therapeutics, Santa Catarina*, v. 106, n. 2, p. 179–208, maio 2005.
- CARDOSO, M. G. DE M. **Efeito potencializador do antineoplásico paclitaxel (taxol®) na hiperalgesia inflamatória experimental induzida por zymosan.** Fortaleza, repositorio.ufc.br, 2003.
- CARVALHO, R. C. DE *et al.* **Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study.** *Brazilian Journal Of Pain, São Paulo*, v. 1, n. 4, 2018.
- CHAPLAN, S. R. *et al.* **Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.** *Journal of Neuroscience Methods, San Diego*, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1 jul. 1994.
- CHAUDHRY, V. *et al.* **Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: Clinical and electrophysiological studies.** *Annals of Neurology, Baltimore*, v. 35, n. 3, p. 304–311, mar. 1994.

CUI, Hongmei; ARNST, Kinsie; MILLER, Duane D.; LI, Wei. **Recent Advances in Elucidating Paclitaxel Resistance Mechanisms in Non-small Cell Lung Cancer and Strategies to Overcome Drug Resistance.** Current Medicinal Chemistry, [S.L.], Tennessee, v. 27, n. 39, p. 6573-6595, 24 nov. 2020.

DE FREITAS, B. G. *et al.* **PKC $\zeta$ -Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Mediates Crotalphine-Induced Antinociception.** Toxins, São Paulo, v. 13, n. 12, p. 912, 20 dez. 2021

DESANTANA, J. M. *et al.* **Definition of pain revised after four decades.** Brazilian Journal Of Pain, São Paulo, v. 3, n. 3, 2020.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. **Nociceptors: the sensors of the pain pathway.** Journal of Clinical Investigation, La Jolla, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 1 nov. 2010.

FAURE, G. *et al.* **Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications.** Biochemistry, Pasteur, v. 30, n. 32, p. 8074–8083, 13 ago. 1991.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. **Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy.** Pain, Montreal, v. 109, n. 1, p. 150–161, maio 2004.

FUSUMADA, K. *et al.* **c-Fos Expression in the Periaqueductal Gray is Induced by Electroacupuncture in the Rat, with Possible Reference to GABAergic Neurons.** Okajimas Folia Anatomica Japonica, Kagawa, v. 84, n. 1, p. 1–10, 2007.

GAO YH, Wang JY, Han YJ, Liu JL.  **$\kappa$ -opioid receptor is involved in electroacupuncture analgesia via inhibition of spinal microglial Toll-like receptor 4 in neuropathic pain rats.** Zhen Ci Yan Jiu. Beijing, 2022 Feb 25;47(2):95-100.

GIORGI, R.; BERNARDI, M. M.; CURY, Y. **Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom.** Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, São Paulo, v. 31, n. 10, p. 1257–1265, 1 out. 1993.

GUTIERREZ, V. P. *et al.* **Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors.** European Journal of Pharmacology, São Paulo, v. 594, n. 1-3, p. 84–92, out. 2008.

HAN, J.S., TERENIUS, L. **Neurochemical basis of acupuncture analgesia.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Beijing, 22:193-220, 1982.

HAN, Z. *et al.* **Endomorphin-1 mediates 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture analgesia in the rat.** Neuroscience Letters, Beijing, v. 274, n. 2, p. 75–78, out. 1999.

HAN, J.-S. **Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies.** Trends in Neurosciences, Beijing, v. 26, n. 1, p. 17–22, jan. 2003.

- HAN, J.-S. **Acupuncture and endorphins**. *Neuroscience Letters*, Beijing, v. 361, n. 1-3, p. 258-261, maio 2004.
- HESS, A. *et al.* **Imaging of hyperalgesia in rats by functional MRI**. *European Journal of Pain*, Germany, v. 11, n. 1, p. 109–109, jan. 2007.
- HILKENS, P. H.; VEN DEN BENT, M. J. **Chemotherapy-induced peripheral neuropathy**. *Journal of the peripheral nervous system: JPNS*, Poland, v. 2, n. 4, p. 350–361, 1997.
- HUANG, C. *et al.* **Endomorphin and  $\mu$ -opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation**. *Neuroscience Letters*, Beijing, v. 294, n. 3, p. 159–162, nov. 2000.
- JENSEN, T. S. *et al.* **A new definition of neuropathic pain**. *Pain*, Germany, v. 152, n. 10, p. 2204–2205, out. 2011.
- JI, R.-R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. **Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?** *Pain*, Durham, v. 154, p. S10–S28, dez. 2013.
- KALYNOVSKA, N.; ADAMEK, P.; PALECEK, J. **TRPV1 Receptors Contribute to Paclitaxel-Induced c-Fos Expression in Spinal Cord Dorsal Horn Neurons**. *Physiological Research*, Prague, p. 549–552, 21 jun. 2017
- KAPLAN, J. G.; EINZIG, A. I.; SCHAUMBURG, H. H. **Taxol causes permanent large fiber peripheral nerve dysfunction: a lesson for preventative strategies**. *Journal of Neuro-Oncology*, New York, v. 16, n. 2, p. 105–107, jun. 1993.
- KIM, S. K. *et al.* **Effects of electroacupuncture on cold allodynia in a rat model of neuropathic pain: Mediation by spinal adrenergic and serotonergic receptors**. *Experimental Neurology*, Seoul, v. 195, n. 2, p. 430–436, out. 2005.
- KONNO, K. *et al.* **Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus***. *Peptides*, São Paulo, v. 29, n. 8, p. 1293–1304, ago. 2008.
- LEE, J. J.; SWAIN, S. M. **Peripheral Neuropathy Induced by Microtubule-Stabilizing Agents**. *Journal of Clinical Oncology*, Bethesda, v. 24, n. 10, p. 1633–1642, 1 abr. 2006.
- LI, Y. *et al.* **Electroacupuncture Alleviates Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathic Pain in Rats via Suppressing TLR4 Signaling and TRPV1 Upregulation in Sensory Neurons**. *International Journal of Molecular Sciences*, Hangzhou, v. 20, n. 23, p. 5917, 25 nov. 2019.
- LUCENA, F.; MCDUGALL, J. J. **Protease Activated Receptors and Arthritis**. *International Journal of Molecular Sciences*, Halifax, v. 22, n. 17, p. 9352, 28 ago. 2021.
- MACHADO, F. C. *et al.* **Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine**. *British Journal of Pharmacology*, São Paulo, v. 171, n. 4, p. 961–972, 24 jan. 2014.

MAJITHIA, N.; LOPRINZI, C. L.; SMITH, T. J. **New Practical Approaches to Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: Prevention, Assessment, and Treatment.** *Oncology*, Williston Park, N.Y., v. 30, n. 11, p. 1020–1029, 15 nov. 2016.

MCNICOL ED, Midbari A, Eisenberg E. **Opioids for neuropathic pain.** *Cochrane Database Syst Rev*. Boston, 2013 Aug 29;2013(8).

MOORE RA, Wiffen PJ, Derry S, McQuay HJ. **Gabapentin for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults.** *Cochrane Database of Systematic Reviews* Oxford, 2011, Issue 3.

OLIVEIRA, Clara Costa. **Para compreender o sofrimento humano.** *Revista Bioética*, Braga, v. 24, n. 2, 2016.

PARK, J. *et al.* **The Status and Future of Acupuncture Clinical Research.** *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, Chapel Hill, v. 14, n. 7, p. 871–881, set. 2008.

PACE, A. *et al.* **Paclitaxel neurotoxicity: clinical and neurophysiological study of 23 patients.** *The Italian Journal of Neurological Sciences*, Roma, v. 18, n. 2, p. 73–79, abr. 1997.

PICOLO, G. *et al.* **The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response.** *Toxicon*, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 223–227, 1998.

PICOLO, G., GIORGI, R., & CURY, Y. (2009).  **$\delta$ -opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom.** *European Journal of Pharmacology*, São Paulo, 605(1-3), 58-64.

PRUT, L.; BELZUNG, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.** *European Journal of Pharmacology*, Tours, v. 463, n. 1-3, p. 3–33, fev. 2003.

POLOMANO, R. C. *et al.* **A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel.** *Pain*, Philadelphia, v. 94, n. 3, p. 293–304, dez. 2001.

RADIS-BAPTISTA, G. (2011). **Snake venom cathelicidins as natural antimicrobial peptides.** *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, Campo Grande, 3(2), 863-881.

ROCHA, A. D. X.; ALFIERI, F. M.; SILVA, N. C. DE O. V. E. **Prevalence of chronic pain and associated factors in a small town in southern Brazil.** *Brazilian Journal Of Pain*, São Paulo, v. 4, 2021.

ROWINSKY, E. K. *et al.* **Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol).** *Seminars in Oncology*, Baltimore, v. 20, n. 4 Suppl 3, p. 1–15, 1 ago. 1993.

SCHERHOLZ ML, Schlesinger N, Androulakis IP. **Chronopharmacology of glucocorticoids.** *Adv Drug Deliv Rev*. Piscataway, 2019 Nov-Dec;151-152:245-261.

SCRIPTURE, C. D., FIGG, W. D., & SPARREBOOM, A. (2006). **Peripheral neuropathy induced by Paclitaxel: recent insights and future perspectives.** *Current Neuropharmacology*, Bethesda, 4(2), 165-172.

SERETNY, M., CURRIE, G. L., SENA, E. S., RAMNARINE, S., GRANT, R., MACLEOD, M. R., ... & FALLON, M. T. (2014). **Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis.** *Pain*, Edinburgh, 155(12), 2461-2470.

SHAYGAN, M. *et al.* **A National Survey of the Prevalence of Chronic Pain in Nursing Students and the Associated Factors.** *Investigación y Educación en Enfermería*, Shiraz, v. 40, n. 1, 28 mar. 2022.

SILVA, M. L.; SILVA, J. R. T.; PRADO, W. A. **Analgesia induced by 2- or 100-Hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the anterior pretectal nucleus.** *Life Sciences*, Ribeirão Preto, v. 93, n. 20, p. 742–754, nov. 2013.

SILVA, M. L.; SILVA, J. R. T.; PRADO, W. A. **Retrosplenial Cortex is Involved in Analgesia Induced by 2- but not 100-Hz Electroacupuncture in the Rat Tail-Flick Test.** *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, Ribeirão Preto, v. 5, n. 1, p. 42–45, fev. 2012.

SPENCER, Caroline M. *et al.* **Paclitaxel.** *Drugs*, [S.L.], Auckland, v. 48, n. 5, p. 794-847, nov. 1994. Springer Science and Business Media LLC.

WARWICK, R. A.; HANANI, M. **The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain.** *European Journal of Pain*, Jerusalem, v. 17, n. 4, p. 571–580, 12 out. 2012.

WILSON, W H *et al.* **Paclitaxel in doxorubicin-refractory or mitoxantrone-refractory breast cancer: a phase i/ii trial of 96-hour infusion.** *Journal Of Clinical Oncology*, [S.L.], Bethesda, v. 12, n. 8, p. 1621-1629, ago. 1994. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

XU, Y. *et al.* **Anti-nociceptive roles of the glia-specific metabolic inhibitor fluorocitrate in paclitaxel-evoked neuropathic pain.** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Shanghai, v. 48, n. 10, p. 902–908, 1 out. 2016.

YAM, M. *et al.* **General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation.** *International Journal of Molecular Sciences*, Malaysia, v. 19, n. 8, p. 2164, 24 jul. 2018.

ZHANG, Y. *et al.* **Effect of morphine and electro-acupunture (ea) on apoptosis of thymocytes.** *Acupuncture & Electro-Therapeutics Research A*, Shanghai, v. 25, n. 1, p. 17–26, 1 jan. 2000.

ZHANG, W.-T. *et al.* **Relations between brain network activation and analgesic effect induced by low vs. high frequency electrical acupoint stimulation in different subjects: a functional magnetic resonance imaging study.** *Brain Research*, Beijing, v. 982, n. 2, p. 168–178, ago. 2003.

ZHANG, H. *et al.* **Evidence That Spinal Astrocytes but Not Microglia Contribute to the Pathogenesis of Paclitaxel-Induced Painful Neuropathy.** *The Journal of Pain*, Houston, v. 13, n. 3, p. 293–303, mar. 2012.

ZHANG, H. *et al.* **Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy induced peripheral neuropathy.** *The journal of pain: official journal of the American Pain Society*, Houston, v. 17, n. 7, p. 775–786, 1 jul. 2016.

ZIMMERMANN, M. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.** *Pain*, Germany, v. 16, n. 2, p. 109–110, jun. 1983.