



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CÁSSIA CALIXTO DE CAMPOS

**O TUMOR EXPERIMENTAL DE EHRLICH INDUZ  
COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO EM CAMUNDONGOS:  
PADRONIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO PARA O ESTUDO  
DA FISIOPATOLOGIA DA DOR NO CÂNCER E TRIAGEM DE  
ANALGÉSICOS.**

CÁSSIA CALIXTO DE CAMPOS

**O TUMOR EXPERIMENTAL DE EHRLICH INDUZ  
COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO EM CAMUNDONGOS:  
PADRONIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO PARA O ESTUDO  
DA FISIOPATOLOGIA DA DOR NO CÂNCER E TRIAGEM DE  
ANALGÉSICOS.**

Dissertação apresentada á Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Jr.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C198t Campos, Cássia Calixto de.  
O tumor experimental de Ehrlich induz comportamento nociceptivo em camundongos : padronização de um novo modelo para o estudo da fisiopatologia da dor no câncer e triagem de analgésicos / Cássia Calixto de Campos. – Londrina, 2013.  
47 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Câncer – Dor – Teses. 2. Tumor de Ehrlich – Estudos experimentais – Teses. 3. Agentes antiinflamatórios – Teses. 4. Opioides – Teses. 5. Patologia experimental – Teses. I. Verri Junior, Waldiceu Aparecido. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-006.6

CÁSSIA CALIXTO DE CAMPOS

**O TUMOR EXPERIMENTAL DE EHRLICH INDUZ COMPORTAMENTO  
NOCICEPTIVO EM CAMUNDONGOS:  
PADRONIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO PARA O ESTUDO DA  
FISIOPATOLOGIA DA DOR NO CÂNCER E TRIAGEM DE  
ANALGÉSICOS.**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre  
pelo Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Experimental da Universidade  
Estadual de Londrina

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador. Waldiceu Aparecido Verri  
Junior  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Componente da Banca. Marcelo Henrique  
Napimoga  
SLMandic – Campinas – SP

---

Profa. Componente da Banca. Graziela  
Scalianti Ceravolo  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 8 de novembro de 2013.

Trabalho realizado no laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer do Centro de Ciências Biológicas no Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, com o auxílio financeiro da CAPES.

## **Dedico**

Este trabalho é dedicado a minha família: Meus Pais e Meu Irmão por seu amor, carinho, paciência e por sempre estarem ao meu lado, incentivando, apoiando e dando suporte para realização deste sonho; Em especial ao meu marido, por sua dedicação diária a mim, por seu, apoio, auxílio, paciência e compreensão nesta etapa de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ser meu criador, guiar minha vida e ser minha sustentação diária;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior, pela oportunidade que tem me dado durante tanto tempo, pelos ensinamentos, incentivo, confiança em meu trabalho e, sobretudo pela paciência durante esta jornada;

Agradeço a meus pais, Aparecido e Maria de Lourdes, pela educação, amor, carinho, atenção, cuidado e suporte que me deram durante minha vida. Vocês não são apenas pais, são amigos, responsáveis por quem sou, e a razão da minha vida, com vocês aprendi o que é o amor incondicional;

Ao meu irmão João Eurípedes, pelo carinho, amizade, amor, por seu meu companheiro e até mesmo pelas brigas;

Ao meu marido, João Paulo, meu grande amor, por ser compreensivo, paciente, companheiro, por transformar meus sonhos em realidade e por todo amor e carinho que proporciona em minha vida;

As amigas que fiz durante esta jornada que ficarão para sempre em meu coração, Ana Carla e Mab, vocês foram anjos que apareceram em minha vida;

Aos amigos e colegas de Laboratório, Thacyana, Daniela Medeiros, Sandra, Suelen, Karla, Larissa, Daniela Longhi, Mirian, Talita, Fabiane, Cátia, Sérgio, Felipe e Kenji que em algum momento ajudaram a realização deste trabalho e transformaram as rotinas diárias em histórias felizes;

Aos professores do Programa da Pós-graduação em Patologia Experimental, pelos ensinamentos e paciência;

Ao Zui e ao Pedro, pelo carinho, pelas “cantorias”, pelos ensinamentos e auxílio nos experimentos;

Ao apoio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil), Conselho Nacional e Pesquisa (CNPq, Brasil) e Secretaria de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI) / Fundação Araucária.

Em fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho, sendo com suporte experimental, emocional ou financeiro.

## **Epígrafe**

*“O mundo pode até fazer você chorar,  
mas Deus te quer sorrindo”*

*Padre Zezinho.*

CALIXTO-CAMPOS, Cássia. **O tumor experimental de Ehrlich induz comportamento nociceptivo em camundongos:** padronização de um novo modelo para o estudo da fisiopatologia da dor no câncer e triagem de analgésicos. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

## RESUMO

A dor afeta diretamente a qualidade de vida dos pacientes com câncer o que ressalta a importância deste campo de pesquisa. O tumor de Ehrlich foi descrito em 1905 como um adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas e pode ser desenvolvido em formas sólidas e ascítica, dependendo da administração em tecidos ou cavidades, respectivamente. O presente estudo investigou se a administração subcutânea plantar das células tumorais de Ehrlich induz o comportamento da dor manifesta (agitação da pata), hiperalgesia mecânica e térmica em camundongos, e caracterizou inicialmente a susceptibilidade farmacológica do modelo. As células tumorais de Ehrlich ( $1 \times 10^4$ - $10^7$  células) induziram hiperalgesia mecânica, edema e agitação da pata de maneira dose-dependente em relação ao grupo salina entre os dias 2-12 (48 h de intervalo entre as medições). Não houve diferença entre as doses de células quanto à hiperalgesia térmica no teste da placa quente. A dose de  $1 \times 10^6$  células foi escolhida para experimentos de hiperalgesia e  $1 \times 10^7$  para dor manifesta. A indometacina (inibidor da cicloxigenase, 0,7, 2 e 6 mg / kg) e cloridrato de amitriptilina (antidepressivo tricíclico; 3, 10 e 30 mg / kg) não foram eficazes em atenuar a hiperalgesia térmica e mecânica e dor manifesta. Por outro lado, a morfina (opióide, 1, 3 e 10 mg / kg) inibiu a hiperalgesia térmica, mecânica e dor manifesta. Os efeitos da morfina foram prevenidos pelo naloxona (antagonista de receptor opióide 1 mg / kg). Nenhum dos tratamentos afetou o crescimento tumoral. Os resultados demonstram que além da proliferação tumoral, a administração das células tumorais de Ehrlich pode representar um novo modelo para o estudo da dor no câncer, especialmente a dor susceptível a tratamento com opióide (morfina), mas não a inibidor da cicloxigenase (indometacina) ou antidepressivo tricíclico (amitriptilina).

**Palavras-chave:** Tumor de Ehrlich. Opióide. Antidepressivo tricíclico. Inibidor da cicloxigenase. Dor no câncer.

CALIXTO-CAMPOS, Cássia. **Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening.** Dissertation (Master's Experimental Patotology) 2013. 47 p. Dissertation – Londrina State University, Londrina. 2013.

## ABSTRACT

Pain directly affects cancer patients' life quality supporting the importance of this research field. The Ehrlich tumor was described in 1905 as a mammary adenocarcinoma of mice that can be developed in solid and ascitic forms depending on its administration in tissues or cavities, respectively. The present study investigates whether the subcutaneous plantar administration of Ehrlich tumor cells induces overt pain-like behavior (flinches), mechanical and thermal hyperalgesia in mice, and initial pharmacological susceptibility characteristics. Ehrlich tumor cells induced dose ( $1 \times 10^4$ - $10^7$  cells)-dependent mechanical hyperalgesia (electronic version of von Frey filaments), edema (caliper), and flinches compared to saline group between days 2-12 (48 h interval between measurements). There was no difference between doses of cells regarding thermal hyperalgesia in the hot plate test. The dose of  $1 \times 10^6$  cells was chosen for next experiments. Indomethacin (cyclooxygenase inhibitor, 0.7; 2 and 6 mg/kg) and amitriptyline hydrochloride (tricyclic antidepressant; 3; 10 and 30 mg/kg) treatments did not affect flinches, and thermal and mechanical hyperalgesia. On the other hand, morphine (opioid, 1; 3 and 10 mg/kg) inhibited the flinch behavior, thermal and mechanical hyperalgesia. These effects of morphine on pain-like behavior were prevented by naloxone (1 mg/kg) treatment. None of the treatments affected tumor growth(edema). The results showed that in addition to tumor growth, administration of Ehrlich tumor cells may represent a novel model for the study of cancer pain, specially the pain that is susceptible to treatment with opioids (morphine), but not to cyclooxygenase inhibitor (indomethacin) or tricyclic antidepressant (amitriptyline).

**Key-words:** Ehrlich tumor. Hyperalgesia. Opioid. Tricyclic antidepressant. Cyclooxygenase inhibitor. Cancer pain.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Antiinflamatório não esteroideal
AKT ou PKB	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H-1	Receptor de Histamina H1
IFN- $\gamma$	Interferon-- $\gamma$
IL1- $\beta$	Interleucina 1- $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina -8
IL-10	Interleucina-10
K <sup>+</sup>	Canais de Potássio sensíveis
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PI <sub>3</sub> K	Fosfatidilinositol 3' cinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- $\beta$	Fator de crescimento
Th1	Subdivisões fenotípicas de linfócitos T
Th2	Subdivisões fenotípicas de linfócitos T
TNF- $\alpha$	Fato de Necrose Tumoral- $\alpha$
TRPV1	Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1
UV	Radiação ultravioleta
5HT <sub>2</sub>	Receptor de Serotonina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	CÂNCER .....	11
1.2	DOR NO CÂNCER .....	13
1.3	TRATAMENTOS PARA DOR NO CÂNCER .....	19
1.3.1	Opióide .....	20
1.3.2	Antiinflamatório não Esteroidal .....	21
1.3.3	Antidepressivo Tricíclico .....	22
1.4	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA DOR NO CÂNCER .....	22
1.5	TUMOR DE EHRLICH .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL .....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO</b> .....	26
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER

O Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2013) define o câncer como um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento descontrolado das células. As células cancerígenas podem se dividir rapidamente e tendem a ser agressivas e incontroláveis, originando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, originando o processo metastático.

A Organização Mundial da Saúde estima que no ano de 2030, 27 milhões de casos de câncer acontecerão no mundo, sendo que aproximadamente 17 milhões de pessoas morrerão devido ao câncer. No Brasil, estima-se que em 2012-2013 ocorrerão 518.510 novos casos de câncer (INCA, 2013).

As causas do desenvolvimento do câncer são variadas, podendo ser de origem externas, internas, ou inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios dos indivíduos. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

O câncer é uma doença crônico-degenerativa considerada um problema de saúde pública (INCA, 2013). A confirmação da doença pode influenciar diretamente o estilo e qualidade de vida do indivíduo (MACHADO; SAWADA, 2008 ; BRIGATTE et al., 2007). O diagnóstico quando realizado precocemente é importante para o incentivo da luta contra a doença, porém pode causar danos devastadores para famílias de ordem psíquica, social e econômica (SILVA, 2004).

O processo pelo qual uma célula normal se transforma em tumoral é bem conhecido e pode ser dividido em três etapas: 1) Iniciação, processo pelo qual uma célula normal se transforma em tumoral, ocorre por aquisições de mutações no genoma, que podem ser resultado de processos endógenos como erros na replicação do DNA, instabilidade química intrínseca das bases de DNA, ataque de radicais livres gerados durante o metabolismo, exposição a agentes exógenos como radiação ionizante, radiação UV, carcinógenos químicos, físico ou patogênico. Se o dano do DNA não for reparado, essas mutações genéticas levarão ao

desenvolvimento de uma célula mutada. As células assim modificadas são denominadas células transformadas e perdem suas características originais tornando-se atípicas (SNUSTAD; SIMMONS, 2001; BOGLIOLO, 2011). A formação do tumor ocorre quando há um aumento da proliferação celular e uma redução da apoptose das células mutadas. Essas mutações geralmente aumentam a função de proto-oncogenes (genes celulares que promovem o crescimento e a diferenciação normal da célula, porém quando alterados levam a uma exacerbação do crescimento celular) e/ou inativam genes supressores de tumor (que regulam negativamente o crescimento da célula); 2) Promoção, processo para formação da massa tumoral, este processo permite a expansão clonal da célula iniciada, transmitindo assim suas mutações para outras células, originando os nódulos, pólipos ou papilomas; 3) Progressão, estágio caracterizado pela transformação das células pré-neoplásicas em tumores malignos com capacidade de invadir tecidos e formar metástases (JAKÓBISIAK; LASEK; GOŁAB, 2003; CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Os tumores podem ser diferenciados de acordo com sua diferenciação e anaplasia (falta de diferenciação), velocidade de crescimento, invasão local e metástase. Isto permite a classificação dos tumores em benignos ou malignos, sendo que os tumores malignos, mas não os benignos sofrem metástase, e o termo câncer usado somente para designar os tumores malignos (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; SNUSTAD; SIMMONS, 2001; BOGLIOLO, 2011). O comportamento clínico dos tumores também pode os classificar em benigno ou maligno pelo aspecto microscópico (critérios histopatológicos) e a origem neoplásica (critérios histogenético) (BOGLIOLO, 2011).

A nomenclatura dos tumores na maioria das vezes depende do seu tecido de origem, o sufixo oma é empregado na denominação de qualquer neoplásica benigna ou maligna; já a palavra carcinoma indica tumor maligno que reproduz epitélio de revestimento e indica malignidade; o termo sarcoma refere-se a neoplasia maligna mesenquimal e indica malignidade; e o termo blastoma pode ser empregado como sinônimo de neoplasia e indica que o tumor reproduz estruturas com características embrionária. Quando a formação da massa tumoral se origina em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são

denominados sarcomas, se a origem for glandular são denominados de adenocarcinoma (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Para que haja sobrevivência da massa tumoral é necessária a presença de três componentes básicos: as células neoplásicas proliferantes, um estroma de suporte feito de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos para a nutrição das células neoplásicas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

## 1.2 DOR NO CÂNCER

A dor é uma sensação desagradável e primariamente tem uma função essencial para o sistema de defesa do corpo (CINGOLANI; HOUSSAY, 2004). É definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão real ou potencial (IASP, 2012), porém na cronicidade pode ser prejudicial ao indivíduo (GUYTON; HALL, 2006).

Na prática experimental o termo nocicepção é utilizado para referir-se ao estímulo nocivo captado por nociceptores. Além disso, também é empregado no estudo com animais o termo hiperalgesia, definido como intensidade dolorosa exacerbada em resposta a um estímulo doloroso e alodinia, quando um estímulo normalmente não doloroso passa a gerar dor (CUNHA et al., 2004; IASP, 2012; VALÉRIO et al., 2009a, 2009b).

A hiperalgesia inflamatória pode ser gerada em consequência de uma complexa interação entre os mediadores inflamatórios e os neurônios nociceptivos, culminando na sensibilização dos nociceptores (revisado por MILLAN, 1999; revisado por SAMAD; SAPIRSTEIN; WOOLF, 2002). A sensibilização dos neurônios é induzida pela ação direta de mediadores inflamatórios primários, tais como prostaglandinas, aminas simpatomiméticas, endotelina, substância P e bradicinina sobre o neurônio nociceptor (CUNHA et al., 2007; revisado por VERRI et al., 2006a).

Quando a  $PGE_2$ , por exemplo, se une ao seu receptor no neurônio, ativa a proteína G acoplada ao receptor. Esta, por sua vez, ativa a enzima adenilato ciclase, a qual passa a produzir adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). O AMPC induz a ativação de proteínas quinases (PKA e PKC), culminando na fosforilação de canais iônicos da membrana do neurônio. Em consequência dessa fosforilação, ocorre um aumento da corrente de influxo de íons cálcio e

sódio. Com isso, há a diminuição do limiar do neurônio nociceptor e aumento da excitabilidade da sua membrana neuronal, facilitando a ativação do nociceptor e a transmissão do impulso nervoso, tornando o nociceptor sensibilizado e resultando em hiperalgesia (revisado por CUNHA et al., 2007; FERREIRA; NAKAMURA; CASTRO, 1978; FERREIRA; NAKAMURA, 1979; NAKAMURA; FERREIRA, 1987; revisado por VERRI et al., 2006a; VILLARREAL et al., 2007). A liberação de mediadores como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, PGE<sub>2</sub>, óxido nítrico, histamina e serotonina por mastócitos ativados contribui para o desenvolvimento e amplificação da magnitude do processo inflamatório, auxiliando também na promoção da hiperalgesia (GALLI; NAKAE; TSAI, 2005).

Em modelos animais, uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são produzidas em consequência da administração de estímulos nocivos, culminando na promoção da hiperalgesia (revisado por VERRI et al., 2006a; VERRI et al., 2006b). Em camundongos estimulados com carragenina, por exemplo, a hiperalgesia inflamatória é mediada pela secreção de TNF- $\alpha$  e quimiocina derivada de queratinócitos (KC) (corresponde à IL-8 em humanos). O TNF- $\alpha$  e o KC estimulam a subsequente produção de IL-1 $\beta$  que, por sua vez, induz a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2), a qual participa da transformação de ácido araquidônico em prostanóides. Dentre os prostanóides produzidos está a PGE<sub>2</sub>, que promove a sensibilização dos nociceptores e a hiperalgesia (CUNHA et al., 2005; LORAM et al., 2007). Além da IL-1 $\beta$  propiciar a indução da expressão de COX-2, o próprio TNF- $\alpha$  e a PGE<sub>2</sub> podem induzi-la (BERTOLINI; OTTANI; SANDRINI, 2001). O KC também pode contribuir com a sensibilização do nociceptor por mediar a produção de aminas simpatomiméticas, como noradrenalina e dopamina, as quais atuam diretamente sobre o nociceptor aumentando a sua excitabilidade (CUNHA et al., 2005; KHASAR; MCCARTER; LEVINE, 1999; NAKAMURA; FERREIRA, 1987).

No desenvolvimento da hiperalgesia neuropática tem sido relatada a participação de outras células além dos neurônios, e a cominação entre os neurônios sensoriais primários e as células do sistema imune ocorre por vários mediadores, sendo as citocinas os mais importantes. As células de Schwann, macrófagos ativados residentes e infiltrantes, micróglia, astrócitos e mastócitos liberam prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IL-18, ademais. As citocinas pró-inflamatórias contribuem para o dano axonal

(KESWANI et al., 2003) e modulam a atividade espontânea dos nociceptores e sensibilidade a estímulos (SCHAFERS et al., 2003a; CUNHA et al., 2005; WOLF et al., 2006). Por exemplo, a ativação de receptores para TNF em neurônios sensoriais ocasiona a fosforilação/ativação de um grupo importante de proteínas adaptadoras intracelulares como as MAP (mitogen-activated protein) quinases p38 (SCHAFERS et al., 2003b) e JNK, regulando a ativação do fator de transcrição NFκB. Ao mesmo tempo, o TNFα promove um reforço da migração de macrófagos por induzir a liberação de proteases e aumentar moléculas de adesão. A comunicação entre essas células favorece o crescimento axonal e adaptação, mas também desencadeia o desenvolvimento de dor persistente (SCHOLZ et al., 2007; WOOLF et al., 2006). O aumento da síntese e liberação de citocinas como IL-1β, IL-6 e TNFα também parece modular a atividade neuronal e induzir descargas de potencial de ação espontâneas. Corroborando a participação de citocinas nesse fenômeno, a superexpressão do IL-1ra (antagonista de receptor de IL-1) ou deleção do IL-1R1 (receptor ativado pela IL-1β) inibe o disparo espontâneo de neurônios sensoriais (WOLF et al., 2006).

Em 1990 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou a dor associada ao câncer como uma emergência médica mundial, sendo que aproximadamente um terço dos pacientes com câncer apresenta dor no momento do diagnóstico da doença, e pelos menos dois terços dos pacientes com câncer sentem dor no estágio final da doença (NETO et al., 2009).

Pacientes com câncer em estágio final relatam dor intensa e crônica, o que reflete em um grave problema para a qualidade de vida desses pacientes. Essa dor é constituída principalmente por hiperalgesia, alodinia e dor espontânea sendo uma dor do tipo crônica e persistente (BRIGATTE et al., 2007).

Apesar dos mecanismos envolvidos na dor no câncer não estarem totalmente elucidados, parecem estar relacionados ao da dor inflamatória e neuropática. Podendo decorrer diretamente do tumor devido á infiltração óssea, a compressão e injúria dos nervos, infiltração do SNC, infiltração e oclusão de vasos sanguíneos linfáticos, infiltração de vísceras sólidas, ou do tratamento do câncer, devido a dor pós-cirúrgica decorrente do processo inflamatório pós-amputação ou retirada da massa tumoral, dor pós-radioterapia devido a efeitos colaterais da terapia e dor pós quimioterapia causada por polineuropatias periféricas induzida pelas drogas imunossupressoras (NETO et al., 2009).

Na busca de compreender mais a fundo os mecanismos fisiopatológicos da dor no câncer, inúmeros modelos experimentais animais, como indução de câncer neuropático (SHIMOYAMA; TANAKA; SHIMOYAMA, 2002), câncer ósseo (CLOHISY; OGILVIE; RAMNARAINÉ, 1995 ; MENENDEZ et al., 2003) ou câncer subcutâneo plantar (BRIGATTE et al., 2007) entre outros (SASAMURA et al., 2002; GUI et al., 2013) tem sido introduzido para aprimorar o estudo da dor e compreender os seus mecanismos moleculares (BRIGATTE et al., 2007 e SHIMOYAMA; TANAKA; SHIMOYAMA, 2002).

Mantyh (2010) relata os possíveis mecanismos elucidados até o momento sobre a dor no câncer ósseo, demonstrando que os receptores e canais de membrana presentes nos nociceptores direcionam a dor no câncer. Os nociceptores que inervam o osso usam diferentes tipos de receptores para detectar e transmitir estímulos nocivos que são produzidos pelas células tumorais ou pelas células imunológicas. A transmissão da dor pode ocorrer da ativação de receptor TRPV1 e canais sensíveis a íons. As células tumorais e células inflamatórias associadas também produzem mediadores como prostaglandinas, fator de crescimento de nervo, endotelinas, bradicininas e ATP. Muitos destes mediadores possuem receptores nos nociceptores induzindo sua sensibilização e/ou ativação (revisado por MANTYH, 2010). É importante ressaltar que a dor no câncer é complexa muito provavelmente porque envolve em diferentes graus componentes inflamatórios e/ou neuropáticos numa condição crônica e progressiva, sendo que a cronificação de processos nociceptivos está relacionada a plasticidade neuronal o que inclui a expressão de receptores que normalmente não são expressos em neurônios.

Em 1863, Rudolph Virchow já observou leucócitos em tecidos neoplásicos e associou pela primeira vez a inflamação e o câncer (revisado por BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Existem evidências da contribuição de leucócitos recrutados para o tecido para o desenvolvimento da dor. Por exemplo, neutrófilos recrutados para o tecido podem produzir PGE<sub>2</sub> que sensibiliza os nociceptores e seu recrutamento é dependente do TNF $\alpha$  (CUNHA et al., 2008, GUERRERO et al., 2008).

O TNF $\alpha$  é uma molécula importante tanto na dor inflamatória quanto na neuropática e exemplifica a complexidade da sua participação na dor. Por exemplo, na inflamação aguda, o TNF $\alpha$  sensibiliza indiretamente os nociceptores, pois induz a produção de PGE<sub>2</sub> a qual sensibiliza os nociceptores. Em processos

com lesão de nervo e que induzem neuropatias, ocorre aumento da expressão de receptores para TNF nos neurônios possibilitando a ativação neuronal pelo TNF $\alpha$ , que resulta da ativação de MAP quinases como a p38 que fosforila canais de sódio facilitando a despolarização neuronal e conseqüentemente, a dor (JIN; GEREAU, 2006).

Os tumores apresentam infiltrados de leucócitos, especialmente macrófagos e linfócitos. O papel do infiltrado é controverso e o conteúdo de leucócito depende da expressão de citocinas, no entanto os padrões de citocinas liberados na inflamação no câncer podem variar. Um estudo demonstrou a expressão de TGF- $\beta$  e IL-10, com a ausência de expressão de IFN- $\gamma$  pela técnica de PCR, em células de carcinoma de ovário. Outro estudo observou altos de IFN- $\gamma$  no carcinoma de ovário, demonstrando que o padrão de citocinas pode variar até no mesmo tipo de câncer (revisado por TAVARES-MURTA, 1999). A presença de citocinas padrão Th17 também foi demonstrada no câncer de cólon e mama (NUMASAKI et al., 2005), além disso foi detectado altos níveis de citocinas Th17 em pacientes com câncer gástrico (ZHANG et al., 2008).

No modelo de dor no câncer induzido por fibrossarcomas na tíbia de camundongos, Constantin e colaboradores (2008) demonstraram a presença de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 e sugeriu que o TNF- $\alpha$  teria um papel importante na hiperalgesia térmica *in vivo*. A presença dessas citocinas foi observada somente em homogenatos e não no cultivo dos fibrossarcomas *in vitro* (CONSTANTIN, et al., 2008). Wacnik e colaboradores (2005) também demonstraram a presença do TNF- $\alpha$  no mesmo modelo e relatou que a hiperalgesia mecânica na dor no câncer esta diretamente relacionada com a presença do TNF, pois o tratamento com etanercept (antagonista de receptor TNF- $\alpha$ ) foi eficaz em reverter a hiperalgesia (WACNIK et al., 2005).

De fato, já é sabido que injeções intraplantar de TNF- $\alpha$  induz hiperalgesia mecânica e térmica, e sensibilizam os nociceptores de fibra C (CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005).

Contudo, a participação de citocinas pró-inflamatórias no líquido, plasma ou no local da lesão tecidual, tem sido apontada como responsável para o desenvolvimento da dor crônica em pacientes (KRAYCHETE et al., 2009). Em estudos animais, também tem-se demonstrado papel importante das citocinas para o desenvolvimento da dor inflamatória (VERRI et al., 2007; VERRI et al., 2008) e a

redução da produção de citocinas TNF- $\alpha$  ou IL1 $\beta$  reduziu a dor induzida por carragenina em ratos e em camundongos (ZARPELON et al., 2013; NAVARRO et al., 2013), reduziu a dor no câncer induzida por tumor de Walker 256 na tíbia de ratos (HU et al. 2012) e reduziu a dor neuropática induzida pela ligadura de nervo spinal (TANG, 2002).

No entanto, o controle para a dor no câncer ainda não está bem definido. Os diferentes tipos de câncer, as várias localidades do desenvolvimento da massa tumoral e falta de entendimento dos mecanismos que desenvolvem e mantêm a dor no câncer, leva ao desenvolvimento de diferentes tipos de dor e localidades da dor, isto dificulta a produção de medicamentos efetivos. Por isto, elucidar e compreender os mecanismos envolvidos na dor em diferentes tipos de câncer é essencial para controle terapêutico adequado da dor nos pacientes e busca de novas e melhores terapias (REGAN;PENG, 2000).

Um sintoma ainda mais debilitante para os pacientes com o câncer é a manifestação da dor-fantasma, que ocorre geralmente após a amputação de um membro e pode ocorrer imediatamente à amputação ou anos após e tem como característica a imagem do órgão amputado com dor em queimação, sensação de formigamento e latejamento. Se o paciente vivenciou a dor intensa previamente a amputação do membro este fenômeno tem maior chance de aparecimento devido sensibilização dos neurônios centrais (NETO et al., 2009).

Harris e colaboradores em 1983 publicou um estudo realizado com mulheres portadores do câncer de mama e observou que apenas 5% das pacientes apresentavam dor anteriormente à operação de amputação da mama, concluindo que o sintoma como dor foi raro nas pacientes. Porém, quando ele questionou a dor na mama quando apalpada, 33% das mulheres admitiram que os nódulos na mama eram dolorosos, ou seja, apresentavam hiperalgesia. No estudo de Kroner e colaboradores em 1988 foi demonstrada a correlação entre a dor anteriormente a mastectomia e o aparecimento da dor do membro fantasma. Desta maneira, é importante que os mecanismos que desenvolvem a dor no câncer sejam bem esclarecidos para uma intervenção adequada deste tipo de dor. Assim, quando necessário o procedimento de amputação devido ao câncer, este deve ser acompanhado de condutas terapêuticas que evitem o desenvolvimento da dor do membro fantasma (NETO et al., 2009).

### 1.3 TRATAMENTOS PARA DOR NO CÂNCER

A dor no câncer é tratável, (IASP, 2013), no entanto algumas barreiras impedem o tratamento adequado para esta dor, como por exemplo, o desconhecimento dos mecanismos da síndrome, desconhecimento sobre a terapêutica e o medo dos pacientes com câncer (NETO et al., 2009; INCA, 2013).

Em 1986 a OMS publicou uma primeira edição do livro “Alívio da dor no câncer” que determinou a base para o tratamento deste tipo de dor (NETO et al., 2009). Foi apresentada uma escala de analgésicos para o tratamento dos pacientes com câncer. O primeiro degrau da escada analgésica preconiza a utilização de medicamentos não-opioides associados com coadjuvantes para dores fracas. O segundo passo recomenda a utilização de opioides fracos associados a não opioides e aos coadjuvantes para dores de moderada intensidade. O terceiro degrau sugere a utilização de opioides fortes associados ou não a medicamentos não opioides e coadjuvantes para dores fortes (OLIVEIRA et al., 2003, NETO et al., 2009). Entretanto, a utilização dos opioides pode agravar ainda mais a qualidade de vida dos pacientes devido a seus efeitos colaterais como dose-dependência e algumas vezes analgesia inadequada devido ao efeito de tolerância (RANG; DALE, 2007).

Por esta razão, compreender os mecanismos relacionados à geração e manutenção da dor no câncer é necessário para o desenvolvimento de terapias mais eficazes (POTENZIERI; ROSE; SIMONE, 2008; REGAN; PENG, 2000).

Potenzieri e colaboradores (2008) demonstraram a eficácia de antagonistas de receptores para canabíoides como uma terapia efetiva para promover analgesia adequada em pacientes com câncer crônico e dor intensa. Sukhtankar e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição da MAPK p38 diminui a manifestação de dor em modelo de câncer ósseo induzida no fêmur de camundongos pela injeção de células de adenocarcinoma mamário. Gao e colaboradores (2009) demonstraram que a inibição da MAPK JNK atenua a hipersensibilidade a dor desenvolvida no modelo de dor no câncer plantar induzido por melanoma de camundongos. Quang e colaboradores (2010) demonstraram que a bloqueio de receptor de endotelina – A atenua a dor induzida por carcinoma em camundongos.

Entretanto, as diferentes células tumorais, localidades do tumor e modelos experimentais se apresentam de maneira diferente perante os tratamentos utilizados.

### 1.3.1 Opióide

O uso de opióides tem sido extremamente importante para o alívio da dor (LEE et al., 2011). O termo opióide se aplica a todos os agonistas e antagonistas com atividade morfino-símile naturais e sintéticos (GOODMAN, 2003).

Existem os opióides exógenos e endógenos: os opiáceos são drogas derivadas do ópio, um extrato do suco de papoula *Papaver somniferum*, e incluem a morfina, codeína e uma ampla variedade de semi-sintéticos derivados deles, podendo ser considerado como opióides exógenos. Já as endorfinas se referem à família de três peptídeos opióides endógenos que se encontram amplamente distribuídos no organismo e que tem função reguladora no sistema fisiológico semelhante aos opióides:  $\beta$ -endorfina, encefalinas, e dinorfina (LEE et al., 2011; RANG; DALE 2007, GOODMAN, 2003).

Sabe-se que os principais efeitos analgésicos induzidos por opiáceos ocorrem através da sua ação nos receptores opióides localizados no SNC. Existem três tipos de receptores opióides denominados  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$  que medeiam os principais efeitos farmacológicos dos opióides. Estes receptores estão amplamente distribuídos pelo cérebro (LEE et al., 2011).

Os três tipos de receptores ao serem ativados inibem a adenilato ciclase reduzindo o conteúdo intracelular de AMPc, além de exercer efeito sobre os canais iônicos como abertura nos canais de Potássio e inibição da abertura dos canais de Cálcio, isso reduz a excitabilidade neuronal e liberação de transmissores (FILIZOLA; DEVI, 2012; MENENDÉZ et al., 2007; ZOLLNER; STEIN, 2007).

A maioria dos opióides usados na clínica são seletivos para receptores  $\mu$ . A morfina produz analgesia principalmente pela interação com esses receptores. Elas atuam principalmente na medula (GOODMAN, 2003).

O mecanismo central dos opióides estão relacionados à diminuição da neurotransmissão nociceptiva devido ao acoplamento de seus receptores à proteína  $G_i$ , e periféricamente a morfina ativa a  $PI_3K/AKT/NO/GMPc/PKG$ /canais de

K<sup>+</sup> ATP sensíveis que também reduz a condução da informação nociceptiva pelos nociceptores (CUNHA et al., 2010).

A morfina é o opióide mais utilizado e foi descoberto no século XIX por suas propriedades de aliviar a dor aguda e crônica. Os opióides possuem propriedades hipnoanalagésicas potente e muitas vezes produzem dependência psíquica e física quando utilizados cronicamente, sendo utilizados principalmente no controle da dor aguda de intensidade grave e da dor crônica de natureza neoplásica. O efeito dos opióides pode ser bloqueado por drogas semelhantes à morfina (ex) que também possuem afinidade pelos receptores opióides, porém não são capazes de desencadear seus efeitos (KATZUNG, 2006).

### 1.3.2 Antiinflamatório não Esteroidal – AINE

As drogas não esteroidais, como a indometacina são amplamente usadas por seus efeitos em reduzir a dor e inibir a produção de PGE<sub>2</sub> (Vane, 1971).

A síntese dos eicosanóides pode ser desencadeada por estímulos que ativam receptores de membrana, acoplados a proteína G, que resultam na ativação da fosfolipase A2. A fosfolipase hidrolisa fosfolipídios de membrana liberando o ácido araquidônico que, quando liberado, serve como substrato para duas vias enzimáticas: a via das cicloxigenases, que desencadeia a biossíntese das prostaglandinas e dos tromboxanos; e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos e lipoxinas. A COX-1 é expressa constitutivamente em condições fisiológicas. A COX-2 pode ser induzida na presença de citocinas, ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004).

Durante as pesquisas de medicamentos com propriedades antiinflamatórias a Indometacina foi o primeiro encontrado, e seus efeitos são evidenciados em pacientes com artrite reumatóide e gota aguda. No entanto sua inibição ocorre tanto na COX-1 quanto COX-2, o que demonstra a gravidade dos efeitos colaterais e pode limitar a atividade terapêutica. Sua ação parece ser central, periférica e também na inibição da motilidade dos leucócitos polimorfonucleares (GOODMAN, 2003).

Clinicamente esta classe de droga também é utilizada para promover analgesia no combate á dor no câncer (NETO et al., 2009).

### 1.3.3 Antidepressivo Tricíclico

São considerados analgésicos adjuvantes e não tem a dor como indicação primária, porém possuem efeitos analgésicos em algumas situações. Os antidepressivos apresentam estas propriedades, e podem ser divididos em: tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção de serotonina e inibidores da monoaminoxidase. Na dor oncológica os mais indicados são os antidepressivos tricíclicos, e parecem atuar pelo mecanismo de inibição e receptação da noradrenalina e serotonina, e antagonismo de neurotransmissores (receptores NMDA, H-1, 5-HT2) (NETO et al., 2009).

Todos os antidepressivos tricíclicos possuem um núcleo molecular com três anéis que atuam inibindo a captação neuronal de noradrenalina, e conseqüentemente produzem respostas terapêuticas na maioria dos pacientes com depressão. Os agentes que inibem a recaptção da serotonina induzem alterações dos neurônios da rafe (GOODMAN, 2003).

Farmacologicamente, a atividade da amitriptilina pode potencializar ou prolongar a atividade neural simpática, uma vez que a recaptção dessas aminas é fisiologicamente importante para suprir suas ações transmissoras (RANG; DALE, 2007).

## 1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA DOR NO CÂNCER

Vários modelos experimentais tem se mostrado eficazes para o estudo da dor no câncer, estes modelos consistem em mimetizar sinais e sintomas apresentados em pacientes com câncer. Os modelos podem variar na espécie animal, nos tipos de tumores, localização da massa tumoral e susceptibilidade farmacológica (BRIGATTE et al., 2007). Sasamura e colaboradores (2002) desenvolveram um modelo de dor no câncer pela inoculação de células de melanoma ortotópico na pata de camundongos e caracterizaram que os tratamentos com morfina e indometacina foram eficazes para combater a hiperalgesia térmica na fase inicial da dor, enquanto que somente a morfina foi capaz de reverter a dor na

fase inicial e tardia. No modelo de Brigatte e colaboradores (2007) foi demonstrado que a hiperalgesia mecânica induzida pela inoculação de células de carcinoma Walker-256 na pata de ratos poderia ser revertida 2 dias após a inoculação pelo tratamento com indomecina, porém apenas a morfina foi capaz de rever o quadro de dor 5 dias após a inoculação do tumor. Já no modelo de Saito e colaboradores (2005) pela inoculação de células de sarcoma osteolítico no fêmur em camundongos, demonstraram que o tratamento com indometacina foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica tanto quanto a morfina 14 dias após a inoculação do tumor. Em modelo por inoculação de células de fibrosarcomas injetadas na cavidade do fêmur de camundongos, várias classes de agonistas de receptor opióide reduziram a hiperalgesia mecânica no 15º dia pelo tratamento com opióides, e não tendo efeito na dor drogas antiinflamatória não esteroideais como indometacina, nem antidepressivos ou anticonvulsivantes (MOUEEDEN et al., 2007).

Ainda no modelo de Lee e colaboradores (2005), foi demonstrado que a inoculação de hepatocarcinoma na pata de camundongos, desenvolve hiperalgesia mecânica, mais não hiperalgesia térmica, reforçando que o desenvolvimento da dor é diferente dependendo do tipo de células tumorais estudada.

Dessa forma, existe uma grande variabilidade de susceptibilidade farmacológica dependendo do modelo experimental, embora a eficácia dos opióides seja uma constante. Um explicação para a variabilidade é que realmente são modelos totalmente diferentes quanto ao sítio de administração das células tumorais, inoculo e tipos de tumores diferentes. Isso mimetiza o que ocorre com humanos, pois são tumores que se desenvolvem em locais diferentes, com taxas de proliferação diferentes e de origem diferentes. Dessa forma, o tratamento da dor nesses pacientes é difícil. Os modelos pré-clínicos devem contemplar essas diferenças e deve haver a compreensão de que cada modelo representa condições específicas e seus resultados não devem ser extrapolados para todos os tipos de câncer, mas sim, para os casos ou caso específico que aquele modelo representa.

## 1.5 TUMOR DE EHRLICH

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, correspondente a um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1905. Originalmente se apresentou na forma sólida, sendo convertido para forma ascítica por Loewenthal and Jahn (1932) (EHRLICH AND APOLAND, 1905). Seu crescimento pode ser sólido ou ascítico variando dependendo do local inoculado, tecidos ou cavidades, respectivamente.

À histologia, o tumor de Ehrlich na forma sólida é descrito com células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas (DAGLI et al., 1989).

O tumor tem sido utilizado e descrito em vários modelos experimentais animais que avaliam o tratamento de animais com extratos de plantas ou princípios ativos que inibam o crescimento tumoral ascítico (KAMETANI et al, 2007; BALAMURUGAN et al, 2009), e também na forma sólida para avaliação de angiogênese tumoral (USTUN et al., 2010). Todavia, não foi descrito até o momento a utilização do tumor de Ehrlich como modelo para o estudo da dor no câncer.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o tumor de Ehrlich induz comportamento nociceptivo em camundongos podendo servir como um novo modelo para o estudo da fisiopatologia da dor, e delineamento do perfil farmacológico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a dose adequada de células tumorais de Ehrlich para induzir hiperalgesia mecânica e térmica e dor espontânea em camundongos;
- Avaliar as características histológicas como perda de arquitetura tecidual, achados necróticos e inflamatório na pata dos camundongos;
- Avaliar se as células tumorais inativadas revertem o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, térmica, dor espontânea e crescimento tumoral;
- Avaliar se a hiperalgesia e dor espontânea induzida pelas células tumorais é revertida pelo tratamento com a indometacina;
- Avaliar se a hiperalgesia e dor espontânea induzida pelas células tumorais é revertida pelo tratamento com a amitriptilina;
- Avaliar se a hiperalgesia e dor espontânea induzida pelas células tumorais é revertida pelo tratamento com a morfina;
- Avaliar se os tratamentos com analgésicos são capazes de reverter o crescimento tumoral.

### **3 ARTIGO PUBLICADO**

O artigo “The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening” foi publicado no periódico BioMed Research International.

## Research Article

# The Ehrlich Tumor Induces Pain-Like Behavior in Mice: A Novel Model of Cancer Pain for Pathophysiological Studies and Pharmacological Screening

Cassia Calixto-Campos,<sup>1</sup> Ana C. Zarpelon,<sup>1</sup> Mab Corrêa,<sup>1</sup> Renato D. R. Cardoso,<sup>1</sup> Felipe A. Pinho-Ribeiro,<sup>1</sup> Rubens Cecchini,<sup>1</sup> Estefania G. Moreira,<sup>2</sup> Jefferson Crespigio,<sup>1</sup> Catia C. F. Bernardy,<sup>3</sup> Rubia Casagrande,<sup>4</sup> and Waldiceu A. Verri Jr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid KM480 PR445, 86051-990 Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid KM480 PR445, 86051-990 Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Avenida Robert Koch 60, 86038-350 Londrina, PR, Brazil

<sup>4</sup> Departamento Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Avenida Robert Koch 60, 86038-350 Londrina, PR, Brazil

Correspondence should be addressed to Waldiceu A. Verri Jr.; [waldiceujr@yahoo.com.br](mailto:waldiceujr@yahoo.com.br)

Received 29 April 2013; Accepted 10 July 2013

Academic Editor: Monica Fedele

Copyright © 2013 Cassia Calixto-Campos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The Ehrlich tumor is a mammary adenocarcinoma of mice that can be developed in solid and ascitic forms depending on its administration in tissues or cavities, respectively. The present study investigates whether the subcutaneous plantar administration of the Ehrlich tumor cells induces pain-like behavior and initial pharmacological susceptibility characteristics. The Ehrlich tumor cells ( $1 \times 10^4$ – $10^7$  cells) induced dose-dependent mechanical hyperalgesia (electronic version of the von Frey filaments), paw edema/tumor growth (caliper), and flinches compared with the saline group between days 2 and 12. There was no difference between doses of cells regarding thermal hyperalgesia in the hot-plate test. Indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) and amitriptyline hydrochloride (a tricyclic antidepressant) treatments did not affect flinches or thermal and mechanical hyperalgesia. On the other hand, morphine (an opioid) inhibited the flinch behavior and the thermal and mechanical hyperalgesia. These effects of morphine on pain-like behavior were prevented by naloxone (an opioid receptor antagonist) treatment. None of the treatments affected paw edema/tumor growth. The results showed that, in addition to tumor growth, administration of the Ehrlich tumor cells may represent a novel model for the study of cancer pain, specially the pain that is susceptible to treatment with opioids, but not to cyclooxygenase inhibitor or to tricyclic antidepressant.

## 1. Introduction

Pain is a symptom related to poor quality of life in cancer patients. In fact, in the United States, it is the most frequent cause of disability in these patients [1, 2]. Furthermore, reports of cancer pain have been increasing over the years accompanying the increased survival of patients [3, 4]. Most patients with advanced cancer (60%–85%) and 5-year survivors (40%) report pain [5–8]. In patients with advanced

cancer, 62%–85% experience significant pain that is described as moderate to severe in approximately 4%–50% and as very severe in 25%–30% [9]. In fact, approximately 43% of the patients report feeling pain as early as diagnosis [7]. Therefore, pain management in cancer patients is a public health issue, and the mechanisms of cancer pain are not completely understood [7].

In this sense, there are various animal models of cancer pain that are used in an attempt to clarify the nociceptive

pathways involved in cancer-related pain, including skin cancer pain [10], neuropathic cancer pain [11], and bone cancer pain [12, 13]. These models have been important, for instance, in the demonstration of the contribution of transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1), acid-sensing ion channels (ASICs), nerve growth factor (NGF), bradykinin, adenosine triphosphate (ATP), endothelin, and other mediators in the nociceptor sensitization during cancer pain [14]. There is also evidence that the inflammatory response against the tumor cells results in the production of cytokines and chemokines that sensitize the nociceptors by receptor-mediated activation of protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA) and/or activation of mytogen-activated protein kinases such as p38. The activation of these intracellular pathways results in activation of TRPV1 and tetrodotoxin-resistant sodium channels and increased expression of TRPV1 [15]. Therefore, there are complex mechanisms, which may also vary depending on the cancer type.

The Ehrlich tumor is a spontaneous murine mammary adenocarcinoma [16] adapted to ascites form [17] and carried in mice by serial intraperitoneal (i.p.) passages [18]. The ascitic form of the tumor has been used as experimental model to assess the influence of drugs of different origins on its proliferation and host responses against the tumor cells [19–21]. The characteristic ascites is probably formed as a consequence of the inflammatory response towards tumor cells resulting in increased peritoneal vascular permeability [22]. Other factors that contribute to ascites and lethality of the Ehrlich tumor includes the impaired peritoneal lymphatic drainage by the tumor cells [22], the mechanic pressure exerted by progressive increase of ascitic fluid, peritoneal hemorrhage, and endotoxemia [23–25]. The Ehrlich tumor cells are also used as a model of solid tumor by injection in different sites [26].

Despite the wide use of the Ehrlich tumor cells in the investigation of the mechanisms of tumor proliferation as well as the host inflammatory and oxidative responses against tumor cells, it is yet undetermined whether inoculation of the Ehrlich tumor cells could represent a murine model to study cancer pain. Therefore, the present study standardized a murine model of cancer pain induced by the intraplantar injection of the Ehrlich tumor cells and investigated the pharmacological susceptibility of the model using three classes of analgesics.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Animals.** The experiments were performed on male Swiss mice (20–25 g, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil) housed in standard clear plastic cages (six per cage) with free access to food and water. The behavioral testing was performed between 9:00 am and 5:00 pm in a temperature-controlled room. Animals' care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and with the approval of the Ethics Committee of Universidade Estadual de Londrina. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

**2.2. The Ehrlich Tumor Cells Inoculation.** The Ehrlich tumor cells were collected from ascitic fluid of the peritoneal cavity of mice 10 days after tumor administration. The ascitic fluid was washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), centrifuged (200 g, 10 min), and washed with PBS three times. The cell viability was determined by the 0.5% trypan blue exclusion method in the Neubauer chamber [27]. The Ehrlich tumor cells were suspended to the final concentrations of  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , and  $1 \times 10^7$  in 25  $\mu$ L of saline. Measurements were performed before and after injection of tumor cells between days 0 and 12.

**2.3. Drugs.** Drugs were obtained from the following sources: indomethacin from Prodome Chemical and Pharmaceutical (Sao Paulo, SP, Brazil), amitriptyline from Germed (Sao Bernardo do Campo, SP, Brazil), morphine sulphate from Cristalia (São Paulo, SP, Brazil), and naloxone hydrochloride from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

**2.4. Protocols.** Firstly, mice received intraplantar (i.pl.) injection of the Ehrlich tumor cells ( $1 \times 10^4$ – $10^7$  in 25  $\mu$ L) or saline. Measurements of mechanical and thermal hyperalgesia, paw edema/tumor growth, and overt pain-like behavior were performed on days 0–12. According to the results, the dose of  $1 \times 10^6$ /paw of tumor cells was chosen for next experiments of mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia, paw edema/tumor growth, and histological analysis at indicated timepoints. The dose of  $1 \times 10^7$ /paw of tumor cells and evaluation at the 8th day after inoculation were chosen for experiments of overt pain. Paw samples were collected for histological analysis and microscopic observation 12 days after tumor injection. To evaluate the hyperalgesic effect of cellular remnants, the Ehrlich tumor cells were inactivated and injected i.pl., and compared with the saline and the viable Ehrlich tumor cells groups; measurements were performed on days 0–12. To evaluate the pharmacological modulation of the Ehrlich tumor-induced pain-like behavior, mice were treated with the cyclooxygenase inhibitor (indomethacin, 0.7, 2, and 6 mg/kg, i.p.) or opioid (morphine, 1, 3, and 10 mg/kg, i.p.) on the 8th day after the Ehrlich tumor cells administration, and the evaluation of mechanical and thermal hyperalgesia, paw edema/tumor growth, and overt pain was performed 3 h or 45 min after the treatment, respectively. Another group of mice was treated with tricyclic antidepressant (amitriptyline, 3, 10, and 30 mg/kg, p.o.) daily during 12 days. The evaluation of mechanical and thermal hyperalgesia, paw edema/tumor growth, and overt pain was performed 3 h after treatment on days 0–12. It is noteworthy that different experimenters prepared the solutions, made the administrations, and performed the evaluation of pain-like behavior.

**2.5. The Electronic Pressure Meter Test of Mechanical Hyperalgesia.** Mechanical hyperalgesia was tested in mice as previously reported [28]. Briefly, the test consists of evoking a hindpaw flexion reflex with a hand-held force transducer (the electronic von Frey anesthesiometer: Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) adapted with a 0.5 mm<sup>2</sup> contact area polypropylene tip. The investigator was trained to apply the tip perpendicularly to the central area of the hindpaw, and the endpoint

was characterized by the removal of the paw. The results are expressed by delta ( $\Delta$ ) withdrawal threshold (in g), which was calculated by subtracting the zero-time mean measurements from the mean measurements (indicated timepoints) after stimulus.

**2.6. The Hot-Plate Test of Thermal Hyperalgesia.** Thermal hyperalgesia was evaluated before and at indicated timepoints after injection of the Ehrlich tumor cells. In brief, mice were placed in a 10 cm wide glass cylinder on a hot plate (Hot Plate HP-2002, Insight Equipamentos, Ribeirao Preto, SP, Brazil) maintained at 55°C. The reaction time was scored when the animal jumped, flinched, and/or licked its paws. A maximum latency (cutoff) was set at 30 s to avoid tissue damage [29].

**2.7. Evaluation of Paw Edema/Tumor Growth.** The paw edema/tumor growth was determined before and at indicated timepoints (at 48 h intervals) after the injection of the Ehrlich tumor cells using an analog caliper. Paw edema/tumor growth was presented as  $\Delta$  mm [29].

**2.8. Overt Pain-Like Behavior Evaluation.** Mice were placed in clear glass compartments at room temperature. After an acclimation period of 15 min, mice were observed for 10 min, and the cumulative number of flinches was measured [27].

**2.9. Histopathological Analysis.** On the 12th day after injection of tumor cells, mice were killed, and the paws were removed and fixed in the Bowen solution (75% picric acid, 25% formaldehyde, and 5% acetic acid) for 21 days. The samples were embedded in paraffin, sectioned into 5  $\mu$ m sections, and stained with hematoxylin and eosin for light microscopic observation.

**2.10. Inactivation of the Ehrlich Tumor Cells by Thermal Alteration.** The Ehrlich tumor cells were inactivated to evaluate the involvement of cellular remnants in pain induced by the Ehrlich tumor cells. For this, the cells were inactivated by the process of freezing and heating. The Ehrlich tumor cells were first suspended to the final concentration of  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$ ; next cell suspension was submerged in liquid nitrogen for 5 min and then heated in water-bath (80°C) during 5 min (EvLab, Londrina, PR, Brazil). This process was repeated 5 times, followed by assessment of cell viability by the trypan blue test, in order to confirm that cells were not viable. Mice received the equivalent to  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  inactivated tumor cells, viable cells, or saline (25  $\mu$ L) i.pl. The evaluation of mechanical and thermal hyperalgesia and paw edema/tumor growth was performed between days 0 and 12 and, the evaluation of the overt pain was performed in 8th day.

**2.11. Statistical Analysis.** Results are presented as mean  $\pm$  SEM of measurements made on 6 animals in each group in each experiment and are representative of two independent experiments. The two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all times (curves) when the hyperalgesic responses were measured at different times after the stimulus injection. The analyzed factors were treatment, time, and time *versus* treatment interaction. When

there was a significant time *versus* treatment interaction, one-way ANOVA followed by Tukey's *t*-test was performed for each time. On the other hand, when the hyperalgesic responses were measured once after the stimulus injection, the differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's *t*-test. Additionally, comparative statistical analysis between two groups was done using the *t*-test. Statistical differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

**3.1. The Subcutaneous Injection of the Ehrlich Cells Induces Mechanical and Thermal Hyperalgesia, Paw Edema/Tumor Growth, and Overt Pain-Like Behavior in a Dose-Dependent Manner.** The Ehrlich tumor cells ( $1 \times 10^4$ – $10^7$  in 25  $\mu$ L per paw), or the vehicle group (PBS), were subcutaneously injected in the mouse hindpaw (i.pl.), and mechanical hyperalgesia was evaluated 2, 4, 6, 8, 10, and 12 days after cell injection, Figure 1(a). The mechanical hyperalgesia induced by tumor cells was dose and time dependent. All doses of tumor cells tested induced significant mechanical hyperalgesia on day 8, which remained on days 10 and 12. There was no statistical difference between the doses of  $10^6$  and  $10^7$  tumor cells regarding mechanical hyperalgesia, Figure 1(a). There was no difference between the doses in the hot-plate test (data not shown); therefore, for clear presentation, only the results on thermal hyperalgesia and the dose of  $10^6$  are shown in Figure 1(b). The injection of tumor cells induced a progressive and dose-dependent increase in paw edema/tumor growth, Figure 1(c), which corroborates the progressive increase of mechanical hyperalgesia in Figure 1(a). The dose of  $10^4$  did not induce significant paw edema/tumor growth, while  $10^5$  induced at days 10 and 12, Figure 1(c). The paw edema/tumor growth was significant between 2 and 12 days for the doses of  $10^6$  and  $10^7$  (Figure 1(c)). Spontaneous nociceptive behavior was quantified by the number of flinches, Figure 1(d). The doses of  $10^4$  and  $10^5$  did not induce paw flinch, the dose of  $10^6$  induced paw flinch at days 10–12, and  $10^7$  induced a significant number of flinches at days 4–12 with a peak at day 8 (Figure 1(d)). Considering these results, the dose of the  $10^6$  Ehrlich tumor cells was chosen for histological analysis and behavioral experiments evaluating mechanical and thermal hyperalgesia and paw edema/tumor growth, while the dose of  $10^7$  was chosen for overt pain-like behavior evaluation.

**3.2. Histopathological Analysis.** Mice were sacrificed at day 12 after injection of the Ehrlich tumor cells or saline (25  $\mu$ L), and the paws were collected for histological analysis performed with hematoxylin/eosin staining (Figure 2). There was no histological abnormality in mice that received i.pl. injection of saline (Figure 2(a)), presenting normal epithelium (arrow 1) and normal bone cartilage (arrow 2). Mice that received i.pl. injection of the Ehrlich tumor cells ( $10^4$ – $10^7$ ) showed malignant neoplasm and poor differentiation, characterized by the presence of tumor cells, with nucleus showing frequent aberrant mitosis. Considering that there was no difference between the different doses of tumor cells

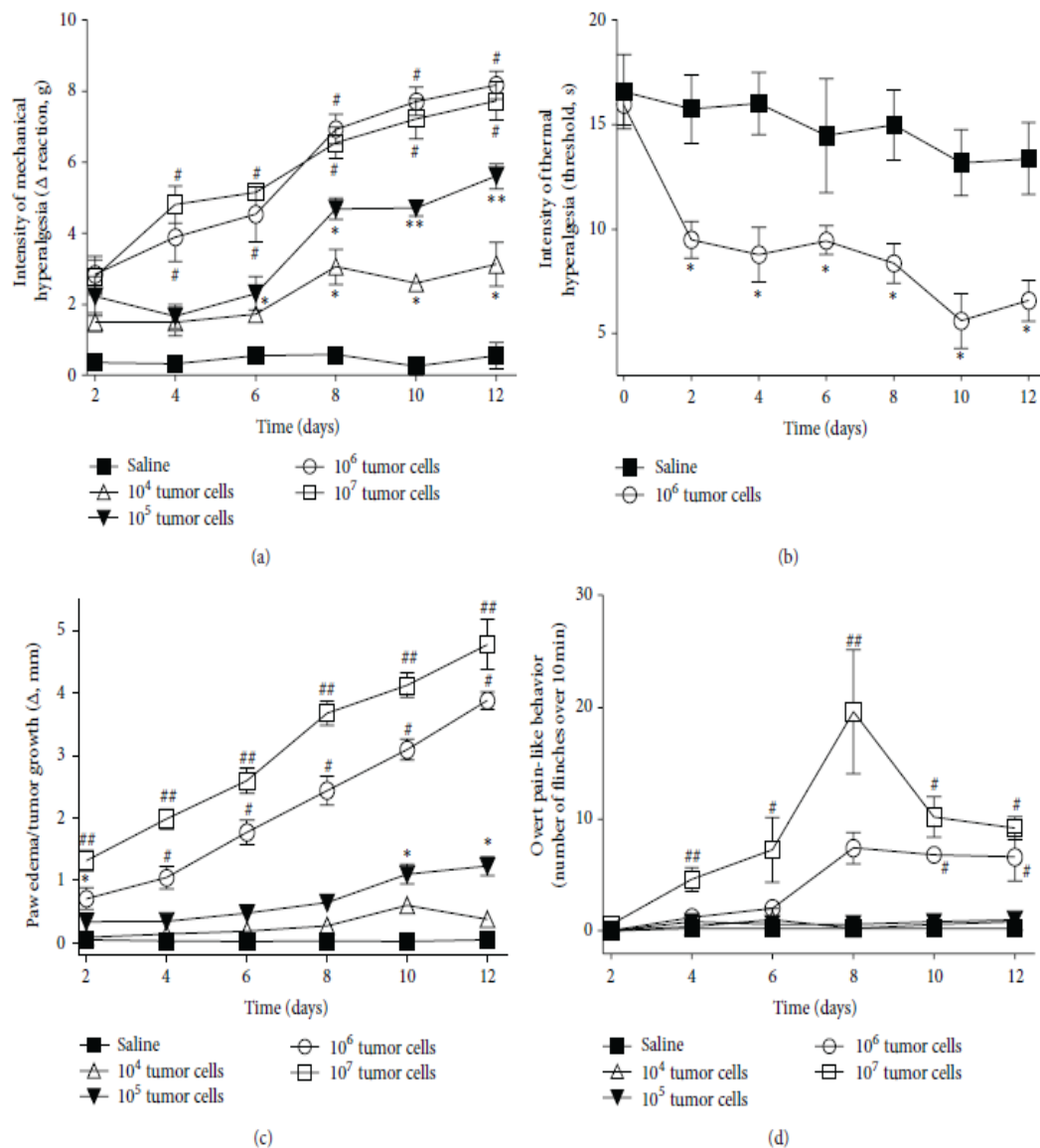


FIGURE 1: The Ehrlich tumor induces pain and paw edema/tumor growth in a dose-dependent manner. The Ehrlich tumor cells ( $1 \times 10^4$ - $7$ ) or saline ( $25 \mu\text{L}$ ) was injected subcutaneously in the paw. (a) The intensity of mechanical hyperalgesia, (b) thermal hyperalgesia, (c) paw edema/tumor growth, and (d) overt pain-like behavior was evaluated between 0 and 12 days at every-other-day intervals after injection of tumor cells or saline;  $n = 6$ , representative of two experiments. \* $P < 0.05$  compared with saline; \*\* $P < 0.05$  compared with saline and the dose of  $10^4$ ; # $P < 0.05$  compared with saline and the doses of  $10^4$  and  $10^5$ ; ## $P < 0.05$  compared with saline and the doses of  $1 \times 10^4$ - $6$ .

regarding the tumor characteristics, the figures represent the dose of the  $10^6$  Ehrlich tumor cells that was used in most of the evaluations (Figures 2(b)-2(h)). Figure 2(b) shows bone cartilage destruction induced by tumor cells (arrow 4). Figure 2(c) shows at 4x magnification the epithelium (arrow 1) and the presence of tumor cells (arrow 3) with intense areas of necrosis (arrow 5). Figure 2(d) shows areas of necrosis (arrow 5) induced by the Ehrlich tumor cells. Figure 2(e) shows at 10x magnification the presence of tumor cells (arrow 3) in a paw tissue, and Figure 2(f) shows tumor cells (arrow 3), areas of necrosis (arrow 5), and a presence of mitosis (arrow 6). Figure 2(g) shows the presence of atypical mitosis (arrow

6), and Figure 2(h) shows at 40x magnification mitosis (arrow 6) and tumor cells with atypical nucleus (arrow 7). Therefore, the histopathological analysis confirmed the presence of the tumor cells (Figures 2(b) and 2(h)), together with an extensive area of necrosis (Figures 2(c), 2(d), and 2(f)) characterized by neutrophilic infiltration, associated with the presence of fibrin and red blood cells, which gives an eosinophilic coloration (Figure 2(d)), tumor cells with aberrant mitosis (Figure 2(g)), and bone/cartilage destruction (Figure 2(b)).

3.3. Inactivation of the Ehrlich Tumor Cells by Thermal Alteration Abolishes the Nociceptive Responses. Mice received i.p.l.

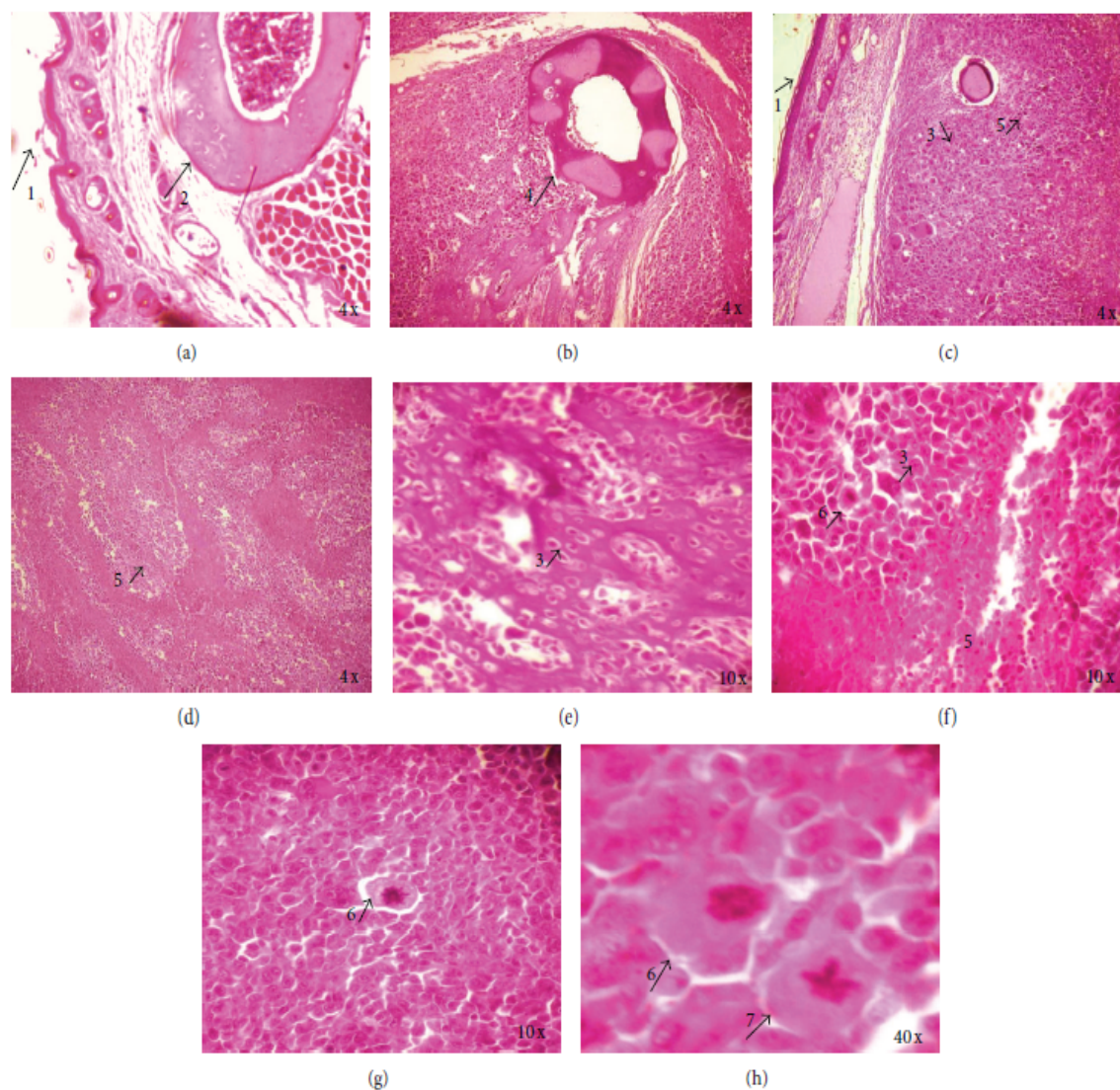


FIGURE 2: Histopathological analysis of paw injected with the Ehrlich tumor. The Ehrlich tumor cells ( $1 \times 10^6$ ) or saline ( $25 \mu\text{L}$ ) was injected subcutaneously into the hindpaws of the mice. Panel (a) indicates histological sections of normal paw that received saline, and panels (b)–(h) indicate the paw that received the Ehrlich tumor cells stained by hematoxylin/eosin. Arrows (1) indicate normal epithelium; (2) normal bone cartilage; (3) tumor cells; (4) destroyed bone cartilage; (5) extensive area of necrosis; (6) tumor cells with mitosis or atypical mitosis; (7) and tumor cells with atypical nucleus.

injection of saline ( $25 \mu\text{L}$ ), the viable Ehrlich tumor cells ( $10^6$  or  $10^7$ /paw), or the inactivated Ehrlich tumor cells (equivalent to  $10^6$  or  $10^7$  cells). Mechanical and thermal hyperalgesia and paw edema/tumor growth were evaluated between 0 and 12 days, and overt pain-like behavior was evaluated on day 8 after stimulus. The inactivation of the  $10^6$  Ehrlich tumor cells was able to abolish the mechanical (Figure 3(a)) and thermal (Figure 3(b)) hyperalgesia and paw edema/tumor growth (Figure 3(c)) compared with the viable cells. Inactivation of the  $10^7$  tumor cells also resulted in abolishment of overt pain-like behavior (Figure 3(d)) compared with the viable cells. Thus, the cellular remnants of the Ehrlich tumor cells were not capable of inducing paw edema/tumor growth and nociceptive responses, which suggests that these responses

depend on the proliferation of tumor cells and their activities and interactions with the host immune responses.

**3.4. Effect of Indomethacin Treatment on the Nociceptive Responses and Paw Edema/Tumor Growth Induced by the Ehrlich Tumor Cells.** Mice received the  $10^6$  or  $10^7$  Ehrlich tumor cells, and on the 8th day, they were treated with indomethacin (0.7, 2, or 6 mg/Kg i.p.) or Tris buffer, and 3 h after the treatment mechanical, and thermal hyperalgesia, paw edema/tumor growth, and overt pain-like behavior were measured (Figure 4). The Ehrlich tumor cells induced significant mechanical (Figure 4(a)) and thermal (Figure 4(b)) hyperalgesia, paw edema/tumor growth (Figure 4(c)), and overt pain-like behavior (Figure 4(d)) compared with the

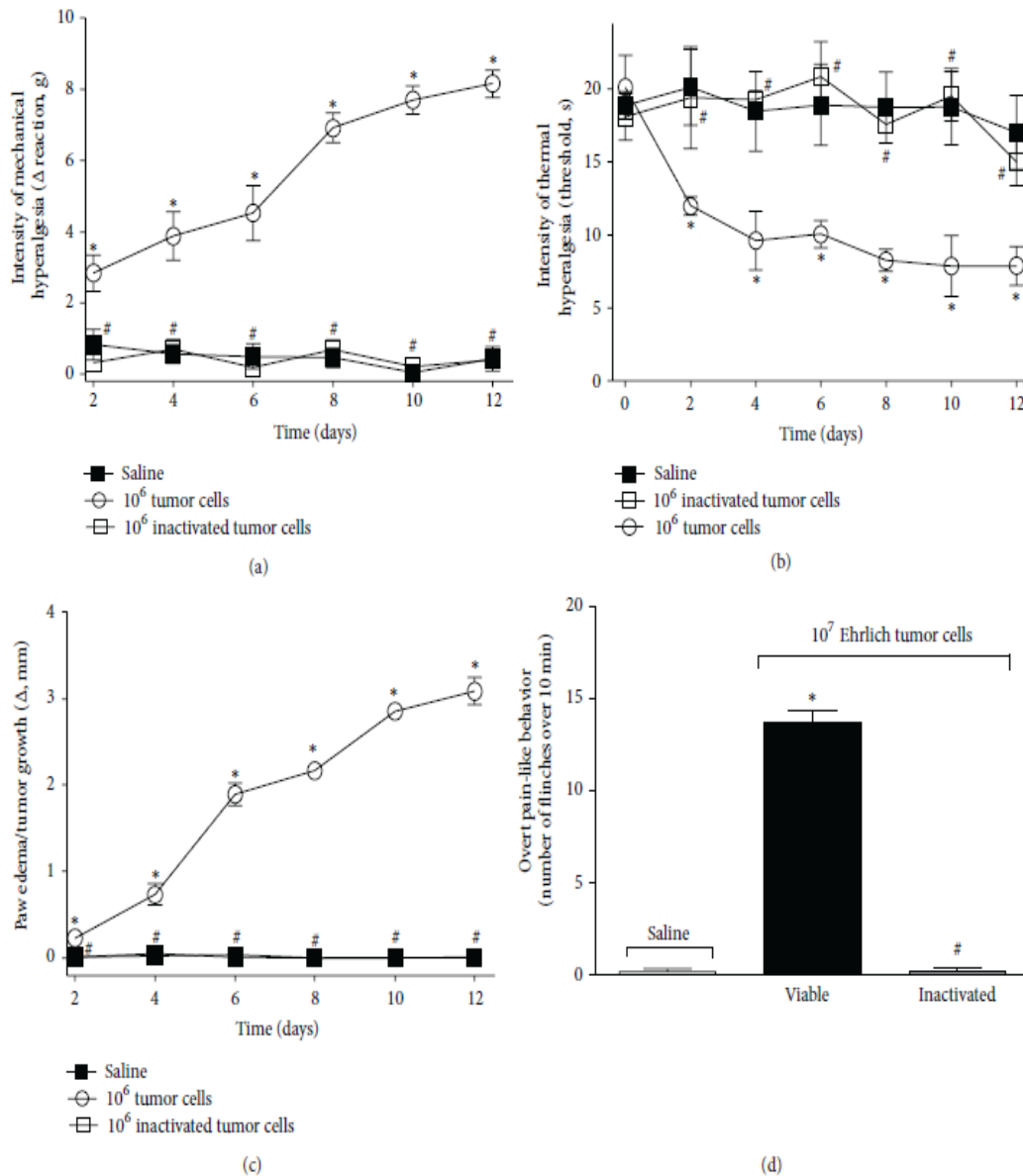


FIGURE 3: Thermal inactivation of the Ehrlich tumor cells abolishes pain and paw edema/tumor growth. The Ehrlich tumor cells ( $1 \times 10^6$ ) were inactivated by cold followed by heat. Mice received 25  $\mu$ L of inactivated tumor cells, viable tumor cells ( $1 \times 10^6$ ), or saline. (a) The intensity of mechanical hyperalgesia, (b) thermal hyperalgesia, and (c) paw edema/tumor growth was evaluated on days 2–12 after injection of the inactivated Ehrlich tumor cells, viable tumor cells, or saline. Mice received  $1 \times 10^7$  of inactivated tumor cells, viable cells, or saline and (d) the overt pain was evaluated on the 8th day after injection;  $n = 6$ , representative of two experiments. \*  $P < 0.05$  compared with the saline, and #  $P < 0.05$  compared with the viable  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  tumor cells.

saline group. However, the treatment with indomethacin did not affect those parameters induced by the Ehrlich tumor cells (Figure 4), indicating that they do not depend on the production of prostanooids.

**3.5. Effect of Amitriptyline Treatment on the Nociceptive Responses and Paw Edema/Tumor Growth Induced by the Ehrlich Tumor Cells.** After inoculation of the  $10^6$  or  $10^7$  Ehrlich tumor cells, mice were treated with amitriptyline (3, 10, and 30 mg/kg) or water via oral gavage (per oral: p.o.)

once a day during 12 days, and 3 h after treatment, mechanical and thermal hyperalgesia, paw edema/tumor growth, and overt pain-like behavior were evaluated (Figure 5). None of the doses of amitriptyline affected the Ehrlich tumor cells-induced mechanical hyperalgesia (Figure 5(a)), thermal hyperalgesia (Figure 5(b)), paw edema/tumor growth (Figure 5(c)), or overt pain (Figure 5(d)). These results suggest that the inhibition of serotonin and/or norepinephrine reuptake does not affect the maintenance of cancer pain in this model.

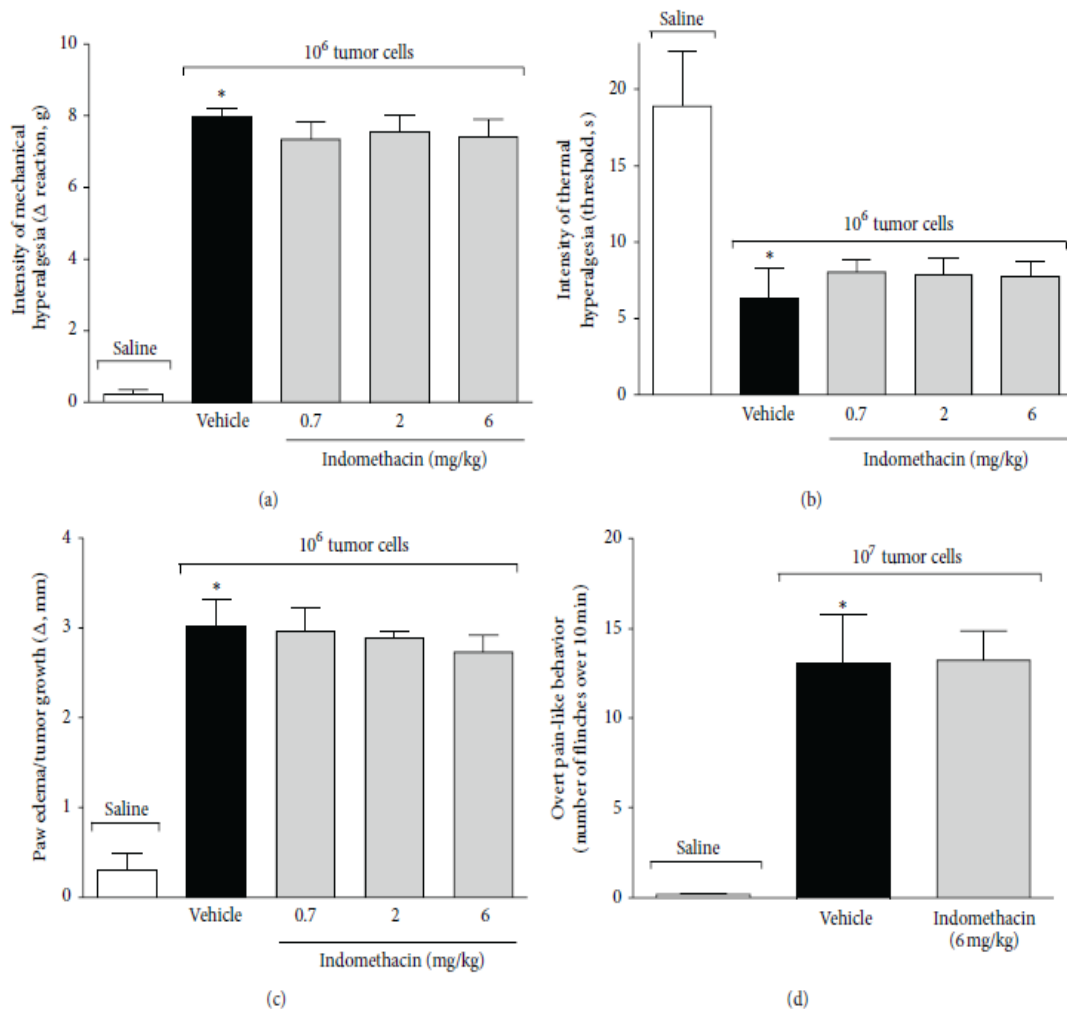


FIGURE 4: Effect of indomethacin treatment on pain and paw edema/tumor growth induced by the Ehrlich tumor cells. Mice received the  $1 \times 10^6$  Ehrlich tumor cells or saline, and on the 8th day, they were treated with indomethacin (0.7–6 mg/kg, i.p.) or Tris buffer. (a) The intensity of mechanical hyperalgesia, (b) thermal hyperalgesia, and (c) paw edema/tumor growth was evaluated 3 h after the treatment. Mice received the  $1 \times 10^7$  Ehrlich tumor cells or saline, and on 8th day, they were treated with indomethacin (6 mg/kg i.p.) or Tris buffer, and (d) overt pain was assessed 3 h after treatment;  $n = 6$ , representative of two experiments. \* $P < 0.05$  vehicle group compared with the saline.

**3.6. Effect of Morphine Treatment on the Nociceptive Responses and Paw Edema/Tumor Growth Induced by the Ehrlich Tumor Cells.** Mice were treated with morphine (1–10 mg/kg, i.p.) or saline on the 8th day after the Ehrlich tumor ( $10^6$  or  $10^7$  cells) injection in which the peak of hyperalgesia was detected. After the treatment (45 min) with morphine, mechanical (Figure 6(a)) and thermal (Figure 6(b)) hyperalgesia and paw edema/tumor growth (Figure 6(c)) were evaluated. The morphine dose dependently inhibited Ehrlich tumor-induced mechanical (Figure 6(a)) and thermal (Figure 6(b)) hyperalgesia, but it did not affect the paw edema/tumor growth, which indicates that morphine presents analgesic effect not related to inhibition of tumor proliferation. The dose of 3 mg/kg of morphine reduced the Ehrlich tumor-induced mechanical hyperalgesia compared with the positive control, while the dose of 10 mg/kg of morphine presented significant

inhibition compared with the Ehrlich tumor-positive control and the doses of 1 and 3 mg/kg of morphine (Figure 6(a)). The Ehrlich tumor-induced thermal hyperalgesia was inhibited by the dose of 10 mg/kg of morphine without significant inhibition with the doses of 1 and 3 mg/kg (Figure 6(b)). To confirm the receptor-dependent effect of morphine and that an opioid-receptor-dependent inhibition of the Ehrlich tumor-induced hyperalgesia was being observed, mice were treated with naloxone (1 mg/kg, i.p.) 1 h before morphine (10 mg/kg) treatment, and after additional 45 min, measurements of mechanical (Figure 6(d)) and thermal (Figure 6(e)) hyperalgesia were performed. Again, the Ehrlich tumor-induced ( $10^6$  cells) mechanical and thermal hyperalgesia were inhibited by morphine, and this inhibition was prevented by naloxone treatment. Furthermore, the Ehrlich tumor induced ( $10^7$  cells) spontaneous flinches at the 8th day

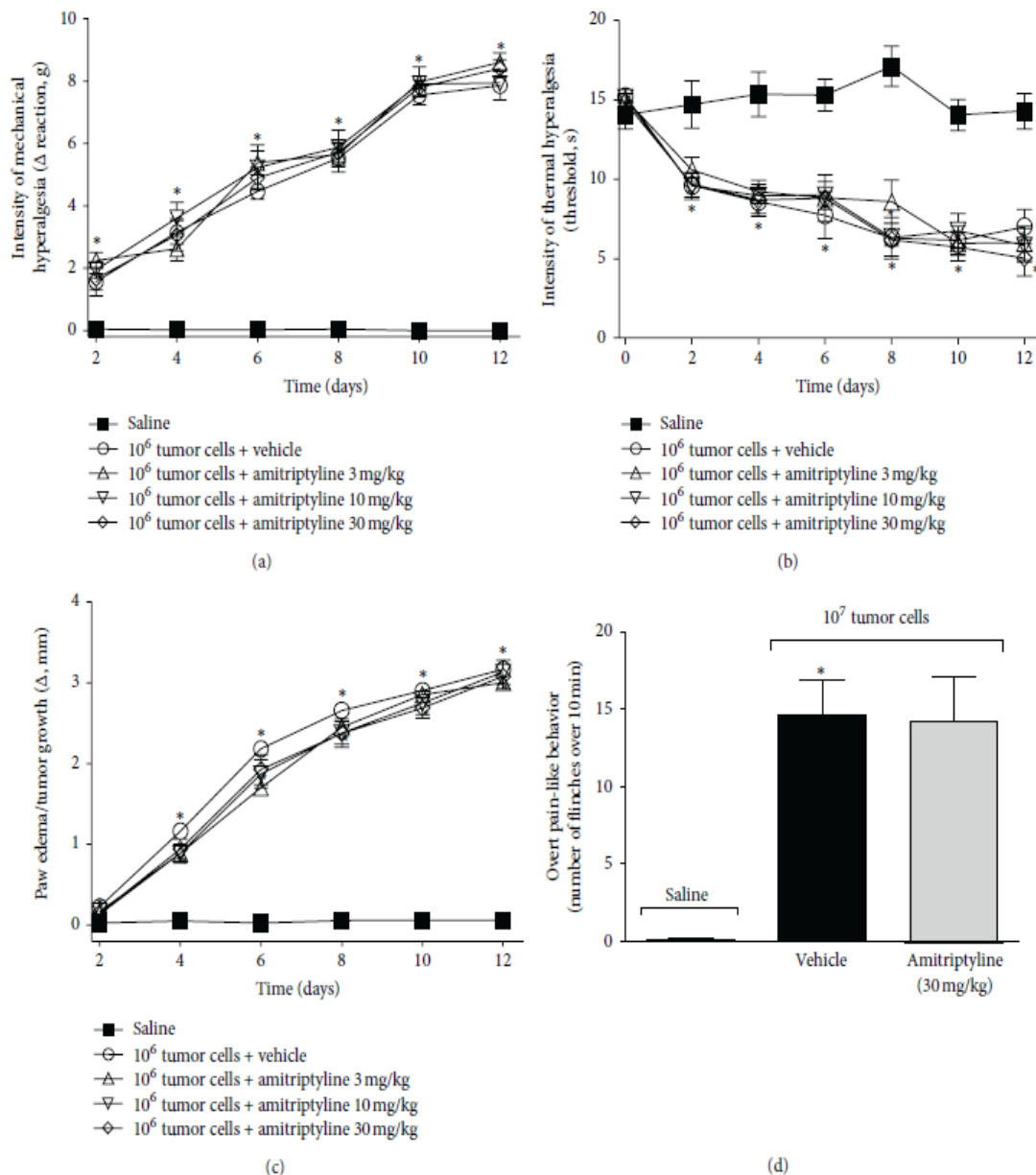


FIGURE 5: Effect of amitriptyline treatment on pain and paw edema/tumor growth induced by the Ehrlich tumor cells. Mice received the  $1 \times 10^6$  Ehrlich tumor cells or saline, and they were treated with amitriptyline (3–30 mg/kg, p.o.) or water every day after subcutaneous injection of tumor cells. (a) The intensity of mechanical hyperalgesia, (b) thermal hyperalgesia, and (c) paw edema/tumor growth was evaluated 3 h after the treatment on days 2, 4, 6, 8, 10, and 12 after injection of the cells. Mice received the  $1 \times 10^7$  Ehrlich tumor cells or saline and were treated daily with amitriptyline (30 mg/kg, p.o.) or water and after 8 days; (d) the overt pain was assessed 3 h after the treatment;  $n = 6$ , representative of two experiments. \* $P < 0.05$  compared with the saline.

of cancer development, which were also inhibited by morphine treatment (10 mg/kg), and the analgesic effect of morphine was prevented by naloxone treatment (Figure 6(f)). Therefore, the Ehrlich tumor induces mechanical and thermal hyperalgesia and overt pain-like behavior susceptible to opioid-receptor analgesia (Figure 6).

#### 4. Discussion

Cancer pain directly affects the quality of life and survival of patients with cancer [11, 30]. Cancer pain is characterized by the presence of hyperalgesia, allodynia, and/or spontaneous pain. Tactile allodynia and mechanical hyperalgesia

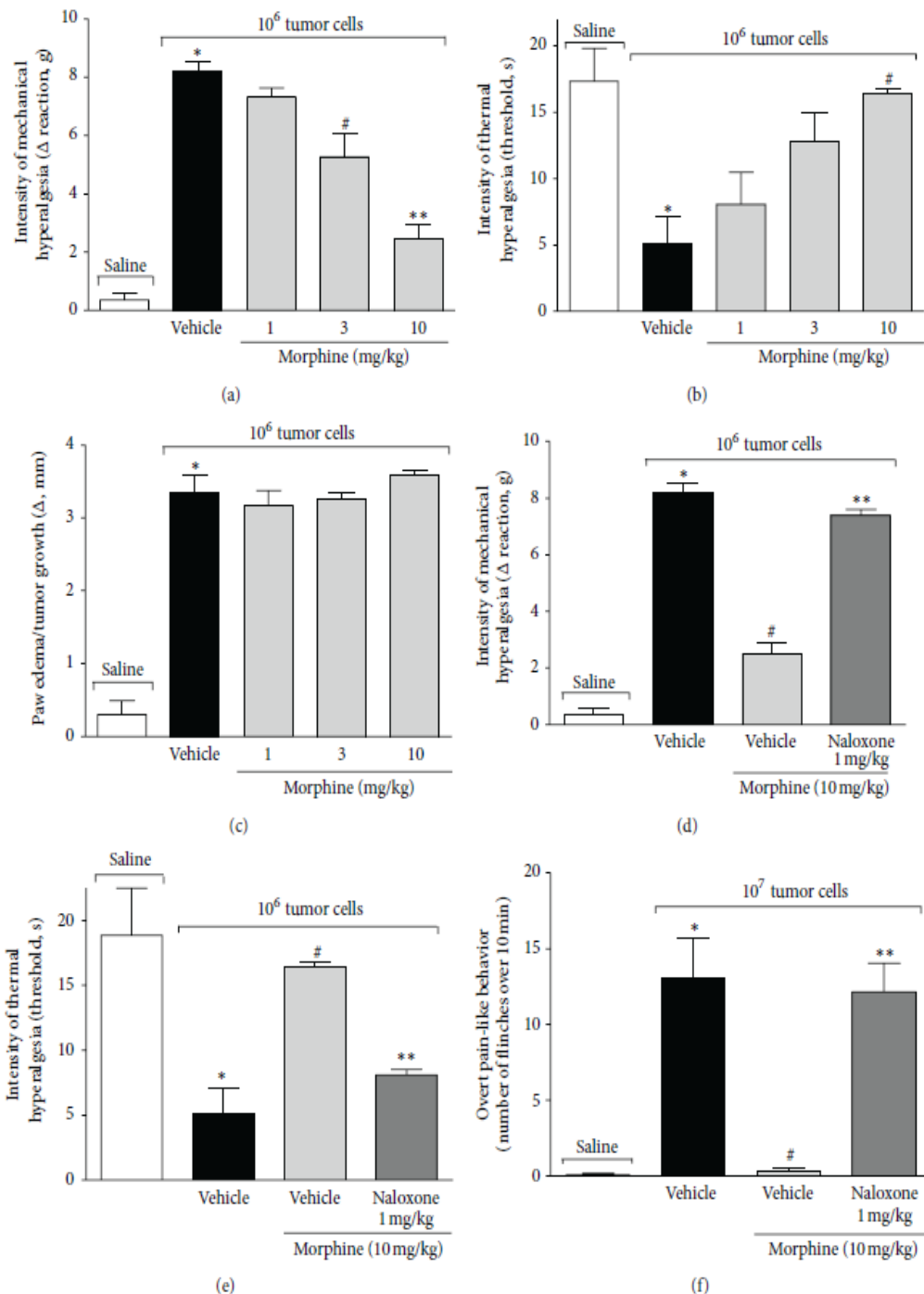


FIGURE 6: Effect of morphine treatment on pain and paw edema/tumor growth induced by the Ehrlich tumor cells. Mice that received the  $1 \times 10^6$  Ehrlich tumor cells were treated with morphine (1–10 mg/Kg, i.p.) or saline on the 8th day after tumor cells injection. (a) The intensity of mechanical hyperalgesia, (b) thermal hyperalgesia, and (c) paw edema/tumor growth was evaluated 45 minutes after treatment with morphine. In another set, mice were treated with naloxone (1 mg/kg, i.p.) 1 hour before the treatment with morphine (10 mg/kg i.p.), and (d) 45 minutes after morphine treatment, the intensity of mechanical hyperalgesia and (e) thermal hyperalgesia was evaluated. Mice received the  $1 \times 10^7$  Ehrlich tumor cells or saline, and after 8 days, they were treated with naloxone (1 mg/kg i.p.) 1 h before treatment with morphine (10 mg/kg i.p.), and (f) 45 min after the treatment with morphine, the overt pain was assessed;  $n = 6$ , representative of two experiments. \* $P < 0.05$  vehicle group compared with the saline; # $P < 0.05$  compared with the tumor or compared with the treatment with naloxone plus morphine, and \*\* $P < 0.05$  compared with the doses of 1 and 3 mg/kg morphine.

are important features of cancer pain and decrease the life quality of patients. Considering the importance of pain in cancer, several experimental models, including neuropathic cancer pain [11], bone cancer pain [12, 31, 32], and cancer pain induced by orthotopic tumor inoculation in mice [10, 33], have been developed and contributed to the characterization of the pathophysiology of cancer pain.

Several experimental studies have shown that marked nociceptive reactions induced by malignant tumor vary with animal species, tumor types, and localizations of the tumor [10–12, 33–36]. In the present study, we develop a model of pain characterized by mechanical and thermal hyperalgesia and spontaneous pain-like behavior, for example, flinching of the paw. The mechanical hyperalgesia and flinches were dependent on the number of the Ehrlich tumor cells injection and were progressive over time. The time- and dose-dependent features of the present model argue in its favor as a good model to investigate the effect of novel analgesics and mechanisms involved in cancer pain regarding mechanical hyperalgesia and overt pain-like behavior. It is noteworthy that, in the case of thermal hyperalgesia, it was significant and increased over time, but there were no differences in the responses induced by different number of the Ehrlich tumor cells injected.

It is important to understand the mechanisms involved in the model used to investigate the action of novel drugs and to have a clear view of the possible mechanisms to be addressed. Nevertheless, as a first insight into the mechanisms involved in the Ehrlich tumor-induced nociception, it was determined its susceptibility to three classes of analgesics; nonsteroidal anti-inflammatory drug, tricyclic antidepressant, and opioid. The acute treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, did not affect the nociceptive responses and paw edema/tumor growth induced by the Ehrlich tumor. Indomethacin did not affect pain in a model of femur cancer pain induced by fibrosarcoma cells in mice [37]. On the other hand, in a model of bone cancer pain induced by injection of osteolytic murine sarcoma into the femur, the oral administration of indomethacin reduced pain behavior in mice [38]. These controversial data may be due to the different routes of administration that were used, the different doses of treatment, and mainly the different models of cancer pain.

Chronic treatment with amitriptyline, a tricyclic antidepressant inhibitor of reuptake of serotonin and norepinephrine, did not inhibit the nociception induced by the Ehrlich tumor cells. Others have shown that amitriptyline reduced only spontaneous pain behavior at sedative doses [37]. Tricyclic antidepressants have been extensively studied because there is evidence of their analgesic properties in several chronic diseases [37], and neuropathic pain [39]. However, the reuptake of serotonin and norepinephrine seems not to be related to the maintenance of cancer pain induced by the Ehrlich tumor.

The treatment with morphine dose dependently reduced the nociception induced by the Ehrlich tumor. Additionally, it was observed that the effect of morphine was receptor specific, because the opioid receptor antagonist naloxone reversed the effect of morphine. Despite the reduction of

nociception promoted by morphine, there was no change in tumor growth, which indicates that morphine inhibited nociceptive responses rather than reduced nociception by decreasing tumor growth.

Despite all of the research performed in an attempt to inhibit cancer pain, it cannot be stated the exact mechanisms involved in the maintenance and chronicity of cancer pain. In fact, cancer patients still face inadequate analgesia. One major reason is that, despite some similarities, each model of cancer pain has its peculiar mechanisms similarly to each type of cancer in humans. Thus, it is conceivable that a great variety of cancer pain models are necessary to line up with varied human conditions. Bone cancer pain models are considered particularly interesting since during metastasis tumor cells may reach the bones. In the present study, there was bone cartilage destruction in the foci of tumor injected, indicating that there might be a bone pain component in this model. Nevertheless, models that evaluate the pain before metastasis are also important. To exemplify conditions in which cancer pain before metastasis is important, it is noteworthy to mention that a third of breast cancer patients will report pain in the lump spontaneously or upon examination [40]. The present model using the injection of cells of a murine mammary adenocarcinoma presents a condition resembling the preoperative breast cancer pain since there is spontaneous pain-like behavior in the paw and hyperalgesia upon stimulation of the lump (foci of tumor injection in the paw). Importantly, there is a significant relation between preoperative breast pain and phantom breast pain syndrome [41], and treatment of pain prior to mastectomy is an important clinical approach to reduce the incidence of phantom breast pain syndrome. Therefore, the present model might contribute as a model to study preoperative breast cancer pain mechanisms.

## 5. Conclusion

We have characterized a cancer pain model induced by subcutaneous injection of the Ehrlich tumor cells into the hindpaw of mice. This model is characterized by robust tumor growth and rapid development of mechanical and thermal hyperalgesia and overt pain-like behavior, rendering it as convenient to study the mechanisms of cancer pain and tumor growth and to test new treatments.

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Acknowledgments

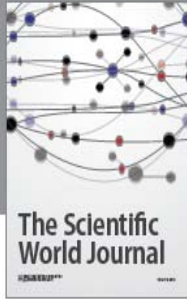
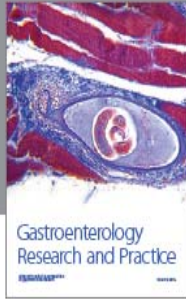
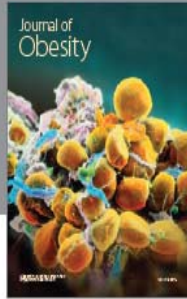
The authors appreciate the technical support of Jesus Vargas, Pedro Dionísio Filho, Talita P. Domiciano (received a SETI/Fundação Araucária and Parana State Government fellowship), and Miriam S. N. Hohmann for the English editing. This work was supported by grants from SETI/Fundação Araucária, Parana State Government, Fundo de Apoio ao Ensino Pesquisa e Extensão/Universidade Estadual de Londrina (FAEPE/Uel 01/2011 and 02/2011), Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. W. A. Verri Jr. received a senior research fellowship from CNPq, and R. Cecchini, E. G. Moreira and R. Casagrande received senior research fellowship from SETI/Fundação Araucária and Parana State Government.

## References

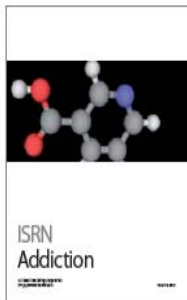
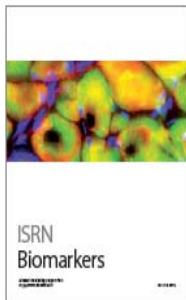
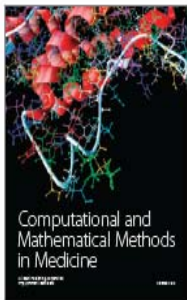
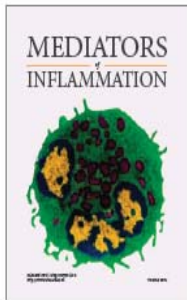
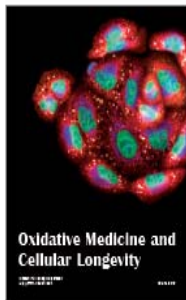
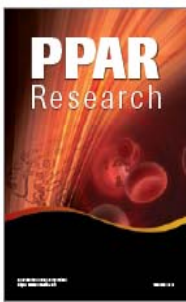
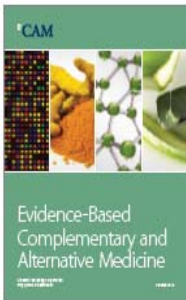
- [1] P. E. Greenberg, S. A. Leong, H. G. Birnbaum, and R. L. Robinson, "The economic burden of depression with painful symptoms," *Journal of Clinical Psychiatry*, vol. 64, no. 7, pp. 17-23, 2003.
- [2] C. R. Green, S. K. Ndao-Brumblay, and T. Hart-Johnson, "Sleep problems in a racially diverse chronic pain population," *Clinical Journal of Pain*, vol. 25, no. 5, pp. 423-430, 2009.
- [3] W. F. Stewart, J. A. Ricci, E. Chee, D. Morganstein, and R. Lipton, "Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce," *Journal of the American Medical Association*, vol. 290, no. 18, pp. 2443-2454, 2003.
- [4] D. C. Turk, "Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain," *Clinical Journal of Pain*, vol. 18, no. 6, pp. 355-365, 2002.
- [5] K. O. Anderson, T. R. Mendoza, V. Valero et al., "Minority cancer patients and their providers: pain management attitudes and practice," *Cancer*, vol. 88, no. 8, pp. 1929-1938, 2000.
- [6] J. E. Nelson, D. E. Meier, E. J. Oei et al., "Self-reported symptom experience of critically ill cancer patients receiving intensive care," *Critical Care Medicine*, vol. 29, no. 2, pp. 277-282, 2001.
- [7] A. Caraceni, "Evaluation and assessment of cancer pain and cancer pain treatment," *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, vol. 45, no. 9, pp. 1067-1075, 2001.
- [8] C. R. Green, T. Hart-Johnson, and D. R. Loeffler, "Cancer-related chronic pain," *Cancer*, vol. 117, no. 9, pp. 1994-2003, 2011.
- [9] M. H. J. van den Beuken-van Everdingen, J. M. de Rijke, A. G. Kessels, H. C. Schouten, M. van Kleef, and J. Patijn, "Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years," *Annals of Oncology*, vol. 18, no. 9, pp. 1437-1449, 2007.
- [10] T. Sasamura, S. Nakamura, Y. Iida et al., "Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation," *European Journal of Pharmacology*, vol. 441, no. 3, pp. 185-191, 2002.
- [11] M. Shimoyama, K. Tanaka, F. Hasue, and N. Shimoyama, "A mouse model of neuropathic cancer pain," *Pain*, vol. 99, no. 1-2, pp. 167-174, 2002.
- [12] M. J. Schwei, P. Honore, S. D. Rogers et al., "Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain," *Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 24, pp. 10886-10897, 1999.
- [13] P. W. Wacnik, L. J. Eikmeier, T. R. Ruggles et al., "Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain," *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 23, pp. 9355-9366, 2001.
- [14] P. W. Mantyh, "Mechanisms of malignant bone pain," in *Cancer Pain: From Molecules to Suffering*, A. J. Paice, R. F. Bell, E. A. Kalso, and O. A. Soyannwo, Eds., chapter 3, pp. 45-62, IASP Press, Washington, DC, USA, 1st edition, 2010.
- [15] M. Kress, "Cytokines and cancer pain," in *Cancer Pain: From Molecules to Suffering*, A. J. Paice, R. F. Bell, E. A. Kalso, and O. A. Soyannwo, Eds., chapter 4, pp. 63-84, IASP Press, Washington, DC, USA, 1st edition, 2010.
- [16] P. Ehrlich and H. Apolant, "Beobachtungen über maligne maus-tumoren," *Berliner Klinische Wochenschrift*, vol. 42, pp. 871-874, 1905.
- [17] H. Loewenthal and G. Jahn, "Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen," *Zeitschrift für Krebsforschung*, vol. 37, no. 1, pp. 439-447, 1932.
- [18] H. Ahmed, B. P. Chatterjee, and A. K. Debnath, "Interaction and in vivo growth inhibition of Ehrlich ascites tumor cells by jacalin," *Journal of Biosciences*, vol. 13, no. 4, pp. 419-424, 1988.
- [19] S. Kametani, T. Oikawa, A. Kojima-Yuasa et al., "Mechanism of growth inhibitory effect of cape aloe extract in Ehrlich ascites tumor cells," *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 53, no. 6, pp. 540-546, 2007.
- [20] E. Balamurugan, B. V. Reddy, and V. P. Menon, "Antitumor and antioxidant role of Chrysaora quinquecirrha (sea nettle) nematocyst venom peptide against ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 338, no. 1-2, pp. 69-76, 2009.
- [21] A. Kumar, S. S. D'Souza, S. R. Mysore Nagaraj, S. L. Gaonkar, B. P. Salimath, and K. M. L. Rai, "Antiangiogenic and antiproliferative effects of substituted-1,3,4-oxadiazole derivatives is mediated by down regulation of VEGF and inhibition of translocation of HIF-1 $\alpha$  in Ehrlich ascites tumor cells," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 64, no. 6, pp. 1221-1233, 2009.
- [22] J. Fastaia and A. E. Dumont, "Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 56, no. 3, pp. 547-550, 1976.
- [23] F. Hartveit, "The immediate cause of death in mice with Ehrlich's ascites carcinoma," *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, vol. 65, no. 3, pp. 359-365, 1965.
- [24] K. D. Mayer, "The pathogenicity of the Ehrlich ascites tumour," *British Journal of Experimental Pathology*, vol. 47, no. 5, pp. 537-544, 1966.
- [25] J. Vieira, P. Matsuzaki, M. K. Nagamine et al., "Inhibition of ascitic Ehrlich tumor cell growth by intraperitoneal injection of Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) butanolic residue," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 53, no. 3, pp. 609-613, 2010.
- [26] X. Zhu, H. Wu, J. Xia, M. Zhao, and Z. Xianyu, "The relationship between <sup>99m</sup>Tc-MIBI uptakes and tumor cell death/proliferation state under irradiation," *Cancer Letters*, vol. 182, no. 2, pp. 217-222, 2002.
- [27] P. Brigatte, S. C. Sampaio, V. P. Gutierrez et al., "Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain," *Journal of Pain*, vol. 8, no. 5, pp. 412-421, 2007.
- [28] T. M. Cunha, W. A. Verri Jr., G. G. Vivancos et al., "An electronic pressure-meter nociception paw test for mice," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 37, no. 3, pp. 401-407, 2004.
- [29] D. A. R. Valério, T. M. Cunha, N. S. Arakawa et al., "Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism," *European Journal of Pharmacology*, vol. 562, no. 1-2, pp. 155-163, 2007.
- [30] S. J. Medhurst, K. Walker, M. Bowes et al., "A rat model of bone cancer pain," *Pain*, vol. 96, no. 1-2, pp. 129-140, 2002.

- [31] D. R. Clohisy, C. M. Ogilvie, and M. L. R. Ramnaraine, "Tumor osteolysis in osteopetrotic mice," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 13, no. 6, pp. 892–897, 1995.
- [32] L. Menéndez, L. Juárez, V. García, A. Hidalgo, and A. Baamond, "Involvement of nitric oxide in the inhibition of bone cancer-induced hyperalgesia through the activation of peripheral opioid receptors in mice," *Neuropharmacology*, vol. 53, no. 1, pp. 71–80, 2007.
- [33] Y. Kuraishi, Y. Iida, H. Zhang et al., "Suppression by gabapentin of pain-related mechano-responses in mice given orthotopic tumor inoculation," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 26, no. 4, pp. 550–552, 2003.
- [34] N. M. Luger, P. Honore, M. A. C. Sabino et al., "Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain," *Cancer Research*, vol. 61, no. 10, pp. 4038–4047, 2001.
- [35] R. K. Portenoy and G. Frager, "Pain management: pharmacological approaches," *Cancer Treatment and Research*, vol. 100, pp. 1–29, 1999.
- [36] M. Shimoyama, H. Tatsuoka, S. Ohtori, K. Tanaka, and N. Shimoyama, "Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic cancer pain," *Pain*, vol. 114, no. 1-2, pp. 221–230, 2005.
- [37] M. E. Mouedden and T. F. Meert, "Pharmacological evaluation of opioid and non-opioid analgesics in a murine bone cancer model of pain," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 86, no. 3, pp. 458–467, 2007.
- [38] O. Saito, T. Aoe, and T. Yamamoto, "Analgesic effects of non-steroidal antiinflammatory drugs, acetaminophen, and morphine in a mouse model of bone cancer pain," *Journal of Anesthesia*, vol. 19, no. 3, pp. 218–224, 2005.
- [39] K. Vissers, V. Hoffmann, F. Geenen, R. Biermans, and T. Meert, "Is the second phase of the formalin test useful to predict activity in chronic constriction injury models? A pharmacological comparison in different species," *Journal of World Institute of Pain*, vol. 3, no. 4, pp. 298–309, 2003.
- [40] W. G. Harris, E. A. Benson, D. Cartwright et al., "Symptoms and signs of operable breast cancer," *The Journal of the Royal College of General Practitioners*, vol. 33, pp. 473–476, 1983.
- [41] K. Kroner, B. Krebs, J. Skov, and H. S. Jorgensen, "Immediate and long-term phantom breast syndrome after mastectomy: incidence, clinical characteristics and relationship to pre-mastectomy breast pain," *Pain*, vol. 36, no. 3, pp. 327–334, 1989.



**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



#### **4 CONCLUSÃO**

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu a caracterização de um novo modelo para o estudo da dor no câncer, com crescimento tumoral sólido, desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica, e dor espontânea.

O modelo apresentado é conveniente para estudar os mecanismos que desenvolvem e mantêm a dor no câncer, principalmente para dores susceptíveis a opióides, mas não a antiinflamatórios ou antidepressivos. Permitindo também o estudo de terapêuticas alternativas para este tipo de dor.

## REFERÊNCIAS

- BALAMURUGAN, E.; REDDY, B.; VEKATA.; M.; VENUGOPAL, P. Antitumor and antioxidant role of *Chrysoara quinquecirrha* (sea nettle) nematocyst venom peptide against ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice. **Mol Cell Biochem** (1-2):69-76, 2009.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet** 7;357(9255):539-45, 2001.
- BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. **Pharmacol Res**, London, 44(6):437-450, 2001.
- BOGLIOLO, PATOLOGIA [editor] Geraldo Brasileiro Filho. 8° ed. Rio de Janeiro; **Editora Guanabara Koogan**, 1501 pg, 2011.
- BRIGATTE, P.; SAMPAIO, S. C.; GUTIERREZ, V. P.; GUERRA, J. L.; SINHORINI, I. L.; CURI, R.; CURY, Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **The journal of pain** 8:412-421, 2007.
- CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: therapeutic advances. **Rev. Bras. Anesthesiol** 54(3):448-464, 2004.
- CINGOLANI, H.E.; HOUSSAY, A.B. Fisiologia Humana de Houssay. 7° edição. Porto Alegre. **Artmed**. 2004.
- CLOHISY, D.R.; OGILVIE, C.M.; RAMNARAIN, M.L. Tumor oste in osteopetrotic mice. **J Orthop Res** 13:892-897, 1995.
- CONSTANTIN, C.E.; MAIR, N.; SAILER, C.A.; ANDRATSCH, M.; XU, Z.Z.; BLUMER, M.J.; SCHERBAKOV, N.; DAVIS, J.B.; BLUETHMANN, H.; JI, R.R.; KRESS, M. Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. **Journal Neuroscience** 28(19):5072-81, 2008.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.K.; COLLINS, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. 6ªed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan S.A**, 2000.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol** 107(3):660-4, 1992.
- CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, 37(3): 401-407, 2004.
- CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad U S A**, Washington, v. 102(5):1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M. Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. In: SORKIN, L.; DELEO, J.; WATKINS, L. R. Immune and Glial Regulation of Pain. **IASP PRESS**, Seattle, 67-83, 2007.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR.; SCHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol** 83(4):824-32, 2008.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad, USA**, 102 :1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C. M.; DUARTE, H. L.; SOUZA, G.R.; VERRI JR, W. A.; FUNEZ, M. I.; DIAS, Q. M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A. C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALL, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine Peripheral analgesia depends on activation of the PI3K $\gamma$ /AKT/nNOS/NO/Katp signaling pathway. **Pharmacology**. 107 (9):4442-4447, 2010.

DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. 148f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, USP, São Paulo, 1989.

EHRlich P, APOLANT H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. **Berl Klin Wschr** 42:871-874, 1905.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; CASTRO, M. A. S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, New York, 16(1): 31-37, 1978.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/ Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandin**, New York, 18(2):179-190, 1979.

FILIZOLA, M., DEVI, L.A. Structural biology: how opioid drugs bind to receptors. **Nature** 485, 314–317, 2012.

GALLI, S.J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune 25 responses. **Nat Immunol**, New York, 6(2):135-142, 2005.

GAO, Y.J.; CHENG, J.K. ZENG, Q.; DECOSTERD, I.; XU, X.; JI, R.R. Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model. **Exp Neurol**:146-155, 2009.

GOODMAN, L.S.; As bases farmacológicas da terapêutica; 9ª edição; **Rio de Janeiro** ; 2003.

GUI Q, XU C, ZHUANG L, XIA S, CHEN Y, PENG P, YU S. A new rat model of bone cancer pain produced by rat breast cancer cells implantation of the shaft of femur at the third trochanter level. **Cancer Biol Ther** 14(2):193-9, 2013.

GUERRERO, A.T.; VERRI, W.A. JR.; CUNHA, T.M.; SILVA, T.A.; SCHIVO, I.R.; DAL-SECCO, D.; CANETTI, C.; ROCHA, F.A.; PARADA, C.A.; CUNHA,

F.Q.; FERREIRA, S.H. Involvement of Itb4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PgE2. **J Leukoc Biol** 83(1):122-130, 2008.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E.; Tratado de fisiologia médica. 11. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 1115 p. 2006.

HARRIS, W.G.; BENSON, E.A.; CARTWRIGHT. D.; CARTWRIGHT, S.C.; CLAYDEN, A.D.; COWEN, P.N.; DOSSET, J.A.; EDWARDS, M.; FRANK, H.G.; GOWLAND, G.; HALL, R.; HOPTON, D.S.; JOSLIN, C.A.F.; LOGAN, V.S.D.; MACKINNON, D.; MCADAM, W.A.F.; MCCRACKEN, M.; MATHESON, T.S.; MODGILL, V.K.; PRICE, J.J.; SMIDDY, F.G.; WHITTAKER, M.; WILKINSON, A.; WILSON, G.; WILSON, K. Symptoms and signs of operable breast cancer. **J R Coll Gen Pract.** 33:473-476, 1983.

HU, S.; MAO-YING, Q.L.; WANG, J.; WANG, Z.F.; MI, W.L.; WANG, X.W.; JIANG, J.W.; HUANG, Y.L.; WU, G.C.; WANG, Y.Q. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines. **J Neuroinflammation.** 9:278, 2012.

IASP–International Association for the Study of Pain. **IASP Taxonomy.** 2012. Disponível em: <[http://www.iasp-Pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResource.Links/Pain Definitions/default.htm](http://www.iasp-Pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResource.Links/Pain%20Definitions/default.htm)>. Acesso em: 09 de outubro de 2012.

INCA. Ministério da Saúde. Estimativa 2012-2013: Incidência de câncer no Brasil. Secretaria de atenção à Saúde, **Instituto Nacional do Câncer** – Rio de Janeiro: 2013.

INCA. Ministério da Saúde. Câncer. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, **Instituto Nacional do Câncer** – Rio de Janeiro: 2013.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK, W.; GOŁAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunol. Letters** 90:103-122, 2003.

JIN, X.; GEREAU, R.W. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. **J Neurosci** 26: 246-55, 2006.

KAMETANI, S.; OIKAWA, T.; KOKIMA-YUASA, A.; KENNEDY, O.D.; KORIKURA, T.; HONZAWA, M. MATSUI-YUASA, I. Mechanism of Growth Inhibitory Effect of Cape Aloe Extract in Ehrlich Ascites Tumor Cells ; **J. Nutr. Sci. Vitanol** 53:540-546, 2007.

KHASAR, S.G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptor. **J Neurophysiol**, Washington. 81(3):1104-1112, 1999.

KATSUNG, B.G.; **Farmacologia básica e clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.

KESWANI, S.C.; POLLEY, M.; PARDO, C.A.; GRIFFIN, J.W.; MCARTHUR, J.C.; HOKE, A. Schwann cell chemokine receptors mediate hiv-1 gp120 toxicity to sensory neurons. **Annals of neurology** 54:287–296, 2003.

KRAYCHETE, D.C.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; BACELLAR, O.; JESUS, R.S.; CARVALHO, E.M. Proinflammatory Cytokines in Patients with Neuropathic Pain Treated with Tramadol. **Rev Bras Anesthesiol** 59(3):297-303, 2009.

KRONER, K.; KREBS, B.; SKOV, J.; JARRGENSEN, H.S. Immediate and long-term phantom breast syndrome after mastectomy: incidence, clinical characteristics and relationship to pre-mastectomy breast pain. **Pain**. 36:327-334, 1989.

LEE, M.; Silverman, A.; Hansen, H.; Patel, V.; Manchikanti, L. A Comprehensive Review of Opioid-Induced Hyperalgesia. **Pain Physician** 14:145-161, 2011.

LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragung-Suersuche Mit Carcinomatöser Mause-Asciteslussigkeit Und Ihr Verhalten Gegen Physikalische Und Chemische Einwirkungen. **Z Krebsforsch**. 37:439-447, 1932.

LORAM, L.C.; FULLER, A.; CARTMELL, T.; MITCHELL, B.; MITCHELL, D. Behavioural, histological and cytokine responses during hyperalgesia induced by carrageenan injection in the rat tail. **Physiol Behav**, Oxford. 92(5):873-880, 2007.

MACHADO, S.M.; SAWADA, N.O.; Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. **Texto contexto enferm** 17(4):750-757, 2008.

MANTYH, P.W. Mechanisms of malignant bone pain. In: Paice, A.J.; Bell, R.F.; Kalso, E.A.; Soyannwo, O.A. Editors. **Cancer Pain: From Molecules to Suffering**. Washington, 1st edn. 45-62, 2010.

MENENDÉZ, L.; JUÁREZ, L.; GARCÍA, V.; HIDALGO, A.; BAAMONDE, A. Involvement of nitric oxide in the inhibition of bone cancer-induced hyperalgesia through the activation of peripheral opióide receptors in mice. **Neuropharmacology**. 71-80, 2007.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, Oxford. 57:1-164, 1999.

MOUEDDEN, M.E.L.; MEERT, T.F. Pharmacological evaluation of opioid and non-opioid analgesics in a murine bone cancer model of pain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 458-467, 2007.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in 17 inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, London. 135(2): 145-153, 1987.

NAVARRO, S.A.; SERAFIM, K.G.; MIZOKAMI, S.S.; HOHMANN M.S.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A. JR. Analgesic activity of piracetam: Effect on cytokine production and oxidative stress. **Pharmacol Biochem Behav**. 6;105C:183-192, 2013.

NETO, O.A.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. Dor Princípios e Prática; Porto Alegre ; **Artmed**, 1440 pg. 2009.

NUMASAKI, M; WATANABE, M; SUZUKI, T; TAKAHASHI, H; NAKAMURA, A; MCALLISTER, F; HISHINUMA, T; GOTO, J; LOTZE, MT; KOLLS, JK; SASAKI, H. IL-

17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. **J. Immunol.** 175:6177–6189. 2005.

OLIVEIRA, P.F.; A assistência de enfermagem na dor no câncer em oncologia pediátrica. (Trabalho de conclusão de curso) (online). **Centro Universitário Claretiano. Batatais.** 2006.

POTENZIERI, C.; HARDING-ROSE, C; SIMONE, D.; The cannabinoid receptor antagonist, WIN 55, 212-2, attenuates tumor-evoked hyperalgesia through peripheral mechanisms. **Brain Res** 1215:69-75, 2008.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; Farmacologia 6ª edição ; Rio de Janeiro. **Elsevier**, 829 pg, 2007.

REGAN, J.M.; PENG, P. Neurophysiology of cancer pain. **Cancer control.** 7(2): 111-9, 2000.

SAITO, O.; AOE, T.; YAMAMOTO, T. Analgesic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetaminophen, and morphine in a mouse model of bone cancer pain. **J. Anesth**19:218-224, 2005.

SAMAD, T.A.; SAPIRSTEIN, A.; WOOLF, C. J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends Mol Med, Oxford.** 8(8):390-396, 2002.

SASAMURA, T.; NAKAMURA, S.; IIDA, Y.; FUJII, H.; MURATA, J.; SAIKI, I.; NOJIMA, H.; KURASHI, Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. **Eur. J. Pharmacol** 441:185–191, 2002

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci** 10:1361-1368, 2007.

SCHÄFERS, M.; LEE, D.H.; BRORS, D.; YAKSH, T.L.; SORKIN, L.S. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor- $\alpha$  after spinal nerve ligation. **J. Neurosci** 23:3028–3038, 2003a.

SCHÄFERS, M.; SVENSSON, C.I.; SOMMER, C.; SORKIN, L.S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. **J Neurosci** 23: 2517–2521, 2003b.

SILVA, R.C.F. Cuidados paliativos oncológicos: reflexões sobre uma proposta inovadora na atenção à saúde. Dissertação de Mestrado (online). **Fundação Oswaldo Cruz.** 2004

SHIMOYAMA, M.; TANAKA, K.; SHIMOYAMA, N. A mouse model of neuropathic cancer pain. **Pain journal** 167-174, 2002

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

SUKHTANKAR, D.; OKUN, A.; CHANDRAMOULI, A.; NELSON, M.A.; VANDERAH, T.W.; CRESS, A.E. Inhibition of p38-MAPK signaling pathway attenuates breast cancer induced bone pain and disease progression in a murine model of cancer-induced bone pain. **Molecular Pain** 7:81, 2011

TANG, J.; LI, Z.H.; GE, S.N.; WANG, W.; MEI, X.P.; WANG, W.; ZHANG, T.; XU, L.X.; LI, J.L..The inhibition of spinal astrocytic JAK2-STAT3 pathway activation correlates with the analgesic effects of triptolide in the rat neuropathic pain model. **Evid Based Complement Alternat Med** 185167, 2012.

USTUN, F.; DURMUS-ALTUN, G.; ALTANER, S.; TUNCBILEK, N.; UZAL, C.; BERKARDA, S. Evaluation of morphine effect on tumour angiogenesis in mouse breast tumour model, *EATC*. **Med Oncol** 28(4):1264-72, 2011.

TAVARES-MURTA, B.M.; MACHADO, J.S.; ZAPAROLI, M.; LARA, V.C.; MURTA, E.F. The relationship of host immune cells, cytokine and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. **Sao Paulo Med** 117(2):87-92, 1999.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat. New Biol.** 231:232–235, 1971.

VALÉRIO, D.A.; FERREIRA, F.I.; CUNHA, T.M.; ALVES-FILHO, J.C.; LIMA, F.O.; DE OLIVEIRA, J.R.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; QUEIROZ, R.H.; VERRI, W.A.JR.Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A1 receptors. **Br J Pharmacol**, London, 158:558-568, 2009a.

VALÉRIO, D.A.; GEORGETTI, S.R.; MAGRO, D.A.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T.M.; VICENTINI, F.T.; VIEIRA, S.M.; FONSECA, M.J.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A. JR. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. **J Nat Prod**, Cincinnati. 72:1975-1979, 2009b.

VERRI, W.A. JR.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development: **Pharmacol Ther** 112(1):116-38, 2006a.

VERRI, W.A.JR.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; WEI, X.Q.; FERREIRA, S.H.; LIEW, F.Y.; CUNHA, F.Q. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception 11 by triggering a sequential release of IFN- $\gamma$ , endothelin, and prostaglandin. **Proc Natl Acad U S A**, Washington 103(25): 9721-9725, 2006b.

VERRI, W.A.JR.; GUERRERO, A.T.; FUKADA, S.Y.; VALÉRIO, D.A.; CUNHA, T.M.; XU, D.; FERREIRA, S.H.; LIEW, F.Y.; CUNHA, F.Q. Il-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad Sci**, USA, 105:2723-2728, 2008.

VILLARREAL, C.F.; FUNEZ, M.I.; FIGUEIREDO, F.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. Acute and persistent nociceptive paw sensitization in mice: The involvement of distinct signaling pathways. **Life Sci**, Oxford. 85: 822-829, 2009.

WACNIK, P.W.; EIKMEIER, L.J.; RUGGLES, T.R.; RAMNARAIN, M.L.; WALCHECK, B.K.; BEITZ, A.J.; WILCOX, G.L. Functional interaction between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. **J Neurosci** 2001;21(23):9355-9366.

WOLF, G.; GABAY, E.; TAL, M.; YIRMIYA, R.; SHAVIT, Y. Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. **Pain**, 120, 315–324, 2006.

ZARPELON, A.C.; SOUZA, G.R.; CUNHA, T.M.; SCHIVO, I.R.; MARCHESI, M.; CASAGRANDE, R.; PINGE-FILHO, P.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; MIRANDA, K.M.; VERRI, W.A.JR..The nitroxyl donor, Angeli's salt, inhibits inflammatory hyperalgesia in rats. **Neuropharmacology**. 3908(13)00105-6,2013.

ZHANG, B; RONG, G; WEI, H; ZHANG, M; BI, J; MA, L; XUE, X; WEI, G; LIU, X; FANG, G. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 374:533–537. 2008.

ZÖLLNER, C., STEIN, C. Opioids. **Handb Exp Pharmacol**, 31–63, 2007.