



**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**LUÍS CARLOS STOEBERL**

**EFEITO DA GLITAZONA E 1 N-  
FENILBENZENOSULFONAMIDA-4-[(Z)-(3-BENZIL-2,4-  
DIOXO-1,3-TIAZOLIDIN-5-ILIDENO)METIL] NA  
NEUROTOXIDADE INDUZIDA PELA OXALIPLATINA  
EM CAMUNDONGOS.**

Itajaí (SC)  
2018



**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**LUÍS CARLOS STOEBERL**

**EFEITO DA GLITAZONA E 1 N-**  
**FENILBENZENOSULFONAMIDA-4-[(Z)-(3-BENZIL-2,4-**  
**DIOXO-1,3-TIAZOLIDIN-5-ILIDENO)METIL] NA**  
**NEUROTOXIDADE INDUZIDA PELA OXALIPLATINA**  
**EM CAMUNDONGOS.**

Tese submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Nara Lins Meira Quintão

Itajaí (SC)  
Março de 2018

Ficha Catalográfica

S65e Stoeberl, Luís Carlos, 1968-

Efeito da glitazona E1 *n*-fenilbenzenosulfonamida-4-[(z)-(3-benzil-2,4 dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil] na neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina em camundongos. [manuscrito] / Luís Carlos Stoeberl. – Itajaí, SC.2018.

152 f. ; il. ; tab. ; graf. ; fig.

Bibliografias f. 135-152  
(Cópia de computador (Printout(s))).

Tese submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Lins Meira Quintão.”

1. Produtos naturais. 2. Farmacologia. 3. Extratos Vegetais  
I. Universidade do Vale do Itajaí. II. Título.

CDU: 615.32



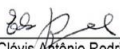
UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

**"EFEITO DA GLITAZONA E 1 N-FENILBENZENOSULFONAMIDA-4-[(Z)-(3-BENZIL-2,4-DIOXO-1,3-TIAZOLIDIN-5-ILIDENO) METIL] NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS"**

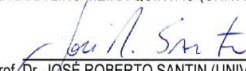
**LUIS CARLOS STOEBERL**

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor (a) em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

  
\_\_\_\_\_  
Professor Clóvis Antônio Rodrigues, Doutor  
Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra NARA LINS MEIRA QUINTÃO (UNIVALI) – Presidente e Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO SANTIN (UNIVALI) – Membro Interno

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. ALEXANDRE BELLA CRUZ (UNIVALI) – Membro Interno

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. ALEXANDRA SUSANA LATINI (UFSC) – Membro Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ (USP) – Membro Externo

Itajaí, 29 de março de 2018.



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, que desde os primeiros anos da minha educação me incentivaram a trilhar os caminhos do saber, da curiosidade pelo novo, e me ensinaram a buscar o conhecimento como forma de alcançar uma vida independente e feliz. Eles não mediram esforços para fornecer as ferramentas financeiras e emocionais para que eu pudesse seguir minha carreira. Por isso, essa tese de doutorado não é somente minha, é deles também, com muito orgulho!



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que com sua força inexplicável me deu energias e saúde para todo o período de pós-graduação associado ao trabalho clínico.

À minha família que soube compreender momentos de ausência e cansaço, sempre com apoio incondicional.

À minha orientadora, Nara Lins Meira Quintão, que com sabedoria e paciência guiou meus passos rumo à conclusão dessa nova etapa do conhecimento científico.

Ao professor José Roberto Santin, pela amizade e contribuição com esse trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que nunca mediram esforços para ajudar nas dúvidas e enigmas de um laboratório na vida de um médico restrito a consultório e hospital. A Gislaïne agora doutora, pelo incentivo, dicas e auxílio nas primeiras etapas do laboratório. Ao Lincon, sempre companheiro de almoços, conversas, caronas e esclarecedor da rotina do laboratório. A Jéssica, pelo enorme ajuda com os experimentos e trocas de ideias. Ao Thiago pela colaboração com os experimentos iniciais de ELISA. À técnica Viviane, sempre solícita e companheira da rotina do laboratório. À Samanta pela ajuda com os camundongos.

Ao Adriel e Aracele, pela grande colaboração com a formatação da tese.

Aos colegas oncologistas da nossa clínica, pela ajuda no atendimento dos pacientes nesse período de ausências.

À professora Ana Angélica Steil pelo ótimo estágio de docência e conselhos.

À professora Luisa Mota da Silva pela colaboração científica e amizade.

Muito obrigado a todos vocês que me acompanharam nessa jornada de 4 anos.

À CAPES, pelo apoio financeiro e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## **EPÍGRAFE**

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá



# EFEITO DA GLITAZONA E1 *N*-FENILBENZENOSULFONAMIDA-4-[(*Z*)-(3-BENZIL-2,4-DIOXO-1,3-TIAZOLIDIN-5-ILIDENO)METIL] NA NEUROTOXIDADE INDUZIDA PELA OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS.

Luís Carlos Stoeberl

Março de 2018

Orientador: Dra. Nara Lins Meira Quintão

Área de concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas

A oxaliplatina é um agente antineoplásico amplamente utilizado no tratamento do câncer colorretal, porém apresenta um efeito adverso dose-limitante que é a neurotoxicidade aguda e crônica, incluindo alodinia e hipersensibilidade mecânica e ao frio. Não existem fármacos eficazes no manejo tanto do efeito neurotóxico agudo como crônico, e medicações atenuantes têm sido usadas como a gabapentina, pregabalina e duloxetine. O composto *N*-fenilbenzosulfonamida-4-[(*Z*)-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil] (E1) diminuiu a hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina com inibição de  $98 \pm 2\%$  na dose de 1mg/kg sendo revertido pelo antagonista PPAR $\gamma$  GW9662. E1 diminuiu a hipersensibilidade crônica mecânica e ao frio induzida pela oxaliplatina. Na hipersensibilidade ao frio, o percentual de inibição da glitazona concomitante foi de  $69 \pm 1\%$  e o de E1 ao final da oxaliplatina foi de  $36 \pm 1\%$  durante o período de 21 dias. Na hipersensibilidade mecânica, o percentual de inibição de E1 concomitante foi de  $78 \pm 0,23\%$  e de E1 ao final da quimioterapia foi de  $31 \pm 0,2\%$  durante o período de 21 dias. Os níveis de interleucina 1 $\beta$  e TNF na medula espinhal foram reduzidos pelo E1. Não foi observada interferência da glitazona sobre a atividade locomotora. O composto aumentou a atividade da catalase no nervo ciático, pata, córtex cerebral e fígado. Não houve alteração significativa da glicose, lipídeos, função renal e hepática bem como no índice de viabilidade celular sugerindo ausência de toxicidade. E1 não alterou o peso do fígado, pulmões, baço, rins e coração, tampouco aumentou o peso corporal. E1 mostrou-se menos adipogênica que a rosiglitazona. A ação do composto via receptor PPAR $\gamma$  foi confirmada pelo teste da atividade da luciferase do *gene reporter* GAL4PPAR $\gamma$  como um agente agonista parcial. Os resultados obtidos evidenciaram redução da hipersensibilidade aguda e crônica induzida pela oxaliplatina através da via PPAR $\gamma$ , com incremento da atividade da catalase e baixo perfil toxicológico. Essa nova glitazona parece ser uma promissora ferramenta farmacológica no tratamento da neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina em pacientes portadores de câncer.

**Palavras-chave:** Oxaliplatina. Glitazonas. Neurotoxicidade.



# **EFFECT OF GLITAZONE E1 N-PHENYLBENZENESULFONAMIDE-4 - [(Z) - (3-BENZYL-2,4-DIOXO-1,3-THIAZOLIDIN-5-YLIDENE) METHYL] ON OXALIPLATIN-INDUCED NEUROTOXICITY IN MICE**

**Luís Carlos Stoeberl**

March 2018

Advisor: Nara Lins Meira Quintão, PhD

Area of concentration: Natural Products and Synthetic Bioactive Substances.

Oxaliplatin is an antineoplastic agent that is widely used in the treatment of colorectal cancer, but it has a dose-limiting adverse effect; acute and chronic neurotoxicity, including allodynia and mechanical and cold hypersensitivity. There are no effective drugs in the management of both acute and chronic neurotoxic effects, and attenuating medications have been used such as gabapentin, pregabalin, and duloxetine. The compound N-phenylbenzenesulfonamide-4 - [(Z) - (3-benzyl-2,4-dioxo-1,3-thiazolidin-5-ylidene) methyl] (E1) decreased acute cold hypersensitivity induced by oxaliplatin with inhibition of  $98 \pm 2\%$  in the dose of 1 mg/kg, being reversed by the PPAR $\gamma$  antagonist GW9662. E1 decreased chronic mechanical and cold hypersensitivity induced by oxaliplatin. In cold hypersensitivity, the inhibition of concomitant E1 was  $69 \pm 1\%$  and that of E1 at the end of oxaliplatin, it was  $36 \pm 1\%$  over the 21-day period. In mechanical hypersensitivity, the inhibition of concomitant E1 was  $78 \pm 0.23\%$  and E1 at the end of chemotherapy, it was  $31 \pm 0.2\%$  over the 21-day period. The levels of interleukin-1 $\beta$  and TNF in the spinal cord were reduced by E1. No interference of locomotor activity was observed. The compound increased the activity of catalase in the sciatic nerve, paw, cerebral cortex and liver. There was no significant change in glucose, lipids, renal and hepatic markers, as well as in cell viability suggesting lack of toxicity. E1 did not change the weight of the liver, lungs, spleen, kidneys and heart and did not increase the body weight. E1 was shown to be less adipogenic than rosiglitazone. The action of the compound via the PPAR $\gamma$  receptor was confirmed by the luciferase activity test of the GAL4PPAR $\gamma$  reporter gene as a partial agonist. The results demonstrated reduction of acute and chronic hypersensitivity induced by oxaliplatin through the PPAR $\gamma$  pathway, with increased catalase activity and low

toxicological profile. This new glitazone seems to be a promisor pharmacological tool to treat neurotoxicity induced by oxaliplatin in patients who suffer with cancer.

Keywords: Oxaliplatin. Glitazones. Neurotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Tipos de fibras nervosas sensoriais.	<b>34</b>
<b>Figura 2</b>	Alterações periféricas e centrais induzidas por lesão neural ou neuropatia periférica.	<b>36</b>
<b>Figura 3</b>	Toxicidade mitocondrial na dor neuropática.	<b>42</b>
<b>Figura 4</b>	Mecanismos de dor neuropática periférica induzida por quimioterapia.	<b>48</b>
<b>Figura 5</b>	Mecanismos de dor neuropática periférica induzida por quimioterápicos.	<b>51</b>
<b>Figura 6</b>	Estrutura química da oxaliplatina segundo IUPAC.	<b>52</b>
<b>Figura 7</b>	Ativação de PPAR e efeitos biológicos.	<b>66</b>
<b>Figura 8</b>	Estrutura química do anel tiazolidinediona.	<b>67</b>
<b>Figura 9</b>	Fórmulas químicas das TZDs mais comuns.	<b>68</b>
<b>Figura 10</b>	Estrutura química da <i>N</i> -fenilbenzossulfonamida-4-[( <i>Z</i> )-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil].	<b>75</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito sistêmico do composto E1 e pioglitazona na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina.	<b>87</b>
<b>Figura 12</b>	Efeito da glitazona E1 em três diferentes dosagens na hipersensibilidade ao frio induzida pela oxaliplatina.	<b>88</b>
<b>Figura 13</b>	Efeito da glitazona E1 e do antagonista PPAR $\gamma$ GW9662 na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina.	<b>89</b>
<b>Figura 14</b>	Efeito da glitazona E1 na viabilidade de células HeLa.	<b>90</b>
<b>Figura 15</b>	Experimento da atividade da luciferase com gene repórter GAL4PPAR da glitazona E1.	<b>91</b>
<b>Figura 16</b>	Efeitos da glitazona concomitante e ao final da injeção da oxaliplatina no modelo de hipersensibilidade crônica ao frio induzida pela	<b>93</b>

	oxaliplatina.	
<b>Figura 17</b>	Efeitos da glitazona concomitante e ao final da injeção da oxaliplatina no modelo de hipersensibilidade crônica ao calor induzida pela oxaliplatina.	<b>94</b>
<b>Figura 18</b>	Efeitos da glitazona concomitante e ao final da injeção da oxaliplatina no modelo de hipersensibilidade crônica mecânica induzida pela oxaliplatina.	<b>95</b>
<b>Figura 19</b>	Efeito da glitazona E1 sobre a atividade locomotora no modelo de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina.	<b>96</b>
<b>Figura 20</b>	Efeito da glitazona E1 nos níveis de TNF e IL-1 $\beta$ na medula espinhal de camundongos no modelo de hipersensibilidade crônica da oxaliplatina.	<b>97</b>
<b>Figura 21</b>	Efeito da glitazona E1 nos níveis de TNF-1 $\beta$ em córtex cerebral.	<b>98</b>
<b>Figura 22</b>	Efeito da glitazona E1 na atividade da catalase em nervo ciático e pata de camundongos.	<b>99</b>
<b>Figura 23</b>	Efeito da atividade da catalase em córtex cerebral e medula espinhal de camundongos.	<b>100</b>
<b>Figura 24</b>	Efeito da glitazona E1 na atividade de catalase no fígado de camundongos.	<b>101</b>
<b>Figura 25</b>	Efeito da glitazona E1 e sulfassalazina na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina.	<b>102</b>
<b>Figura 26</b>	Níveis de BH4 na urina de camundongos do experimento de hipersensibilidade aguda da oxaliplatina.	<b>103</b>
<b>Figura 27</b>	Mensurações das transaminases, colesterol total, triglicérides, creatinina e glicemia nos grupos de camundongos.	<b>105</b>
<b>Figura 28</b>	Evolução do peso corporal dos camundongos tratados com a glitazona e submetidos ao modelo de neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina.	<b>106</b>
<b>Figura 29</b>	Análise histopatológica pela coloração H.E. do fígado de camundongos.	<b>109</b>

<b>Figura 30</b>	Efeito da glitazona E1 na viabilidade de células 3T3-L1.	<b>110</b>
<b>Figura 31</b>	Avaliação da adipogênese da glitazona E1 em cultura de células 3T3-L1.	<b>111</b>
<b>Figura 32</b>	Avaliação da adipogênese da glitazona E1 em cultura de células 3T3-L1-fotodocumentação no aumento de 5x.	<b>112</b>
<b>Figura 33</b>	Avaliação da adipogênese da glitazona E1 em cultura de células 3T3-L1-fotodocumentação no aumento de 10x.	<b>113</b>
<b>Figura 34</b>	Expressão do gene Fabp4 da adipogênese em células 3T3-L1 tratadas com glitazona E1.	<b>114</b>



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Pesos absolutos e relativos dos órgãos de camundongos.	<b>107</b>
-----------------	--	------------



## LISTA DE SIGLAS

ALT – Alanina-aminotransferase  
AST – Aspartato - aminotransferase  
AMPc - Monofosfato Cíclico de Adenosina  
ANOVA - Análise de Variância  
ATP - Trifosfato de Adenosina  
AUC - Area Under Curve (Área Sob a Curva)  
AVE – Acidente Vascular Encefálico  
BH4 - Tetrahidrobiopterina  
BK – Bradicinina  
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro  
BSA – Albumina de Soro Bovino  
CA<sub>v</sub> - Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem  
CCR2 – Receptor de Quimiocina Tipo 2  
CDK – Quinases Dependentes de Ciclinas  
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais  
CGRP - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina  
COMT – Catecol-O-Metiltransferase  
COX<sub>2</sub> - Ciclooxigenase 2  
CPM – Modulação de Dor Condicionada  
CRT1/2 – Transportadores de Cobre  
CX3CR1 – Receptor 1 da Quimiocina CX3C  
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético  
ELISA - Enzimoimunoensaio  
EPM - Erro Padrão da Média  
ERK/MEK – Quinase Ativada por Sinal Extracelular  
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio  
ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio  
GABA - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GCH1 – GTP Ciclohdroxilase 1  
GFAP – Proteína Glial Fibrilar Ácida  
GIRK – Canais de Potássio Corretores de Fluxo de Internalização  
GMPc – Guanosil Monofosfato Cíclico  
GRD – Gânglio da Raiz Dorsal  
GTP – Guanosina Trifosfato

HCN – Canal Hiperpolarizado Ativado por Nucleotídeo Cíclico  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
HPV – Vírus do Papiloma Humano  
HT – Hidroxitriptamina  
IASP - Associação Internacional Para o Estudo da Dor  
IENF – Fibras Nervosas Intraepidérmicas  
IGF-1 – Fator de Crescimento Relacionado à Insulina tipo 1  
K<sub>v</sub> - Canal de Potássio Ativado por Voltagem  
L-THP – Levo-Tetrahidropalmitin  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta  
IL-6 - Interleucina 6  
iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida  
i.p. – Intraperitoneal  
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada  
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno  
MCR1- Receptor da Melanocortina 1  
MMP - Metaloproteinases  
MTT – Dimetilazol Difeniltetrazólico  
Na<sub>v</sub> - Canal de Sódio Dependente de Voltagem  
NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina  
NGF - Fator de Crescimento Neural  
NMDA - N-metil de Aspartato  
NO - Óxido Nítrico  
NOS – Óxido Nítrico Sintase  
OCT – Transportadores Orgânicos de Cátions  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OPRM1 – Receptor de Opióide  $\mu$  1  
OXA - Oxaliplatina  
PAR2 – Receptor 2 Ativado por Proteinase  
P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>R - Receptor Purinérgico<sub>2</sub>X<sub>7</sub>  
PBS - Salina Tampão Fosfato  
PCR – Reação de Cadeia da Polimerase  
PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase  
PKC - Proteína Quinase C  
PLA2 – Fosfolipase A2  
PMSF – Fluoreto de Fenil-metano-sulfonil  
PPAR $\gamma$  – Receptor de Ativação da Proliferação de Peroxissomos gama

PPRE – Elemento de Resposta de PPAR  
PTEN – Homólogo da Tensina e Fosfatase  
RNAm – RNA mensageiro  
RXR – Receptor Retinóide X  
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SNP - Sistema Nervoso Periférico  
SP - Substância P  
TDZ – Tiazolidinediona  
TMB - Tetrametilbenzidina  
TNF - Fator de Necrose Tumoral  
TRP - Receptor de Potencial Transitório  
TRPA1 – Receptor de Potencial Transitório Ankirina Tipo 1  
TRPM8 – Receptor de Potencial Transitório Melastatin 8  
TRPV1 - Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1  
TRESK – Canal de Potássio com Domínio de 2 Poros  
TRAAK – Canal de Potássio de Ativação Mecânica



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo Geral: .....	29
2.2 Objetivos Específicos:.....	29
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>135</b>



# 1 INTRODUÇÃO

A oxaliplatina é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento do câncer de cólon. A sua neurotoxicidade é o efeito adverso mais comum e dose-limitante. Infusões repetidas de oxaliplatina induzem, em poucas horas a dias, severa neuropatia periférica aguda ou crônica em aproximadamente 50% dos pacientes que recebem uma dose acumulada maior que 1000 mg/m<sup>2</sup> (ZANARDELLI et al., 2014).

Compostos analgésicos comumente utilizados para tratar a dor induzida por este quimioterápico, como anti-epiléticos e antidepressivos, são pouco eficazes. A falha terapêutica destes medicamentos reflete a falta de conhecimento sobre a base molecular da neuropatia induzida pela oxaliplatina (CAVALLETTI et al., 2010).

Em um modelo animal de dor neuropática provocada pela oxaliplatina foi identificado o estresse oxidativo como disfunção biomolecular principal (MANELLI et al., 2012). Essa hipótese oxidativa foi confirmada em cultura de astrócitos, um tipo de célula glial ativada *in vitro* pelo tratamento com oxaliplatina. Como a oxaliplatina não possui atividade oxidativa direta, parece que o desequilíbrio oxidativo ocorre por meio de um efeito mediado por células do sistema nervoso (MANELLI et al., 2013).

Após tratamento com oxaliplatina, as mitocôndrias são modificadas em sua morfologia e têm sua função prejudicada (ZHENG et al., 2011). Outra organela celular implicada no processo oxidativo é o peroxissomo, pois nele há tanto a presença da catalase como oxidases, que geram peróxido de hidrogênio, indicando seu envolvimento com espécies reativas de oxigênio (EROs). O grande consumo de oxigênio pelos peroxissomos, a demonstração de produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), bem como a descoberta de várias enzimas que metabolizam estas substâncias nos peroxissomos, conferiram a esta organela um papel fundamental tanto na produção como na inativação de EROs na célula (SCHRADER et al., 2006). Desmielinização severa, degeneração axonal e neuroinflamação são induzidas na deficiência genética de peroxissomos. Mais recentemente os peroxissomos foram envolvidos no desenvolvimento e progressão de doenças degenerativas específicas (TROMPIER et al., 2014).

Em fígado de camundongos foi clonada uma subfamília de receptores nucleares que são fatores de transcrição nuclear chamados PPARs – receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (ISSEMANN et al., 1990). A estimulação do PPAR $\gamma$  aumenta a expressão e atividade da catalase, uma enzima peroxissomal que quebra o peróxido de oxigênio em água e oxigênio. Agonistas do subtipo  $\gamma$  dos PPARs têm recebido considerável atenção como agentes terapêuticos numa grande variedade de doenças neurológicas, incluindo doenças degenerativas, danos traumáticos, acidentes vasculares cerebrais e doenças desmielinizantes (LOURENÇO et al., 2013).

Tiazolidina-2,4-dionas são importantes compostos heterocíclicos que atuam como agonistas do receptor nuclear PPAR $\gamma$ . Quando combinados com outros anéis heterocíclicos, apresentam uma variedade de atividades biológicas como agente antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, anticonvulsivante e com atividade citotóxica antineoplásica (SHANKAR et al., 2012).

No entanto, os agonistas PPAR $\gamma$  da classe das tiazolidinedionas sintetizados e disponíveis comercialmente mostraram toxicidade cardíaca e hepática limitante (FROHLICH et al., 2015), denotando a necessidade de novos compostos ativos e com perfil toxicológico aceitável.

O composto *N*-fenilbenzossulfonamida-4-[(*Z*)-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil], uma tiazolidinediona inédita, denominada glitazona E1, foi testada em modelos animais de dor neuropática aguda e crônica induzida pela oxaliplatina com o intuito de explorar uma nova possibilidade terapêutica analgésica, através da estimulação de peroxissomos com um agonista PPAR $\gamma$ , no controle da neuropatia induzida pela oxaliplatina. Foram também estudados aspectos relacionados ao mecanismo de ação da glitazona E1 na fisiopatologia da neurotoxicidade da oxaliplatina bem como possíveis efeitos adversos desta glitazona.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito do composto *N*-fenilbenzossulfonamida-4-[(*Z*)-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno) metil], um agonista PPAR $\gamma$ , em modelos animais de neurotoxicidade aguda e crônica induzida pela oxaliplatina.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- Padronizar o modelo de dor neuropática aguda e crônica induzida pela oxaliplatina em camundongos;
- Determinar o efeito do composto E1 na dor neuropática aguda ao frio provocada pela oxaliplatina e comparar seus efeitos com o fármaco pioglitazona, uma glitazona disponível comercialmente;
- Confirmar o mecanismo de ação do composto E1 utilizando o antagonista PPAR $\gamma$  GW9662;
- Verificar a afinidade do composto E1 pelo receptor PPAR $\gamma$  por meio de ensaio de gene repórter;
- Avaliar o efeito do composto E1 na dor neuropática crônica provocada pela oxaliplatina, utilizando estímulos mecânico, ao frio e ao calor.
- Dosar os níveis das citocinas interleucina-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral (TNF) na medula e córtex de animais submetidos ao modelo de neurotoxicidade crônica induzida pela oxaliplatina e tratados com o composto E1.
- Demonstrar a atividade da catalase em homogenato de nervo ciático, pata, córtex cerebral, medula espinhal e fígado nos animais

submetidos ao modelo de neurotoxicidade crônica induzida pela oxaliplatina e tratados com o composto E1;

- Investigar o envolvimento da via da BH4 nos efeitos observados para o composto E1 no modelo de neurotoxicidade induzido pela oxaliplatina em camundongos;
- Determinar a evolução do peso corporal e avaliar os níveis de glicose, AST, ALT, colesterol total, triglicerídeos e creatinina nos animais tratados com o composto E1 e submetidos ao modelo de neurotoxicidade induzida por oxaliplatina;
- Verificar o efeito do tratamento com o composto E1 sobre o peso de diferentes órgãos (fígado, pulmões, rins, baço e coração), bem como realizar o exame histopatológico do fígado, coração e rins.
- Avaliar a atividade locomotora dos animais tratados com o composto E1 e submetidos ao modelo de neurotoxicidade crônica induzida pela oxaliplatina;
- Verificar a viabilidade celular de células HeLa tratadas com concentrações crescentes do composto E1 através do teste com MTT e indicar a atividade de luciferase do gene repórter GAL4PPAR $\gamma$ ;
- Verificar a viabilidade celular de células 3T3-L1 tratadas com concentrações crescentes do composto E1 através do teste com MTT e indicar a atividade adipogênica, bem como quantificar a expressão do mRNA para Fabp4.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Dor neuropática:

Apesar de distintas definições de dor neuropática serem utilizadas ao longo dos anos, a mais recente e amplamente aceita descreve a mesma como sendo dor causada pela lesão ou disfunção do sistema somatossensorial (VON HEHN et al., 2012).

O sistema somatossensorial permite a percepção do tato, pressão, dor, temperatura, posição, movimento e vibração. Suas fibras nervosas inervam a pele, músculos, articulações e fáscias com receptores do tipo termorreceptores, mecanorreceptores, prurirreceptores e nociceptores que enviam seus sinais para a medula espinhal e cérebro para o devido processamento do estímulo. A maioria dos processos sensoriais envolve o núcleo talâmico que recebe o impulso sensorial que então é direcionado para o córtex cerebral. Lesões ou doenças do sistema nervoso somatossensorial ocasionam transmissão de sinais sensoriais alterada e desordenada para a medula espinhal e cérebro. Condições comuns associadas à dor neuropática incluem: neuralgia pós-herpética, neuralgia do trigêmeo, radiculopatia dolorosa, neuropatia diabética, infecção pelo HIV, hanseníase, amputações de membros, fármacos como quimioterápicos, lesão neural periférica e acidente vascular encefálico (AVE) na forma de dor central pós AVE (COLLOCA et al., 2017).

Qualquer trauma ou doença acometendo o sistema somatossensorial pode ter a capacidade de gerar uma síndrome de dor neuropática, porém não como um fator isolado, o que destaca a importância de fatores genéticos e ambientais associados, bem como a patogênese individual da doença. Assim, indivíduos com doenças similares afetando o sistema nervoso podem experimentar distintos fenótipos sensoriais anormais. Geralmente uma redução da percepção vibratória e tátil está associada a sintomas sensoriais como parestesia, disestesia e dor. Essa dor pode se manifestar de maneira tanto espontânea (dor em queimação ou em choque) como hipersensibilidade a um estímulo mecânico ou térmico (BARON et al., 2010). Essa hipersensibilidade compreende a alodinia que representa uma sensibilidade anormal das fibras sensoriais táteis e a

hiperalgesia, resposta dolorosa exacerbada a estímulo leve ou moderado (RAMIREZ et al., 2013).

Apesar das neuropatias associadas às condições mórbidas como diabetes, SIDA, câncer, terapias farmacológicas diferirem em certos detalhes, elas apresentam similaridades como início dos sintomas em nível dos pés, com pacientes referindo sensação de adormecimento ou formigamento e também dor descrita como em queimação, em pontadas ou sensação de agulhadas. Além disso, costumam apresentar hipersensibilidade ao frio e a estímulos mecânicos. A função motora geralmente é mantida, exceto por sintomas referentes à propriocepção. A condução sensorial nervosa pode ser normal ou não (latência diminuída ou redução de amplitude dos potenciais de ação) e biópsias neurais podem revelar degeneração axonal em alguns pacientes. Biópsia de pele para estudo das terminações nervosas com a coloração PGP9.5, um marcador pan-neuronal, revelou perda de fibras nervosas intra-epidérmicas que são os terminais sensoriais dos neurônios aferentes (BENNETT et al., 2014).

Nem todos os pacientes com neuropatia periférica ou dano ao SNC desenvolvem dor neuropática. Num grande estudo de coorte verificou-se que a prevalência de dor em diabéticos com neuropatia periférica foi de 21% e quando esta neuropatia era severa, a prevalência de dor aumentava para 60% (ABBOTT et al., 2011). A dor neuropática tem uma fisiopatologia diversa de outras condições álgicas crônicas, como a dor inflamatória que ocorre na artrite reumatoide, na qual a causa primária é a inflamação com eventos químicos alterados no sítio da inflamação (COSTIGAN et al., 2009).

A dor neuropática está associada a um aumento no número de prescrições de analgésicos bem como de consultas médicas. Os sintomas tendem a persistir com uma tendência à cronicidade e respostas cada vez menores aos analgésicos tradicionais. Distúrbios do sono, ansiedade e depressão são frequentes e severos nos pacientes com dor neuropática, e sua qualidade de vida tende a ser pior quando comparada a pacientes com dor crônica de outras etiologias. Recentes progressos no entendimento da fisiopatologia da dor neuropática refletem no desenvolvimento de novos procedimentos diagnósticos e terapêuticos mais personalizados (FINNERUP et al., 2016b).

### ***3.1.1 Epidemiologia:***

O recente desenvolvimento de ferramentas simples de rastreamento na forma de questionários contribuiu para a realização de grandes estudos epidemiológicos em diferentes países, incluindo o Brasil. A prevalência de dor crônica com características neuropáticas nesses estudos foi estimada na ordem de 7-10% (VAN HECKE et al., 2014).

A dor neuropática é mais frequente em mulheres (8% versus 5,7%) bem como em pacientes acima de 50 anos de idade e mais comumente afeta região lombar e membros inferiores, pescoço e membros superiores. As radiculopatias cervical e lombar são as mais frequentes causas de dor neuropática crônica. Uma pesquisa com mais de 12.000 pacientes com dor crônica que foram referidos a médicos na Alemanha revelou que 40% de todos os pacientes relataram no mínimo algumas características de dor neuropática como sensação de queimação, formigamento ou adormecimento, particularmente em pacientes com dor lombar (BOUHASSIRA et al., 2008).

### ***3.1.2 Aspectos anátomo-funcionais:***

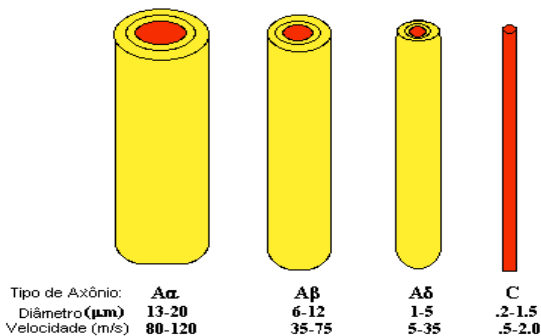
A sensação de dor é codificada por um grupo específico de neurônios periféricos e centrais cujo objetivo primário é alertar o organismo acerca de situações potencialmente perigosas. O sistema nociceptivo detecta estímulos deletérios que são de magnitude suficiente para causar um dano corporal ocasionando um comportamento defensivo. Essa detecção inicia em terminações nervosas livres na pele ou vísceras que contêm receptores de membrana capazes de converter energia térmica, química e mecânica em impulsos nervosos. Esses impulsos são carreados da periferia para o gânglio dorsal da medula espinhal, onde neurotransmissores transferem a atividade elétrica para neurônios secundários. Nesse ponto, os estímulos periféricos são integrados com informações de vias neuronais descendentes que modulam o circuito nociceptivo de maneira integrada ao contexto ambiental (WOOLF, 2010).

A soma destas interações é então transportada por projeções dos neurônios secundários para núcleos supra-espinhais que interpretam o estímulo doloroso criando a consciência do fenômeno álgico. O circuito

nociceptivo não é estático; ele tem uma enorme plasticidade da periferia até o neocórtex que modula a percepção da dor para refletir as necessidades fisiológicas do organismo e otimizar a sobrevivência. A dor neuropática, assim, pode ser considerada um sequestro inapropriado da plasticidade neuronal congênita para promover uma hipersensibilidade num contexto onde ela não é benéfica (RAMIREZ et al., 2013).

Os neurônios que detectam os estímulos nocivos, apesar de anatomicamente próximos, são distintos dos neurônios com mecanorreceptores responsáveis pela percepção da vibração e tato fino. Ambos são células neuronais aferentes unipolares do gânglio da raiz dorsal ou gânglio trigeminal com extensões periféricas para pele e vísceras, e terminações centrais que se estendem para a substância cinzenta da medula espinhal ou núcleo trigeminal caudal. Aferentes com mecanorreceptores da propriocepção são de baixo limiar e contêm fibras A $\beta$  que podem ser distinguidos dos aferentes com nociceptores por propriedades bioquímicas e eletrofisiológicas. Fibras A $\beta$  têm grande diâmetro, muito mielinizadas e com rápida condução, ao passo que as fibras nervosas envolvidas na nocicepção são de duas categorias: fibras A $\delta$ , mielinizadas, com diâmetro intermediário (1-5 $\mu$ m) que conduzem um estímulo doloroso agudo, inicial e bem localizado; e fibras C, de pequeno diâmetro (0,2 – 1,5  $\mu$ m), não mielinizadas que medeiam uma segunda dor mais branda e difusa. Tomadas em conjunto, as fibras A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\delta$  e C constituem o sistema somatossensorial (figura 1) (BASBAUM et al., 2009).

**Figura 1** – Tipos de fibras nervosas sensoriais.



Os estímulos químicos, térmicos e mecânicos nocivos precisam ser transformados em impulsos elétricos, função que é desempenhada por uma série de receptores especializados como canais de sódio e potássio, receptores acoplados a proteína G e receptores tirosina-quinases presentes na membrana neuronal. Além disso, estes receptores especializados também desempenham um importante papel na plasticidade nociceptiva regulando a excitabilidade da membrana e ditando a magnitude do estímulo necessário para gerar um potencial de ação (CATERINA et al., 1997) um marco na compreensão do funcionamento dos nociceptores ocorreu com a descoberta da família de receptores de potencial transitório (TRP), que são canais de cálcio não seletivos (COSENS et al., 1969).

Esses receptores de membrana serviram de substrato para a compreensão de como uma condição adversa poderia desencadear uma despolarização neuronal. O TRP melhor caracterizado é o TRPV1 (receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1) que é ativado, em condições fisiológicas, por temperaturas acima de 42 °C e pelo composto químico capsaicina encontrado nas pimentas. Em condições patológicas, TRPV1 foi implicado na hipersensibilidade dolorosa em modelos animais de inflamação, neuropatia diabética, lesão neural parcial e neuropatia dolorosa induzida por quimioterapia (TA et al., 2010).

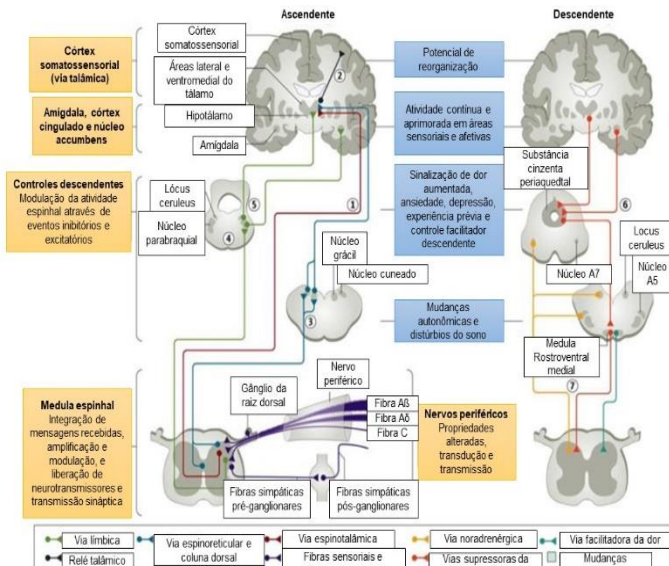
A lesão neuronal leva a hipersensibilidade mediada por TRPV1 como resultado de mudanças de expressão, de condução e ativação desses receptores. Componentes do processo inflamatório podem modificar os receptores TRPV1 através de modulação alostérica direta ou por fosforilação de domínios intracelulares dos receptores ocasionando alodinia e hiperalgesia (VON HEHN et al., 2012).

Além de hipersensibilidade, indivíduos com dor neuropática frequentemente apresentam dor espontânea gerando desconforto e estresse. Após um trauma no nervo periférico, foi observada atividade ectópica em nociceptores periféricos como principal fonte de dor espontânea. Em pessoas saudáveis, um neurônio quiescente somente irá gerar um potencial de ação quando presente um estímulo de magnitude suficiente para ocasionar uma despolarização de membrana. Após lesão neuronal, no entanto, alterações significativas na expressão, distribuição e cinética dos canais iônicos levam a perda da homeostasia do potencial elétrico da membrana, causando oscilações e disparos de sinais. Isso se manifesta como

dor espontânea com características de queimação e fisgada. Três tipos de canais iônicos parecem mediar esse efeito: canais de potássio com domínio de dois poros (TRESK e TRESK-2), canais de sódio dependente de voltagem ( $Na_v1.8$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.1$  e  $Na_v1.9$ ) e canais hiperpolarizados ativados por nucleotídeo cíclico (HCN). Canais  $Na_v1.8$  tem um importante papel na alodinia induzida pelo frio (DIB-HAIJ et al., 2010).

Assim, a atividade ectópica em fibras aferentes constitui-se de importante mecanismo fisiopatológico da dor neuropática após trauma ou doença de nervo periférico. Pacientes com polineuropatia diabética dolorosa ou trauma de nervo periférico apresentam uma perda completa da dor espontânea ou evocada quando tratados com lidocaína, que bloqueia os canais de sódio voltagem-dependentes. De maneira similar, o bloqueio de gânglio dorsal por injeção intraforaminal de lidocaína resulta em alívio da dor de membro fantasma (HAROUTOUNIAN et al., 2014).

**Figura 2** – Alterações periféricas e centrais induzidas por lesão neural ou neuropatia periférica.



Estudos pré-clínicos com animais mostraram que danos a todas as fibras sensoriais periféricas alteram a transdução e transmissão do estímulo doloroso devido a uma alteração funcional de canais iônicos. Essas alterações afetam a atividade da medula espinal levando a uma excesso de excitação acoplado a uma diminuição da

inibição. Nas vias aferentes ascendentes os componentes sensoriais da dor são transmitidos via trato espino-talâmico para regiões ventrobasais mediais e laterais do tálamo (1) e daí então para o córtex somatossensorial permitindo que a dor seja percebida em sua intensidade e localização (2). A medula espinhal também possui projeções espinoreticulares para o núcleo grácil e cuneiforme no tronco cerebral (3). Projeções ao sistema límbico são retransmitidos a partir do núcleo parabrachial (4) para amígdala e hipotálamo onde funções centrais autonômicas, medo e ansiedade são alteradas (5). Vias eferentes descendentes da amígdala e hipotálamo (6) direcionam-se para a substância cinzenta periaquedutal, locus ceruleus, núcleos A5 e A7 e medula medial rostroventral no tronco cerebral. Destas áreas surgem vias descendentes inibitórias com  $\alpha 2$  adrenoreceptores que são projetadas para a medula espinhal. Na neuropatia periférica existe perda desse controle inibitório descendente com consequente exacerbação da via excitatória ascendente (7).

Fonte: Adaptado de Colloca et al., 2017.

Uma secção transversal do corno posterior da medula espinhal revela distintas camadas de substância cinzenta denominadas de lâminas de Rexed, que integram a entrada de uma variedade de estímulos ascendentes e descendentes. Cada camada forma um compartimento funcional contendo uma rede de aferentes primários, projeções e neurônios secundários, fibras descendentes e interneurônios com um típico padrão de conectividade. As camadas mais superficiais do corno posterior, lâminas I e II recebem estímulos quase que exclusivamente de fibras A $\delta$  e C, enquanto as fibras A $\beta$  dirigem-se para as lâminas III e IV. A lâmina V recebe uma integração das fibras A $\beta$ , A $\delta$  e C. Esta organização segregada (lâminas I a IV) e integrada (V) constitui o substrato para distintos mecanismos fisiopatológicos da dor neuropática (TODD, 2010).

Alterações estruturais e funcionais do circuito do corno posterior da medula espinhal levam à dor de hipersensibilidade que é mantida independente da sensibilização periférica. Essa sensibilização central provê uma justificativa para as anormalidades sensoriais que ocorrem em estados dolorosos tanto agudos quanto crônicos, como a expansão da hipersensibilidade para áreas além do território da lesão neural, aumento progressivo da dor mediante estímulos de magnitude constante e dor persistente após cessar estímulo periférico doloroso. Em indivíduos saudáveis, a dor aguda gera uma sensibilização central, porém há um retorno para a sensibilidade homeostática assim que cessa o insulto inicial. Em alguns indivíduos que desenvolvem dor neuropática, fatores genéticos e

ambientais contribuem para a manutenção da sensibilização central levando à dor espontânea, hiperalgesia e alodinia (PFAU et al., 2011).

Em nível celular, a facilitação ou potencialização das sinapses no corno posterior da medula espinhal leva à sensibilização central que se caracteriza por um fortalecimento sináptico que ocorre através da liberação repetida de neurotransmissores do nociceptor primário levando a um remodelamento molecular pós-sináptico nos neurônios secundários, o que culmina numa necessidade reduzida de neurotransmissor para gerar um potencial de ação. A potencialização de nociceptores no corno posterior é dependente da função dos receptores ionotrópicos pós-sinápticos NMDAR (receptores N-metil-D-ácido aspártico) que é um potencial alvo terapêutico no tratamento da dor neuropática com sensibilização central. Também ocorre uma diminuição no limiar de ativação do neurônio secundário com alterações moleculares, ocorrendo em nível de dendritos, o que resulta em percepção de dor a partir de estímulos inócuos, ou seja, alodinia (RAMIREZ et al., 2013).

Dois neuropeptídeos, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), são exclusivamente expressos pelas fibras A $\delta$  e C na periferia. Após uma lesão neuronal, porém, fibras A $\beta$  começam a produzir tais neuropeptídeos ocasionando alodinia mecânica. Em contraste com o ganho de função em fibras A $\beta$  após dano neuronal, vias inibitórias descendentes e interneurônios experimentam uma severa perda de função, liberando assim o freio sobre a neurotransmissão com consequente aumento da atividade excitatória na superfície do corno dorsal. Esse intenso ambiente excitatório contribui para a apoptose de interneurônios GABAérgicos e neurônios inibitórios descendentes da medula rostroventral, bem como para a atenuação da eficácia de interneurônios GABAérgicos intactos que ocorre independente de morte celular. A ativação da micróglia em sistema nervoso central é um marco patológico da lesão no sistema nervoso, levando à liberação de fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) que ocasiona uma diminuição do efeito de GABA (ácido gama amino butírico) nos neurônios da lâmina I. BDNF pode ser uma terapia alvo promissora no tratamento da dor neuropática (DE FELICE et al., 2011).

Além de alterações na transmissão de estímulos dolorosos nos neurônios, ocorre uma disfunção de interneurônios inibitórios e sistemas moduladores descendentes em pacientes com dor neuropática. A alteração dos interneurônios contribui para um desequilíbrio generalizado das vias

descendentes inibitórias e ascendentes excitatórias, ocorrendo uma alternância para a excitação. Consequentemente, o córtex cerebral, tálamo e sistema límbico recebem mensagens sensoriais alteradas e anormais resultando em altos níveis de dor, ansiedade, depressão e distúrbios do sono. Áreas como o córtex cingulado e amígdala estão implicados na manutenção da dor e comorbidades associadas a dor neuropática. Projeções neurais dessas regiões modulam as vias descendentes da substância cinzenta periaquedutal ao tronco cerebral e daí para a medula espinhal. Vias excitatórias no tronco cerebral são mais importantes na manutenção da dor do que na sua indução (COLLOCA et al., 2017).

A inibição noradrenérgica, mediada através de receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos na medula espinhal, está atenuada na dor neuropática enquanto a sinalização serotoninérgica torna-se dominante através de receptores 5HT<sub>2</sub> e 5HT<sub>3</sub>. O sistema noradrenérgico medeia o controle inibitório doloroso difuso no qual uma dor inibe a outra através de vias descendentes, mecanismo este perdido ou parcialmente alterado na neuropatia e conhecido como modulação da dor condicionada (figura 2). Assim, medicações que manipulam o sistema das monoaminas podem ser vantajosas no tratamento da dor neuropática (BANNISTER et al., 2016).

A ativação de nociceptores periféricos desencadeia uma resposta comportamental complexa que permite a um organismo evitar um estímulo nocivo imediatamente (movendo-se para longe da fonte de dor) e no futuro através de mecanismos de aprendizagem e memória. O conjunto desses comportamentos requer o funcionamento de uma grande variedade de regiões corticais e subcorticais que regulam aspectos perceptivos e cognitivos. Exemplos incluem áreas do cérebro relacionadas à motivação, recompensa, aprendizagem, memória, sensibilização somática (APKARIAN et al., 2011).

Classicamente, as áreas do cérebro contêm duas vias paralelas no controle de diferentes aspectos da dor: discriminação sensorial (localização, duração e intensidade) ou afetivo-motivacional (sentimento de sofrimento e comportamento de afastamento). Imagens de ressonância magnética funcional no contexto de dor aguda térmica mostram que a intensidade do estímulo momentâneo é codificada por grandes porções do córtex cingular e insular ao passo que regiões específicas destes (porção anterior do cíngulo e posterior da ínsula) se correlacionam fortemente com a percepção subjetiva

da dor. Estes achados definem uma codificação precisa têmporo-espaical da dor no cérebro correlacionando atividade neural com funções cognitivas e comportamentais. Condições de dor crônica estão associadas com vastas alterações funcionais e estruturais do cérebro quando comparado a controles saudáveis. No entanto, permanece inconclusivo se a dor crônica distorce o circuito e anatomia cerebral ou anormalidades cerebrais desencadeiam e mantêm a percepção de dor crônica. Estas normalidades nos estados de dor crônica incluem modificações nos padrões de atividade cerebral, diminuições localizadas de volume de substância cinzenta e circuitos cerebrais alternativos. A atrofia de substância cinzenta ocorre em situações de dor como fibromialgia, osteoartrite de joelhos e cefaleias, sendo que esta condição representa uma forma de plasticidade, pois é reversível quando a dor é efetivamente tratada (GWILYM et al., 2010).

Alguns pacientes com dor neuropática são moderadamente afetados, ao passo que em outros a dor é debilitante. Há também variabilidade de resposta da dor neuropática frente às terapias farmacológicas e não farmacológicas. Estas variáveis são justificadas pela maneira como o estímulo doloroso é modulado no sistema nervoso central. O sinal de dor pode ser aumentado ou reduzido quando ascende pela coluna dorsal da medula espinhal em direção ao córtex cerebral onde haverá a consciência da dor, podendo modificar a correlação existente entre a extensão da patologia periférica e a intensidade da síndrome dolorosa. A maioria dos pacientes com dor neuropática expressa um padrão de modulação pró-nociceptivo, ou seja, o estímulo doloroso é magnificado em nível de sistema nervoso central por meio de uma diminuição da inibição das vias endógenas descendentes ou sensibilização das vias ascendentes de dor (YARNITSKY, 2015).

Assim, pode-se especular que pacientes que apresentam um padrão pró-nociceptivo relacionado à facilitação de vias ascendentes poderia ser tratado com fármacos que reduzem essa sensibilização, tais como os gabapentinóides. Já os pacientes que expressam um padrão pró-nociceptivo de vias inibitórias poderiam ser medicados com drogas que inibem a recaptção da noradrenalina e serotonina, como a duloxetina. Estas alterações do padrão modulatório da dor podem ser restauradas para a normalidade com o tratamento efetivo da dor (HAROUTOUNIAN et al., 2014).

### ***3.1.3. Determinantes genéticos e ambientais da dor neuropática:***

Um grande desafio no tratamento da dor neuropática é a heterogeneidade da sua patogênese dentro da classificação etiológica. Pacientes com doenças semelhantes podem apresentar fenótipos completamente diferentes de dor neuropática, possivelmente devido a variações genéticas e ambientais. Alguns biomarcadores genéticos da dor foram identificados como o polimorfismo da catecol-O-metiltransferase (COMT) associado com a dor da articulação têmporo-mandibular e alelos do receptor opioide  $\mu 1$  (OPRM1) e receptor da melanocortina 1 (MCR1) como potenciais determinantes da sensibilidade aos opióides (RAMIREZ et al., 2013).

Polimorfismos do gene da enzima GTP ciclohidroxilase 1 chamada atualmente de GCH1 foram associados a reduzida sensibilidade álgica tanto clínica como experimental (BELFER et al., 2014).

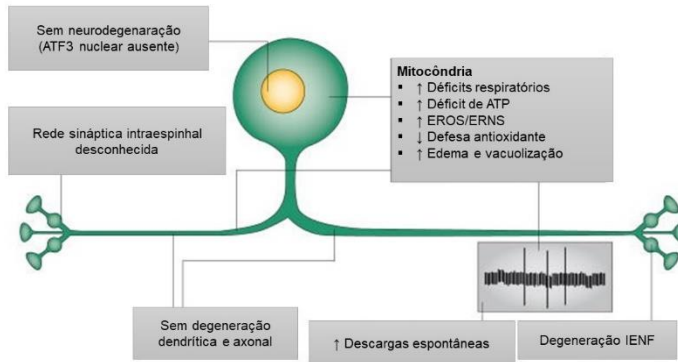
GCH1 catalisa a etapa inicial da via de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4) que é um cofator essencial das hidroxilases de aminoácidos aromáticos, da óxido nítrico sintase (NOS) e da alquilglicerol monooxigenase. BH4 é, assim, um fator indispensável para a síntese de serotonina, epinefrina, noradrenalina, dopamina e óxido nítrico. Este polimorfismo particular de GCH1 está associado a menor dor clínica sem efeitos adversos em SNC ou alteração da nocicepção, sendo, assim, de alto interesse para replicação farmacológica. Em modelos animais com lesão de neurônios sensoriais, houve aumento da transcrição e atividade da GCH1 que ocasionou aumento dos níveis de BH4 com hipersensibilidade a dor. A inibição da enzima GCH1 levou a redução de dor nesses animais (LATREMOLIERE et al., 2015).

### ***3.1.4. Toxicidade mitocondrial na dor neuropática:***

Apesar de diferentes etiologias da dor neuropática, dentre elas, diabetes, infecção pelo HIV e neuropatia induzida por quimioterápicos do tratamento do câncer, os sinais e sintomas clínicos destas neuropatias são claramente similares. Evidências de modelos animais de dor neuropática sugerem que estas similaridades têm um evento comum: a disfunção mitocondrial em neurônios sensoriais aferentes primários. Esta disfunção

das mitocôndrias é causada por efeitos mitotóxicos de agentes quimioterápicos de diversas classes, proteínas virais associadas ao HIV, tratamento do HIV com inibidores da transcriptase reversa bem como o efeito do excesso de glicose no diabetes. O dano mitocondrial resulta em déficit crônico de energia nos neurônios que gera descargas neurais espontâneas e degeneração neuronal compartimental aparente inicialmente em fibras de nervos intraepidérmicos. Dados preliminares sugerem que drogas que previnem esse dano mitocondrial ou melhorem a função das mitocôndrias dos neurônios podem ser úteis no tratamento da dor neuropática destas condições mórbidas (figura 3) (BENNET et al., 2014).

**Figura 3** – Toxicidade mitocondrial na dor neuropática.



A neuropatia não resulta da degeneração do neurônio primário aferente como indicado pela ausência de ATF3 nuclear (marcador de dano axonal). Há disfunção mitocondrial com déficit de ATP, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) que leva a uma degeneração de fibras nervosas intraepidérmicas (IENF) e surgimento de descargas espontâneas.

Fonte: Adaptado de Bennett et al., 2014.

Em modelos animais de dor neuropática induzida por paclitaxel, vincristina ou oxaliplatina, aproximadamente 15% de fibras sensoriais tipo A e 20-35% de fibras sensoriais do tipo C apresentam descargas espontâneas de padrão irregular e baixa frequência, em torno de 1.0 Hz originadas em axônios afetados pela degeneração neural de fibras intraepidérmicas. A deficiência de energia ocasionada pela toxicidade

mitocondrial leva a uma insuficiência da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que pode levar a uma despolarização celular que cruza o limite para o início de um impulso nervoso (XIAO et al., 2012). A toxicidade mitocondrial leva a uma perda de fibras neurais intraepidérmicas, porém não há dano axonal verificado pela ausência da ativação de ATF3, uma proteína nuclear marcadora de lesão axonal, verificado no corpo neuronal no gânglio da raiz dorsal. As fibras neurais intraepidérmicas são particularmente sensíveis aos agentes mitotóxicos, pois concentram um grande número de mitocôndrias. Quando a exposição a agentes tóxicos mitocondriais persiste, a lesão neural progride para o axônio adjacente às fibras neurais intraepidérmicas, agravando a severidade da neuropatia, sendo possível diagnosticar a degeneração axonal através de biópsia de nervo periférico. Essa biópsia pode evidenciar edema e vacuolização de mitocôndrias em nervos sensoriais periféricos, não acometendo neurônios motores das raízes ventrais. O edema e vacuolização de mitocôndrias leva a alterações na membrana interna mitocondrial o que resulta em déficit de produção de ATP, sem ocorrer liberação de citocromo C que é um evento típico de apoptose (ZHENG et al., 2012).

Proteínas virais do HIV como gp120, Tat e Vpr causam danos em grandes fibras mielinizadas aferentes  $\text{A}\beta$  que carregam informações táteis e de propriocepção, ao passo que os inibidores de transcriptase reversa preferentemente causam lesão em pequenas fibras mielinizadas  $\text{A}\delta$  e não mielinizadas tipo C que são responsáveis por estímulos térmicos e álgicos. Há edema e vacuolização de mitocôndrias nos axônios e células de Schwann e também aumento do stress oxidativo. Drogas utilizadas no tratamento do HIV que inibem a transcriptase reversa causam toxicidade mitocondrial no neurônio sensorial primário com alteração de enzimas mitocondriais respiratórias do complexo I (LEHMANN et al., 2011).

Altos níveis de glicose nos pacientes diabéticos são diretamente neurotóxicos. Exposição prologada à hiperglicemia leva a disfunção mitocondrial através de hipóxia secundária à doença microvascular, exposição a níveis elevados de metilglioxal, hiperatividade das vias de polióis e homeostasia alterada do cálcio. Há grave impacto na respiração mitocondrial em modelos animais de diabetes induzidos por estreptozocina, com diminuição consequente da produção de ATP no sistema transportador de elétrons (CHOWDHURY et al., 2013).

Sob condições normais de respiração mitocondrial, um pequeno percentual de elétrons escapa do sistema transportador de elétrons e reage com o oxigênio para formar ânion superóxido que por sua vez gera outras espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila e também espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito. A disfunção mitocondrial que ocorre na neuropatia leva a um aumento do escape de elétrons produzindo maior quantidade de radicais livres de oxigênio e nitrogênio altamente tóxicos para proteínas em vários compartimentos celulares dos neurônios. O tratamento com agentes anti-oxidantes como N-acetilcisteína, glutatona, SS-31 diminuem a incidência e severidade da dor neuropática em pacientes diabéticos ou tratados com agentes quimioterápicos derivados da platina. O peroxinitrito é gerado pela reação equimolar do ânion superóxido com óxido nítrico; assim, a inibição da óxido nítrico sintase (NOS) é um tratamento efetivo para dor neuropática, sendo uma via promissora na prevenção da neuropatia induzida pelo paclitaxel (DOYLE et al., 2012).

### ***3.1.5. Prevenção e tratamento da dor neuropática:***

Devido ao fato dos tratamentos disponíveis para dor neuropática serem de benefício apenas modesto, intervenções que previnem a dor neuropática têm um grande impacto em termos de saúde pública, além de diminuir o grau de incapacidade de muitos pacientes com dor neuropática crônica. Para isto, a identificação de fatores de risco para neuropatia é fundamental. A utilização de vacina para herpes zoster na população acima de 50 anos, tratamento perioperatório adequado de pacientes cirúrgicos e controle rigoroso do diabetes são exemplos dessa estratégia (GEWANDTER et al., 2015).

O tratamento da dor neuropática recai no manejo do sintoma álgico em si, uma vez que a causa da dor raramente pode ser tratada. O tratamento do diabetes mellitus é tipicamente insuficiente para aliviar a dor neuropática. A dor neuropática geralmente não responde a analgésicos como o acetaminofeno, anti-inflamatórios não esteroidais ou opioides fracos como a codeína. A limitada eficácia das drogas para dor neuropática, a população idosa acometida com comorbidades e consequente uso de várias drogas e os efeitos adversos dos opioides tem resultado num aumento de terapias intervencionistas. Drogas com forte recomendação em primeira

linha para o tratamento da dor neuropática periférica e central incluem a pregabalina, gabapentina, duloxetine e antidepressivos tricíclicos. A terapia farmacológica da dor neuropática tem eficácia menor que 50% e está associada a efeitos adversos que limitam seu uso clínico. Os antidepressivos tricíclicos e a duloxetine, um inibidor da reuptake de serotonina e noradrenalina têm atuação em nível de vias inibitórias descendentes. Pregabalina e gabapentina agem diminuindo a sensibilização central por ligarem-se a subunidade  $\alpha 2\delta$  dos canais de cálcio dependentes de voltagem. A combinação da pregabalina ou gabapentina com um antidepressivo ou opioide tem mostrado melhores resultados quando comparado à monoterapia. Os pacientes diabéticos não respondem adequadamente à monoterapia com doses moderadas (FINNERUP et al., 2016a).

A lidocaína age nas descargas neuronais ectópicas através de suas propriedades bloqueadoras dos canais de sódio, podendo ser usada na forma de adesivos transdérmicos como em casos de neuralgia pós-herpética. A capsaicina atua em nociceptores tipo TRPV1 levando a sua dessensibilização e desfuncionalização, também na forma de adesivos usados na neuropatia pós-herpética e diabética. O tramadol, um agonista opioide e inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina também se mostrou efetivo no tratamento da dor neuropática periférica. A toxina botulínica A é uma potente neurotoxina benéfica no tratamento da neuralgia trigeminal. Os opioides como a oxicodona e morfina são moderadamente eficazes com inúmeros efeitos colaterais. Carbamazepina, valproato, oxcarbazepina, topiramato têm efeitos brandos na dor neuropática. Resultados negativos ou inconsistentes em estudos clínicos foram encontrados com a utilização de inibidores da reuptake da serotonina, antagonistas NMDA, mexiletina e clonidina tópica. Antagonistas seletivos dos canais de sódio  $Na_v1.7$  mostraram-se efetivos em estudos clínicos de fase II na neuralgia pós-herpética (COLLOCA et al., 2017).

Endotelinas contribuem para as alterações nociceptivas em modelos animais de dor inflamatória, dor neuropática do diabetes e dor do câncer. Antagonistas dos receptores  $ET_B$  da endotelina como o A-192621 reduziram a hipersensibilidade mecânica em um modelo animal de dor trigeminal neuropática (CHICHORRO et al., 2006).

Tratamentos intervencionistas como bloqueios neurais, procedimentos cirúrgicos que infiltram fármacos em áreas específicas do

SNC e modulação de estruturas neurais oferecem tratamentos alternativos para pacientes selecionados com dor neuropática refratária. Injeção perineural de esteroides confere um alívio transitório da dor por 1-3 meses em casos de trauma ou compressão neuronal. A administração epidural de corticoides no tratamento da radiculopatia cervical e lombar alivia a dor por um período menor que 3 meses e não reduz o risco de cirurgia subsequente. A estimulação elétrica na medula espinhal de baixa intensidade em grandes fibras mielinizadas A $\beta$  para modular os sinais de dor das fibras não mielinizadas C tem sido usada na dor neuropática crônica refratária com resultados duradouros por 24 meses em média. A neuroestimulação de gânglios da raiz dorsal tem resultado em torno de 56% de diminuição da dor neuropática dentre 60% de respondedores. Bombas implantadas no subcutâneo para liberação de morfina intratecal tem sido utilizada, porém ao custo de vários efeitos adversos (ELDABE et al., 2016).

### **3.2 Dor neuropática associada à quimioterapia do câncer:**

A neuropatia periférica induzida por quimioterapia afeta cerca de 48% dos pacientes tratados com esquema de múltiplas drogas e a gravidade desse efeito adverso depende de fatores individuais, dose cumulativa, duração da exposição e estrutura química da droga antineoplásica. Os sintomas principais envolvidos são perda sensorial, parestesias, disestesias, alodinia e hiperalgesia principalmente em mãos e pés. Essa neuropatia é, também, causa de dor persistente em sobreviventes do tratamento oncológico. Há 6 principais grupos de drogas que causam danos em neurônios periféricos sensitivos e motores resultando em neuropatia periférica: derivados da platina (cisplatina, oxaliplatina), alcaloides da vinca (vincristina e vinblastina), epotilonas (ixabepilona), taxanos (paclitaxel, docetaxel), inibidores de proteossomas (bortezomib) e drogas imunomoduladoras (talidomida). O grande sucesso terapêutico alcançado com essas drogas no tratamento do câncer tem aumentado as taxas de sobrevida e conseqüentemente também o número de pacientes com dor neuropática. Cerca de 68% dos pacientes que recebem tais drogas desenvolvem neuropatia periférica no primeiro mês de tratamento, sendo o risco ainda maior em pacientes diabéticos (CARVALHO et al., 2017).

Paclitaxel, oxaliplatina e vincristina têm efeitos tóxicos nos neurônios da raiz do gânglio dorsal (Figura 4). Essas substâncias aumentam

a atividade de canais iônicos dependentes de voltagem ou ligantes como canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ), canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v$ ) e receptores de potencial transitório (TRP). Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) que alteram o funcionamento normal de mitocôndrias com déficit de produção de ATP nos neurônios sensoriais. Apesar de mecanismos patogênicos comuns, a neuropatia induzida por paclitaxel e vincristina envolve um forte componente inflamatório que parece menos intenso na neuropatia induzida pela oxaliplatina. Esse componente inflamatório resulta da ativação da micróglia, astrócitos e células gliais satélites na coluna dorsal da medula espinhal que gera a produção e liberação de mediadores pró-álgicos como fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1 $\beta$ . Uma profunda compreensão do mecanismo fisiopatológico da neuropatia induzida por quimioterapia é necessária para a introdução de tratamentos efetivos baseados em mecanismos e não somente baseados em sintomas. Atualmente não há tratamentos aprovados para a prevenção da neuropatia periférica por quimioterápicos e apenas poucas estratégias farmacológicas existem para o tratamento. Algumas drogas já usadas para o tratamento de outras etiologias de dor neuropática, como amitriptilina e gabapentina, têm falhado na condição de neuropatia por quimioterápicos (SISIGNANO et al., 2014).

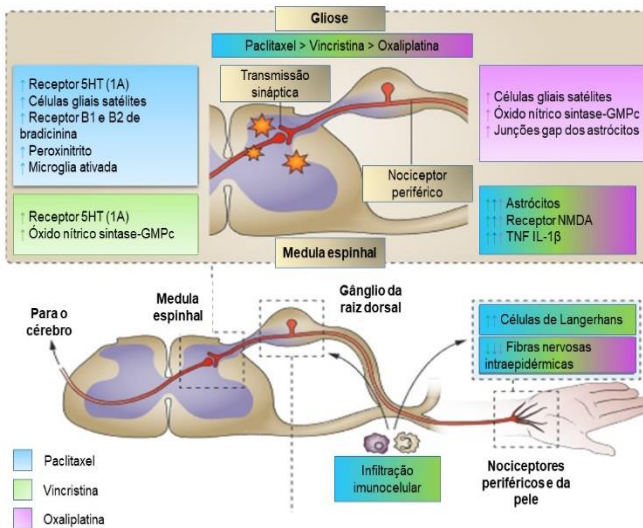
O paclitaxel foi originalmente isolado de um arbusto do pacífico chamado *Taxus brevifolia* e é atualmente usado como um potente antineoplásico. Ele causa uma neuropatia distal sensorial e em alguns pacientes uma síndrome de dor aguda 3 a 4 dias após sua administração. O paclitaxel age como um fator estabilizador da tubulina prevenindo sua despolimeração. Com isso, ele afeta a dinâmica do transporte axonal levando à degeneração de axônios, perda da inervação intraepidérmica, axonopatia e alteração da função mitocondrial (LAPOINTE et al., 2013).

A vincristina é um potente alcaloide citostático que foi originalmente isolado da planta herbácea do Madagascar chamada *Catharanthus roseus*. Do grupo dos alcaloides da vinca, a vincristina tem os mais intensos efeitos neurotóxicos. Como o paclitaxel, a vincristina estabiliza os microtúbulos alterando assim o transporte axonal com consequente axopatia e degeneração de axônios. Há envolvimento de stress oxidativo na fisiopatologia da neurotoxicidade da vincristina. Ativação do

óxido nítrico sintase e da via do guanil monofosfato cíclico (GMPc) fazem parte desse mecanismo pró-nociceptivo (SISIGNANO et al., 2014).

Desde a década de 80 a cisplatina, isolada ou em combinações, é utilizada no tratamento das neoplasias de testículo, ovário, pulmão, cabeça e pescoço, colo uterino, entre outros. Age através da formação de adutos com as cadeias de DNA nuclear sendo uma droga nefrotóxica, ototóxica e neurotóxica. A habilidade da cisplatina em formar ligações cruzadas com o DNA nuclear comprometendo sua integridade e transcrição em RNA mensageiro determina dano da função celular também em nível de neurônios (CAROZZI et al., 2015).

**Figura 4** – Mecanismos de dor neuropática periférica induzida por quimioterapia.



Alterações fisiopatológicas induzidas por paclitaxel (azul), vincristina (verde) e oxaliplatina (rosa). Abreviações: 5-HT, 5-hidroxitriptamina; cGMP, GMP cíclico; NMDA, N-metil-aspartato; TNF, fator de necrose tumoral.

Fonte: Adaptado de Sisignano et al., 2014.

O envolvimento de EROs na neuropatia periférica induzida pela quimioterapia suscita a hipótese de que o tratamento precoce com antioxidantes diminuiria o efeito neurotóxico e danoso dos radicais livres de oxigênio e amenizaria a dor neuropática. A vitamina E (α tocoferol) na dose

de 800 mg ao dia mostrou inicialmente efeitos promissores que não foram posteriormente confirmados. A associação de vitamina C e E foi efetiva no alívio da dor neuropática em camundongos (LU et al., 2011).

Até a atualidade, também não existem dados confirmatórios da eficácia da amifostina e glutathione na neuropatia induzida por derivados platínicos. A acetil-L-carnitina, um anti-oxidante endógeno com funções protetoras mitocondriais falhou em aliviar a neuropatia induzida por taxanos. Um pequeno estudo de fase II mostrou que o mangafodípir, um derivado da vitamina B6, reduziu os sintomas da neuropatia periférica induzida pela oxaliplatina (CORIAT et al., 2014).

O efeito neuroprotetor, anti-inflamatório e antinociceptivo do ômega-3 na dose de 640 mg três vezes ao dia foi associado com significativa melhora da incidência da dor neuropática induzida pelo paclitaxel, no entanto estudos clínicos maiores são necessários para confirmar esses resultados (GHOREISHI et al., 2012).

Infusões de cálcio e magnésio foram utilizadas para repor os cátions divalentes quelados pelo oxalato na neuropatia sensorial induzida pela oxaliplatina. Embora vários estudos clínicos iniciais mostrassem efeitos promissores, um grande estudo randomizado, duplo cego com 353 pacientes não mostrou benefício na utilização do cálcio e magnésio. Assim, conclui-se que atualmente não há recomendação de nenhum agente anti-oxidante ou neuroprotetor no tratamento ou prevenção da neuropatia induzida por quimioterápicos baseados em evidências científicas (LOPRINZI et al., 2014).

A minociclina, um antibiótico com propriedades anti-oxidantes, reduz a síntese de óxido nítrico e a atividade da NADPH oxidase resultando numa diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio. Ela também reduz a gliose na medula espinhal, apresentando assim atividade anti-oxidante e anti-inflamatória com potencial papel na redução da neurotoxicidade da quimioterapia. O tratamento com anti-oxidantes pode afetar o crescimento tumoral e sua progressão. Um recente estudo em camundongos com vitamina E e N-acetilcisteína mostrou aumento da proliferação celular tumoral por reduzir o dano ao DNA e impedir a ativação do gene p53 (SAYIN et al., 2014).

A eficácia de analgésicos opioides na dor neuropática da quimioterapia é incerta. A estimulação de receptores  $\alpha_2$  adrenérgico é

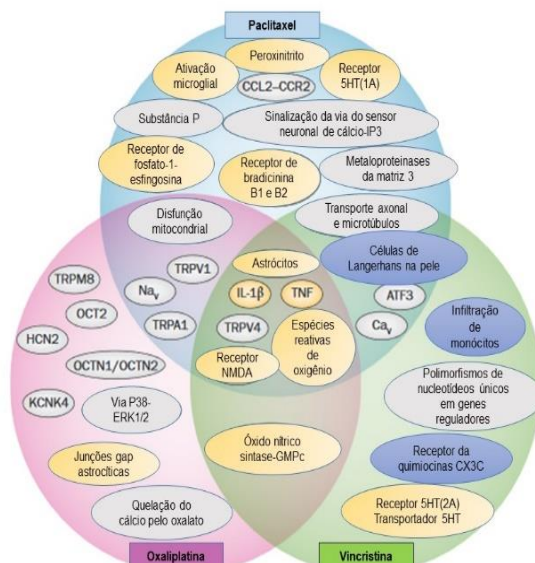
essencial para a redução efetiva da dor. Assim a associação de uma droga que inibe a recaptação da noradrenalina a um opioide é mais efetivo que um opioide clássico isolado. A buprenorfina bloqueia os receptores NMDA o que contribui no controle da neuropatia. Anti-inflamatórios não esteroidais não são recomendados no manejo dessa dor porque eles não diminuem a hiperexcitabilidade neuronal que é um dos mecanismos fisiopatológicos mais importantes na dor neuropática induzida por quimioterápicos. Antagonistas de TRPV1 e bloqueadores dos canais de cálcio também são drogas ativas (WEINER et al., 2012).

A amitriptilina não mostrou diferença significativa no controle da dor quando comparada a placebo na dor neuropática induzida por taxanos, platinas e alcaloides da vinca. Inibidores da recaptação da noradrenalina e serotonina como a venlafaxina e duloxetina reduziram a dor neuropática da quimioterapia, sendo a duloxetina muito ativa em casos de administração da oxaliplatina (SMITH et al., 2013).

A gabapentina e pregabalina, que modulam canais de cálcio, não foram benéficos no controle da neuropatia dolorosa causada por quimioterápicos. Os inibidores de canais de sódio, carbamazepina e oxcarbazepina, falharam no controle da dor neuropática em pequenos estudos clínicos. Adesivos transdérmicos contendo amitriptilina e ketamina não reduziram a dor neuropática dos quimioterápicos num grande estudo clínico envolvendo 462 pacientes (SISIGNANO et al., 2014).

Estratégias farmacológicas para inibir a ativação glial que induz a inflamação neurogênica na fisiopatologia da dor neuropática da quimioterapia têm sido extensivamente estudadas. Uma estratégia promissora é inibir a via p38-MAPK que é responsável pela ativação da micróglia, astrócitos e células gliais ganglionares, bem como pela sensibilização de neurônios nociceptivos (Figura 5). Um pequeno estudo clínico de 43 pacientes mostrou eficácia do inibidor p38-MAPK dimapimod nessa condição dolorosa. O bloqueio do TNF com o anticorpo quimérico monoclonal infliximab é outra via de bloqueio da neuroinflamação a ser avaliada no controle da dor neuropática, bem como o bloqueio do receptor da IL-1 $\beta$  com a anakinra e do receptor da IL-6 com o tocilizumab (ANAND et al., 2011).

**Figura 5** – Mecanismos de dor neuropática periférica induzida por quimioterápicos.

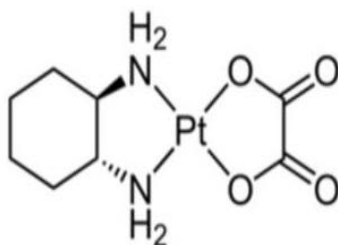


Mecanismos fisiopatológicos distintos e sobrepostos da dor neuropática. Diagrama mostrando fatores relacionados ao nervo periférico (azul), gânglio da raiz dorsal (cinza) e medula espinal (amarelo).

Fonte: Adaptado de Sisignano et al., 2014.

### 3.3 Dor neuropática associada à oxaliplatina:

A oxaliplatina, trans-R,R-ciclohexano-1,2-diamino oxalato-platina, é um agente quimioterápico derivado da platina de terceira geração (Figura 6). A presença do 1,2-diaminociclohexano confere à oxaliplatina uma menor reatividade cruzada com o DNA em comparação com a cisplatina. Apesar da oxaliplatina formar menos ligações platina-DNA, estas são mais efetivas no dano ao DNA e no escape ao sistema de reparo do DNA. A oxaliplatina é efetiva no tratamento de primeira linha do câncer colorretal, tanto no cenário adjuvante como metastático, bem como na terapêutica do câncer gástrico, ovário e vias biliares (CERSOSIMO et al., 2005).

**Figura 6** – Estrutura química da oxaliplatina.

[(1*R*,2*R*)-cyclohexane-1,2-diamine](ethanedioato-*O,O'*)platinum(II.)

Fonte: Dasari et al., 2014.

Sua neurotoxicidade pode ocorrer de duas formas distintas: uma delas é aguda, caracterizada por toxicidade neurosensorial rápida e reversível, que ocorre em mais de 90% de pacientes tratados, imediatamente ou em curto período após a administração da oxaliplatina. O paciente apresenta parestesias e disestesias nas mãos, pés e região perioral, com sensação de compressão mandibular. Esses sintomas são usualmente transitórios, permanecendo por algumas horas, mas podem ser provocados pelo frio e aumentar de intensidade e duração com as administrações repetidas do quimioterápico. A segunda apresentação é uma neuropatia sensorial crônica, que surge após doses cumulativas de 540 mg/m<sup>2</sup> com características semelhantes a neurotoxicidade da cisplatina. Os pacientes apresentam parestesia distal, ataxia sensorial, dor neuropática periférica, comprometimento funcional de membros, dor mandibular e ocular, câimbras em membros inferiores, alterações de voz e visão. A toxicidade da oxaliplatina é dose-dependente, com 10-20% dos pacientes desenvolvendo neurotoxicidade na dose de 750-850 mg/m<sup>2</sup> e em 10% deles os sintomas podem ser persistentes até dois anos após interrupção do tratamento, ou definitivos. A oxaliplatina induz uma alteração aguda na excitabilidade axonal induzida por uma disfunção de canais iônicos de sódio, cálcio e potássio (CAROZZI et al., 2015).

Fatores associados com a incidência, duração e severidade da neuropatia periférica induzida pela oxaliplatina são hipomagnesemia (magnésio sérico inferior a 1,8 mEq/L), aumento dos níveis de cálcio após a quimioterapia, hipoalbuminemia (albumina sérica inferior a 3,5 g/dL), aumento dos níveis de cloreto, hemoglobina inferior a 12 g/dL em mulheres

e 13 g/dL em homens, idade inferior a 60 anos e etilismo. Os mecanismos fisiopatológicos dessas alterações permanecem obscuros (PULVERS et al., 2017).

Apesar de fatores predisponentes da neurotoxicidade da oxaliplatina terem sido identificados, atualmente não há uma estratégia efetiva para a prevenção e o manejo farmacológico é limitado (GRIFFITH et al., 2017).

### **Neurotoxicidade através de canais iônicos.**

Canais de sódio desempenham um papel central na dor induzida pela oxaliplatina. Os bloqueadores dos canais de sódio como a lidocaína e mexiletina aliviam a alodinia desencadeada pelo frio em ratos. A oxaliplatina também diminui a cinética de inativação dos canais de sódio. O oxalato, um dos metabólitos da oxaliplatina, altera propriedades funcionais dos canais de sódio dependentes de voltagem resultando em tempo de abertura prolongada dos canais com conseqüente hiperexcitabilidade de neurônios sensoriais e indução de descargas ectópicas responsáveis pelos sintomas de parestesia e dor. Anormalidades da corrente de sódio são detectadas em 78% dos pacientes que subsequentemente desenvolvem a forma crônica de neuropatia. Polimorfismos no gene SCN2A que codifica os canais iônicos de sódio do tipo II causa uma disfunção basal dos canais de sódio com propensão ao desenvolvimento da neurotoxicidade aguda da oxaliplatina. Especificamente a isoforma  $Na_v1.6$  em fibras A mielinizadas está envolvida na alodinia ao frio induzida pela oxaliplatina através da inibição concomitante de canais de potássio, como demonstrado num experimento animal com injeção intraplantar de oxaliplatina (DEUIS et al., 2013).

Porém, a distribuição difusa de canais  $Na_v1.6$  em axônios sensitivos, motores e no SNC os tornam um alvo de difícil manipulação farmacológica. A isoforma tetrodotoxina-resistente  $Na_v1.8$  em fibras C é crucial na dor provocada por estímulos frios nocivos; também se sugere que os canais  $Na_v1.9$  participem da fisiopatologia da dor neuropática. Mutações com perda de função do canal  $Na_v1.7$  causam uma insensibilidade congênita à dor em humanos. Estudos in vitro com fibras de nervo ciático demonstraram que a oxaliplatina induz alterações funcionais também em

canais de potássio dependentes de voltagem através da diminuição da expressão dos canais do tipo TREK-1 and TRAAK e aumentando a expressão de canais de potássio pró-excitatórios, como canais ativados por hiperpolarização (HCNs). Ibravidina, um inibidor dos canais HCN atenua a hiperalgesia ao frio induzida pela oxaliplatina em estudos com modelos animais (ARGYRIOU et al., 2013).

Canais de potássio TREK-1 e TRAAK são amplamente expressos em aferentes primários incluindo nociceptores sensíveis a estímulos quentes. No entanto, a oxaliplatina não modifica as reações às temperaturas elevadas em modelos animais, indicando um provável tropismo da oxaliplatina para subtipos de neurônios sensoriais ativados pelo frio e por estímulos mecânicos (DESCOEUR et al., 2011).

### **Neurotoxicidade através da sinalização por cálcio.**

O cálcio é um mensageiro intracelular crítico envolvido em várias funções neuronais incluindo sobrevida, morte e plasticidade neuronal. A concentração intracelular de cálcio livre em níveis nanomolares é rigorosamente regulada por mecanismos de transporte e sequestro, incluindo o influxo extracelular e liberação de estoques internos, bem como efluxo por bombas de membrana. Há absorção de cálcio para o retículo endoplasmático e mitocôndrias. As alterações do cálcio intracelular influenciam na excitabilidade da membrana, liberação de neurotransmissores e expressão gênica em células gliais e neuronais. Após 24 horas do tratamento com oxaliplatina os sinais intracelulares mediados por cálcio são significativamente alterados (SCHULZE et al., 2011).

O oxalato, um metabólito da oxaliplatina, é um conhecido agente quelante do cálcio, o que contribui para a neurotoxicidade deste quimioterápico. Injeção de oxalato na pata de camundongos induz alodinia mecânica. A dor induzida pelo oxalato é consequência da quelação do cálcio extracelular que leva a um aumento da condutância do sódio e diminuição do limiar de potencial da membrana plasmática. Ao contrário, o aumento do cálcio extracelular aumenta a possibilidade de fechamento dos canais de sódio resultando no decréscimo da excitabilidade neuronal (STAROBOVA et al., 2017).

### **Neurotoxicidade através de receptores de potencial transitório (TRP).**

O tratamento com oxaliplatina resulta na superexpressão de RNA mensageiro do TRPV1 e TRPA1, bem como TRPM8. A alodinia ao frio induzida pela oxaliplatina aumenta a sensibilidade e expressão de TRPM8 e TRPA1. A administração em camundongos de capsazepina, um bloqueador de TRPV1 e TRPM8, inibiu a alodinia ao frio. A administração de 5-iodoresiniferatoxina, um inibidor de TRPV1 não alterou a alodinia produzida pelo frio (GAUCHAN et al., 2009).

Os gânglios da raiz dorsal estão localizados entre a coluna dorsal da medula espinhal e os nervos espinhais e convergem as informações sensoriais da periferia para o sistema nervoso central. Como nesses gânglios não há uma barreira neurovascular efetiva, moléculas com alto peso molecular podem difundir-se através desse tecido, predispondo os neurônios dos gânglios da raiz dorsal a danos celulares e indução do aumento da expressão de RNA mensageiro de TRPA1, TRPM8 e TRPV1 (CAROZZI et al., 2015).

Em modelos animais de dor neuropática induzida por oxaliplatina, mostrou-se que este quimioterápico ocasiona um acúmulo de alumínio nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal, sendo esse fator um potencializador da neuropatia da oxaliplatina, uma vez que o alumínio por si só é um agente neurotóxico. O alumínio pode causar ruptura de microtúbulos, hiperforforilação de neurofilamentos, inibição de enzimas antioxidantes e aumento da apoptose e necrose celular. A administração de alumínio num grupo de animais tratados com oxaliplatina aumentou os níveis de expressão de TRPA1 quando comparado ao grupo que recebeu somente oxaliplatina. Assim, o acúmulo de alumínio no corpo pode exacerbar o efeito neurotóxico da oxaliplatina e agentes quelantes de alumínio poderiam reverter esses efeitos sinérgicos entre essas duas substâncias (PARK et al., 2015).

A ativação de TRPA1 por ERO e metabólitos de drogas platinantes contribui para a hipersensibilidade mecânica e ao frio. Não parece haver uma ativação direta de metabólitos da oxaliplatina em receptores TRPM8, porém, eles participam da neurotoxicidade estimulado pelo frio da oxaliplatina como demonstrado na análise de animais com depleção gênica para o receptor TRPM8. Alguns estudos também evidenciaram o envolvimento de TRPV1 na hiperalgesia ou alodinia provocada pela oxaliplatina (ZHAO et al, 2012).

### **Papel do estresse oxidativo.**

Várias linhas de evidência sugerem a relação entre a neurotoxicidade da oxaliplatina e o estresse oxidativo, e que é corroborado pelo fato de que vários agentes antioxidantes demonstraram redução nos sintomas neuropáticos em modelos pré-clínicos e na prática clínica.

A deficiência no equilíbrio oxidativo está estreitamente relacionado com a dor neuropática. No entanto, o exato mecanismo de produção de EROs após tratamento com a oxaliplatina permanece pouco compreendido. Como a oxaliplatina não possui propriedades oxidativas diretas, é através de uma desregulação do balanço oxidativo mediado pela célula neuronal que este quimioterápico causa sua neurotoxicidade. TRPA1 é um sensor tanto de stress oxidativo como do frio e está implicado na hipersensibilidade ao frio através de eventos do estresse oxidativo. O papel de TRPA1 como um sensor eletrofílico e de componentes reativos como os gerados no metabolismo oxidativo em locais de dano tissular e inflamação está solidamente estabelecido. A oxaliplatina se acumula principalmente em fígado, rins e neurônios do gânglio da raiz dorsal (CAROZZI et al., 2015).

O estresse oxidativo mitocondrial com lipoperoxidação, formação de carbonil-proteínas e de radicais hidroxila pela reação de Fenton pode comprometer a integridade do parênquima hepático. Produtos gerados no estresse oxidativo após exposição à oxaliplatina ativam TRPA1, produzem respostas nociceptivas e inflamação neurogênica. Acetil-L-carnitina, ácido  $\alpha$  lipoico e vitamina C inibiram a hiperalgesia da oxaliplatina em ratos. As espécies reativas de oxigênio também modulam os canais iônicos de sódio influenciando a sensibilidade dos nociceptores. A oxaliplatina também produz efeitos deletérios nas mitocôndrias dos axônios ocasionando uma alteração no transporte de elétrons na sua membrana e diminuição da produção de energia nos neurônios do gânglio da raiz dorsal. Esse efeito danoso em mitocôndrias inicia a geração de espécies reativas de oxigênio com potencial efeito tóxico celular (TABASSUM et al., 2015).

O aumento patológico das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após uso da oxaliplatina causam alteração de biomoléculas intracelulares como enzimas, proteínas e lipídios que pode levar à desmielinização, desestruturação do citoesqueleto neuronal e sensibilização de processos de transdução do sinal de neurônios. As espécies reativas de oxigênio também ativam vias de apoptose e aumentam a produção de

mediadores pró-inflamatórios. A oxaliplatina forma ligações cruzadas com o DNA mitocondrial que não podem ser reparados, pois as mitocôndrias não expressam sistemas de reparo. Essa ligação DNA-platina impede a replicação mitocondrial e sua transcrição com consequentes erros funcionais na cadeia respiratória (CANTA et al., 2015).

A curcumina, um composto polifenólico isolado da *Curcuma longa* e a quercitina, um flavonoide polifenólico presente em plantas modula a disfunção mitocondrial induzida pela oxaliplatina em ratos. O efeito antioxidante e anti-nociceptivo destes flavonoides também é verificado nos testes comportamentais de diminuição da hipersensibilidade mecânica e ao frio, bem como na diminuição da expressão do fator de transcrição nuclear c-Fos em neurônios da coluna dorsal da medula espinal. A coloração imunohistoquímica para c-Fos tem sido um marcador útil para indicação de neuroplasticidade e dor neuropática (WASEEM, et al. 2016).

Duas organelas intracelulares, mitocôndrias e peroxissomos, cooperam na manutenção do estado oxidativo celular. Apesar da relação entre as alterações mitocondriais provocadas pela quimioterapia e a neuropatia estar bem estabelecida, o papel dos peroxissomos neste contexto é pouco explorado. Os peroxissomos são organelas intracelulares fortemente implicadas no metabolismo oxidativo. A descoberta da colocalização de catalase com oxidases que geram peróxido de hidrogênio nos peroxissomos foi a primeira indicação da sua participação no metabolismo de espécies reativas de oxigênio. O alto consumo peroxissomal de O<sub>2</sub>, a demonstração da produção de peróxido de hidrogênio, superóxido, radicais hidroxila e óxido nítrico, bem como a descoberta de várias enzimas que metabolizam essas substâncias nos peroxissomos tornou essa organela uma peça fundamental na produção e metabolismo de EROs nas células. No sistema nervoso a importância dessas organelas é evidenciada através de doenças genéticas com desordens de peroxissomos levando a desmielinização, degeneração axonal e neuroinflamação. A ativação de receptor nuclear PPAR $\gamma$  aumenta a expressão e atividade da catalase que transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio no interior dos peroxissomos. Recentemente agonistas do receptor PPAR $\gamma$  demonstraram ser potenciais agentes terapêuticos em uma ampla variedade de doenças

neurológicas como doenças neurodegenerativas, traumas neurais, acidentes vasculares cerebrais e doenças desmielinizantes (LOURENÇO et al., 2013).

Zanardelli et al. estudaram o envolvimento peroxissomal na neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina *in vivo* e *in vitro*. Em cultura de astrócitos de ratos, a oxaliplatina aumentou o número de peroxissomos, contudo a expressão e funcionalidade da catalase, a enzima antioxidante mais importante em mamíferos, estava significativamente reduzida. A incubação das células por 5 dias com o antagonista G3335 do receptor PPAR $\gamma$  induziu uma alteração similar nos peroxissomos, sugerindo uma relação entre a sinalização PPAR $\gamma$  e a neurotoxicidade da oxaliplatina. O agonista PPAR $\gamma$  rosiglitazona reduziu os efeitos danosos tanto da oxaliplatina como do G3335. Em modelos animais de dor neuropática da oxaliplatina com ratos, a rosiglitazona amenizou a dor provocada por estímulo mecânico e pelo frio. A rosiglitazona não alterou a morte celular induzida pela oxaliplatina em cultura de células de câncer de cólon HT-29. Esses experimentos destacam o papel dos peroxissomos no dano neuronal provocado pela oxaliplatina e sugerem a estimulação da via PPAR $\gamma$  como potencial candidata a contrapor-se à neurotoxicidade da oxaliplatina (ZANARDELLI et al., 2014).

A oxaliplatina e também o paclitaxel causam um dano funcional em mitocôndrias de nervo periféricos que leva ao escape de elétrons da membrana mitocondrial e conseqüente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. SS-31 é um antioxidante dirigido às mitocôndrias que tem demonstrado atividade neuroprotetora numa variedade de doenças que envolvem disfunção mitocondrial. Administração concomitante de SS-31 com oxaliplatina reduziu a hipersensibilidade ao frio, alodinia mecânica e perda de fibras nervosas intraepidérmicas em modelos animais, mas não reduziu esses achados uma vez já estabelecidos. O mecanismo de neuroproteção do SS-31 é através da diminuição da produção de EROs nas mitocôndrias. A neuropatia aguda da oxaliplatina com a produção de EROs mitocondrial afeta diretamente receptores de potencial transitório e canais iônicos de sódio e potássio dependentes de voltagem podendo ser reversível. Já a geração contínua de EROs na dor neuropática crônica induzida pela oxaliplatina leva a alterações estruturais neuronais que não podem ser mais reversíveis com medidas que atenuem a produção destas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas mitocôndrias (TOYAMA et al., 2014).

### **Envolvimento de caspases, MAP-quinases e proteína quinase C.**

A oxaliplatina induz a apoptose neuronal através de caspases e por ativação de proteínas da via MAP-quinases (MAPK), como p38 e ERK1/2. A restauração da atividade fisiológica da via das MAPK com fator de crescimento neurotrófico (NGF) e ácido retinoico mostrou-se neuroprotetora contra a neurotoxicidade da oxaliplatina. Observou-se também uma redução da hiperalgesia mecânica em animais tratados de maneira concomitante com oxaliplatina e calfofostina, um inibidor da proteína quinase C (PKC) (SCUTERI et al., 2010).

A ativação da PKC pela oxaliplatina induz a um aumento da sensação dolorosa através de TRPA1. Este quimioterápico também induz alodinia mecânica através do aumento de isoformas específicas da PKC e sua fosforilação no tálamo e área periqueductal cerebral. A oxaliplatina ainda induz apoptose neuronal pela fosforilação das quinases ativadas por sinal extracelular (ERK1/2 – MEK) em gânglios da raiz dorsal. A ativação de ERK1/2 na medula espinhal foi observada na presença de hiperalgesia e alodinia. Estes achados sugerem que uma parte da fisiopatologia da neuropatia da oxaliplatina é mediada pela PKC e ativação de ERK1/2 no cérebro e medula espinhal. Tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio, mostrou-se efetivo em reduzir a neuropatia induzida pela oxaliplatina através da inibição da via PKC/MEK/cFos em modelos com camundongos. Também em modelos animais o inibidor de MEK PD0325901 suprimiu a dor neuropática da oxaliplatina e potencializou o efeito anti-tumoral deste quimioterápico (TSUBAKI et al., 2015).

### **Transportadores de drogas transmembrana e receptor dopaminérgico na neurotoxicidade da oxaliplatina.**

O transporte da oxaliplatina para dentro das células dos neurônios sensoriais é realizado através dos transportadores de cobre tipo 1 (CTR1/2) e ATP7A e B bem como de transportadores orgânicos de cátions (OCTs). Neurônios expressando altos níveis de CTR1 facilitam o influxo de oxaliplatina para dentro das células neuronais gerando o efeito tóxico do quimioterápico. A função adequada de OCT2 é necessária para a toxicidade

aguda da oxalipaltina e contitui-se de um regulador inicial do acúmulo de platina nos neurônios (SPROWL et al., 2013).

O composto levo-tetrahidropalmatine (L-THP) foi isolado da planta *Corydalis yanhusuo* usada na medicina tradicional chinesa como analgésico com propriedades sedativas e hipnóticas por mais de 40 anos. Em camundongos tratados com oxaliplatina a L-THP demonstrou um efeito anti-hiperalgésico mecânico primariamente mediado pelo receptor D1 da dopamina, pois a injeção de um antagonista seletivo do receptor D1 (SCH23390) bloqueou significativamente o efeito antinociceptivo do L-THP (GUO et al., 2014).

### **Envolvimento das células gliais.**

Células gliais da medula espinhal contribuem para o desenvolvimento de dor crônica em várias condições como cirurgia, inflamação e dano neuronal. O tratamento farmacológico que evita a ativação glial, como a minociclina e fluorocitrato, reduz a dor neuropática. A oxaliplatina, mediante o stress oxidativo, aumenta o número de micrógliia e astrócitos na coluna dorsal da medula espinhal com diminuição do limiar de dor. A oxalipaltina também aumenta o número de canais intercelulares nos astrócitos favorecendo sua ativação. A administração de carbenoxolona, que inibe a formação dos canais intercelulares dos astrócitos, diminui a hipersensibilidade mecânica induzida pela oxaliplatina e a ativação dos astrócitos. A neuropatia induzida pela oxaliplatina causa um aumento da densidade glial com limitadas alterações morfológicas (neurônios multinucleados e nucléolos excêntricos) no sistema nervoso central (YOON et al., 2013).

### **Envolvimento do receptor 2 ativado por proteinase (PAR2).**

E um modelo animal de neuropatia periférica induzida por oxaliplatina em ratos verificou-se que a injeção intratecal de um antagonista PAR2, FSLLRY-NH<sub>2</sub>, e um antagonista TRPV1, i-RTX, diminuíram a hiperalgesia mecânica e ao frio desses animais. A expressão de PAR2 e TRPV1 também estava aumentada no corno posterior da medula espinhal de ratos que receberam a oxaliplatina quando comparados com controles. FSLLRY-NH<sub>2</sub> diminuiu a expressão de TRPV1 e hipersensibilidade ao frio,

porém esses efeitos não foram observados com a injeção intratecal de i-RXT (CHEN et al., 2015).

Os níveis de substância P e CGRP, dois importantes neurotransmissores envolvidos na dor neuropática, estavam significativamente aumentados no corno dorsal da medula espinhal de ratos que receberam oxaliplatina e a injeção intratecal de FSLLRY-NH2 e i-RXT inibiu esse aumento. FSLLRY-NH2 teve um efeito maior nos níveis de substância P e CGRP do que i-RXT. Assim, a injeção de oxaliplatina aumenta a expressão das proteínas PAR2 e TRPV1 no corpo posterior da medula espinhal bem como a liberação de substância P e CGRP. Sugere-se que TRPV1 e TRPA1 seja uma via de sinalização para PAR2 exercer sua regulação sobre a dor neuropática induzida pela oxaliplatina. A substância P e CGRP são neurotransmissores excitatórios e neuromoduladores que são liberados no corno dorsal da medula espinhal pelos aferentes sensoriais primários contribuindo para o desenvolvimento da alodinia e hiperalgesia através da facilitação da liberação de glutamato e aspartato pelos aferentes sensoriais (CHEN et al., 2015).

### **Envolvimento de receptores da serotonina e noradrenalina.**

Vários estudos demonstraram que a serotonina desempenha um importante papel no controle da transmissão nociceptiva. Esta monoamina aumenta e reduz respostas nociceptivas dependendo do local do sistema nervoso, tipo celular e subtipo de receptor que é ativado. A subunidade de receptor 5-HT<sub>2C</sub> está envolvida na modulação da dor neuropática e plasticidade neuronal em modelos animais. Pacientes com dor neuropática que experimentam controle da sua dor com escitalopram, um inibidor seletivo da recaptção da serotonina, apresentam polimorfismo nos genes que codificam o receptor 5-HT<sub>2C</sub> confirmando o envolvimento do receptor da serotonina neste contexto clínico. Foi demonstrado que antidepressivos inibidores da recaptção da serotonina diminuem a hiperalgesia mecânica e hipersensibilidade ao frio induzida pela oxaliplatina. O tratamento com oxaliplatina aumenta o nível de RNA mensageiro do receptor 5-HT<sub>2C</sub> e seu nível de expressão proteica na medula espinhal e substância cinzenta periaquedutal o que é bloqueado pelo uso de drogas antidepressivas como fluoxetina e citalopram (SOUZA et al., 2014).

A fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) isolada do veneno de abelhas apresentou efeito analgésico na alodinia provocada pelo frio e por estímulos mecânicos em camundongos tratados com oxaliplatina. Neste modelo animal, a depleção de noradrenalina bloqueou o efeito analgésico da PLA<sub>2</sub>, indicando a participação noradrenérgica da via inibitória descendente no mecanismo de ação da PLA<sub>2</sub>. O efeito da PLA<sub>2</sub> foi bloqueado por antagonistas  $\alpha 2$  e não  $\alpha 1$ , caracterizando assim a via noradrenérgica  $\alpha 2$  como alvo do mecanismo de ação da PLA<sub>2</sub> do veneno de abelhas na alodinia a frio e mecânica induzida pela oxaliplatina (LI et al., 2015).

### **Envolvimento do receptor purinérgico P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> e citocinas pró-inflamatórias.**

Múltiplos subtipos de receptores purinérgicos como P<sub>2</sub>X<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> e P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> estão envolvidos em vias dolorosas tanto como iniciadores como moduladores. São receptores ionotrópicos ativados por ATP mediando influxo celular de cálcio e sódio bem como liberação de citocinas pró-inflamatórias de células do sistema imune. O P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> está assim envolvido em doenças inflamatórias degenerativas, dor neuropática e inflamatória. Em camundongos tratados com oxaliplatina, esta droga induz stress oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em neurônios resultando em perda do potencial transmembrana das mitocôndrias e ativação do receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> resultado em morte neuronal e dor neuropática crônica (MASSICOT et al., 2013).

A exposição do sistema nervoso central e periférico à oxaliplatina induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF e IL-6 que participam da fisiopatologia da dor neuropática. A liberação de IL-1 $\beta$  é apenas discretamente aumentada neste contexto. Os macrófagos infiltrados no tecido tumoral também são alvo da toxicidade da oxaliplatina com produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio sendo assim também envolvidos na fisiopatologia da dor neuropática deste quimioterápico. Esses macrófagos têm aumento da atividade enzimática COX-2 com consequente maior produção de prostaglandina E<sub>2</sub> que estimula nociceptores e aumenta liberação de citocinas contribuindo assim para a gênese da dor neuropática. A estimulação do receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> durante o stress oxidativo causa a ativação da caspase-1 que em seguida cliva pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$  e também aumenta a expressão de COX-2 (ECHEVERRY et al., 2011).

### **Envolvimento dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato).**

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório na medula espinhal e os receptores NMDA estão envolvidos na dor neuropática. A subunidade NR2B do receptor NMDA localiza-se no corno dorsal superficial da medula espinhal com envolvimento na transmissão da dor e papel importante na dor neuropática. A NOS é uma enzima da cascata de transdução da via NMDA, contribuindo para a incidência da dor neuropática. Em modelos animais com administração repetitiva de oxaliplatina, há um aumento da expressão da proteína e RNAm de NR2B na medula espinhal culminando com alodinia mecânica. Antagonistas do receptor NMDA e seletivos para NR2B revertem completamente o efeito neurotóxico da oxaliplatina. A injeção intratecal de L-NAME, um inibidor inespecífico de NOS inibiu o comportamento doloroso em animais que receberam oxaliplatina. O aumento da expressão de NOS neuronal está nitidamente relacionado com o advento da alodinia mecânica induzida pela oxaliplatina. Tanto o comportamento doloroso como a atividade da NOS são revertidos pela injeção intratecal de um antagonista seletivo (Ro25-6981) para o subtipo NR2B do receptor NMDA. A ativação do receptor NMDA aumenta a liberação de glutamato através da atividade da NOS, criando um circuito de amplificação da transmissão do sinal doloroso (MIHARA et al., 2011).

### **Envolvimento do fator de crescimento neural (NGF) e substância P.**

Estudos experimentais implicam o gânglio da raiz dorsal como um alvo importante da neurotoxicidade da oxaliplatina. O fator de crescimento neural (NGF) é um fator neurotrófico que mantém funções neuronais, promove sobrevivência neuronal e serve de mediador da dor neuropática. A expressão de NGF está significativamente aumentada no gânglio da raiz dorsal após injeção intraperitoneal de oxaliplatina e está relacionada com hiperalgesia mecânica. A substância P, um neuropeptídeo liberado na lâmina superficial do corno posterior da medula espinhal está envolvido na transmissão do estímulo nocivo com sensibilização de nociceptores, hiperalgesia e alodinia. Estudos imunohistoquímicos de camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal revelam aumento da

imunorreatividade da substância P após uma única injeção intraperitoneal de oxaliplatina. A terapia com laser de baixa intensidade mostrou-se eficaz em modular a expressão de TRPM8, NGF e substância P em ratos que receberam oxaliplatina (HSIEH et al., 2015).

### **Envolvimento de receptores opióides.**

Agonistas de receptores opioides  $\mu$ , como a morfina, oxycodona e fentanil, são prescritos para o controle da dor de moderada a severa intensidade, tendo perfis analgésicos diferentes em situações clínicas diversas. Os agonistas opioides  $\mu$  geralmente ativam a proteína Gi/o seguido de múltiplas vias de sinalização como inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem, ativação de canais de potássio dependentes de voltagem e ativação de canais de potássio corretores de fluxo de internalização (GIRK). Dentre esses, a via GIRK é importante no mecanismo antinociceptivo. Estudos clínicos recentes mostraram que a oxycodona é efetiva no tratamento da alodinia mecânica induzida pela oxaliplatina, enquanto a antinocicepção do fentanil é incompleta. Inibidores dos canais GIRK, como o tertiapinQ, bloquearam o efeito analgésico da morfina e oxycodona em ratos submetidos ao tratamento com oxaliplatina. Sendo assim, a ativação dos canais GIRK é fundamental para o efeito analgésico dos agonistas opioides na neuropatia induzida pela oxaliplatina. O efeito antinociceptivo da morfina é mediado primariamente a nível espinhal enquanto da oxycodona é supraespinhal provavelmente devido a diferentes padrões de ativação da proteína G. A morfina inibe neurônios da via dorsal ascendente através da ativação de canais GIRK, já a oxycodona ativa as vias descendentes em modelos animais de neurotoxicidade da oxaliplatina. O efeito analgésico incompleto do fentanil na dor neuropática da oxaliplatina pode ser explicado pela ativação de outro subtipo de proteína G, como Gq e também por ocasionar maior internalização de receptores  $\mu$  em comparação com morfina e oxycodona (KANBARA et al., 2014).

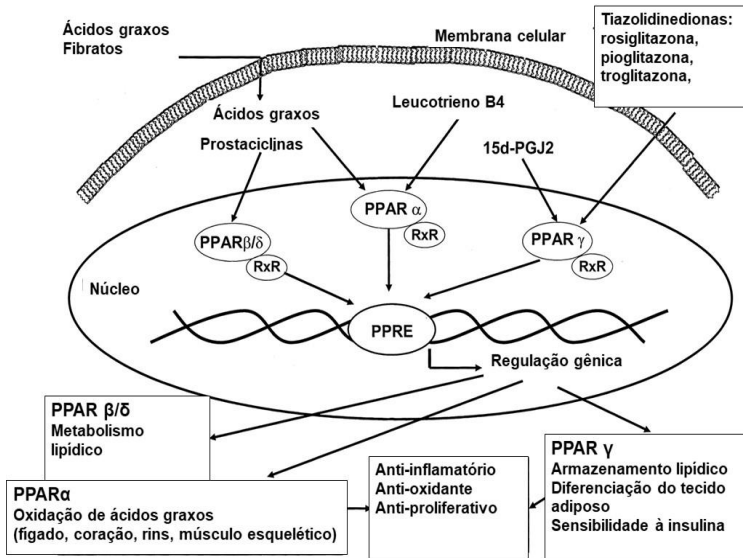
### 3.4 Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARS):

No campo da biologia molecular, os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos são receptores nucleares proteicos que funcionam como fatores de transcrição na regulação da expressão de genes. PPARs desempenham um papel importante na regulação da diferenciação celular, metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas bem como na gênese de tumores em organismos superiores (Figura 7). PPARs interferem na expressão de proteínas e vias de transdução de sinais como Raf e  $PI_3K$  que têm efeitos proliferativos, angiogênicos e de desdiferenciação celular tornando-os um alvo promissor no bloqueio da carcinogênese (ASATI et al., 2014).

PPARs são classificados de acordo com a estrutura molecular em três tipos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ . PPAR $\alpha$ , o primeiro a ser identificado, é principalmente expressado em tecidos com alta taxa de beta-oxidação como fígado, rins, coração e músculos. PPAR $\gamma$ , por sua vez, é expressado em alto nível no tecido adiposo. Todas as isoformas de PPAR necessitam de heterodimerização com o receptor retinoide X (RXR) para uma efetiva ligação com o DNA e posterior atividade de transcrição. O complexo PPAR/RXR liga-se a uma região específica do DNA chamada de elemento de resposta de proliferação de peroxissomos (PPREs) regulando a transcrição de genes específicos (ASATI et al., 2014).

PPARs também estão envolvidos na função e biogênese mitocondrial. A quantidade e atividade das mitocôndrias são controladas por fatores de transcrição, dentre eles o PGC1 $\alpha$  que é o cofator 1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  abundantemente expresso em tecidos que demandam alta energia. Induzido por exposição ao frio, jejum e atividade física, PGC1 $\alpha$  regula o metabolismo oxidativo mitocondrial ativando genes envolvidos no ciclo do ácido tricarbóxico, beta-oxidação de ácidos graxos, fosforilação oxidativa bem como biogênese mitocondrial (FAN et al., 2015).

**Figura 7** – Ativação de PPAR e efeitos biológicos



Esquema mostrando a ativação de PPAR como heterodímero com o receptor retinoico (RXR), e sua ligação ao elemento de resposta do PPAR (PPRE). Efeitos metabólicos clássicos de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  são apontados.

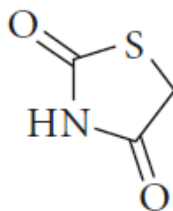
Adaptado de Schiffrin et al., 2003.

PPARs são ativados por ácidos graxos da dieta e eicosanoides gerando diferentes ações fisiológicas. PPAR $\gamma$  é uma molécula importante para a diferenciação de adipócitos sendo extensamente expresso nesse tecido. PPAR $\gamma$  também é expresso em células tumorais podendo inibir sua proliferação quando ativado por ligantes de alta afinidade provavelmente através da interação com inibidores das quinases ciclina-dependentes. Assim, as TZDs também possuem efeitos anti-neoplásicos como indução do apoptose, inibição da progressão do ciclo celular e diferenciação (GORNIAK et al., 2014). Foi demonstrado, *in vitro*, que a pioglitazona ativou funcionalmente PPAR $\gamma$  em três linhagens celulares de carcinoma cervical relacionado ao vírus do papiloma humano (HPV), reduzindo sua taxa de proliferação (WUERTZ et al., 2017).

### 3.4.1 Glitazonas:

Glitazonas, também chamadas de tiazolidinedionas (TZDs), são substâncias químicas com um anel heterocíclico derivadas da tiazolidina introduzidas no final dos anos 1990 para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Seu mecanismo de ação ocorre através da ativação de receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) com máxima especificidade para PPAR $\gamma$ , regulando os genes que controlam a homeostase da glicose e o metabolismo dos lipídeos. As TZDs consistem de anéis de tiazolidina de 5 membros com grupos carbonil nas posições 2 e 4 e dois heteroátomos que são o nitrogênio e enxofre (figura 8). Várias substituições podem ocorrer nas posições 3 e 5 porém as substituições na posição 2 ocasionam as maiores modificações estruturais e funcionais das glitazonas. Devido a sua natureza diversa e pleiotrópica, as TZDs têm uma grande variedade de atividades farmacológicas que incluem: anti-hiperglicemiante, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, inibição da alfa-glicosidase, antineoplásica, anti-inflamatória, inibição de ciclooxigenase, anti-hiperlipidemiante, neuroproteção, entre outras (NAIM et al., 2017).

**Figura 8** – Estrutura química do anel tiazolidinediona.

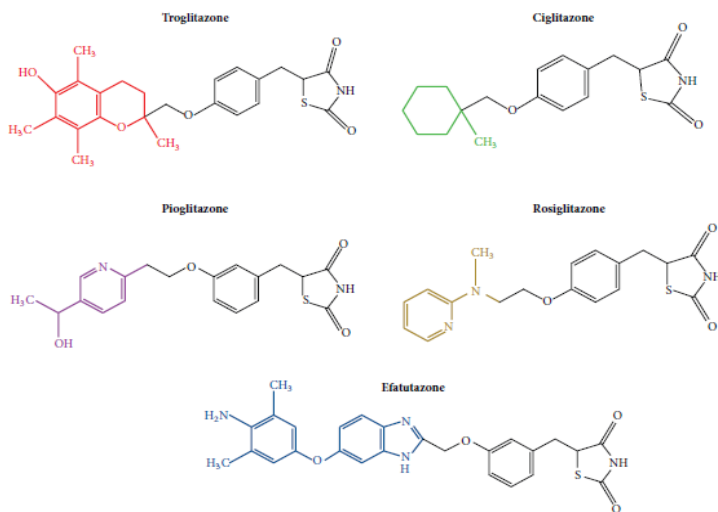


Fonte: Adaptado de Thangavel et al., 2017.

Devido à ampla ação farmacológica, as glitazonas são alvo de intensa pesquisa com intuito de torná-las mais seguras e com melhor potencial terapêutico. As TZDs diferem entre si de acordo com a substituição no carbono 5 (figura 9). Ciclitazona é o protótipo de todas as glitazonas, porém, nunca foi aprovada para o uso em diabetes mellitus devido a sua fraca atividade clínica. A troglitazona foi a primeira TZD aprovada como anti-diabético em 1997, demonstrando efeitos na redução

dos níveis de glicose, sensibilidade aumentada à insulina e diminuição da concentração de ácidos graxos livres, porém foi retirada do mercado devido à hepatotoxicidade. A rosiglitazona teve seu uso suspenso na Europa devido ao aumento da morbidade cardiovascular. A pioglitazona, a terceira glitazona com efeito hipoglicemiante, tem seu uso restrito devido ao aumento da incidência de câncer de bexiga. A quarta substância, rivoglitazona, ainda encontra-se em investigação clínica. A toxicidade das glitazonas ocorre devido a ação pleiotrópica desses agonistas PPAR $\gamma$  e ativação cruzada de outras vias de sinalização celular. Além do tratamento do diabetes mellitus, as glitazonas têm sido exploradas no tratamento do câncer devido a sua ação na proliferação celular, uma vez que existe um aumento da expressão dos receptores PPAR $\gamma$  nos tecidos neoplásicos (FROHLICH et al., 2015).

**Figura 9** – Fórmulas químicas das TZDs mais comuns.



Fonte: Frohlich et al., 2015.

Estudos com células de linhagem humana demonstraram que as glitazonas regulam mediadores de sinalização celular dependentes de PPAR, como p21, p27, ciclina B, ciclina D1, ciclina E, quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), CDK4, caderina-E, claudina-4, metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) regulando assim a invasão celular e inibição da

progressão do ciclo celular. As TZD também induzem apoptose através da estimulação de fatores apoptóticos como p53, PTEN e Bax e inibindo fatores anti-apoptóticos como Bcl-2/Bcl-x e survivina, bem como atuam na regulação da produção de espécies reativas de oxigênio num modo PPAR dependente e independente. Ainda através de ativação PPAR $\gamma$ , as glitazonas regulam a função de várias enzimas e receptores, entre eles, aldose redutase, fosfoinositol-3-quinase (PI<sub>3</sub>K), MAPK, COX-2, fator de crescimento relacionado à insulina tipo 1 (IGF-1) e histona deacetilase (AMREEN et al., 2015).

### ***3.4.2 Envolvimento de glitazonas, peroxissomos e PPARs na dor neuropática:***

Peroxissomos tem funções protetoras sobre as células glias contra o efeito danoso do peróxido de hidrogênio nos neurônios. Alterações de peroxissomos resultam em lesões do sistema nervoso. Em cultura primária de astrócitos o antagonista de PPAR $\gamma$  GW9662 diminuiu a atividade da catalase, a mais importante enzima antioxidante nos peroxissomos. G3335, um antagonista reversível de PPAR $\gamma$  reduz tanto a atividade como a expressão da catalase, sendo esse efeito abolido pela rosiglitazona. Este antagonista também reduz a atividade da glutatona redutase. Pressupõe-se, assim, que agonistas de PPAR $\gamma$  tenham efeito neuroprotetor em desordens neurodegenerativas através do aumento da produção de catalase (MANELLI et al., 2014).

O peróxido de hidrogênio é descrito como uma espécie reativa de oxigênio, no entanto, ele não possui elétrons não pareados. Ele é formado pela reação de dismutação do ânion superóxido. Apesar de peróxido de hidrogênio não ser por si só deletério, sua conversão através da reação de Fenton catalisada por íons metais gera o radical hidroxila, provavelmente o mais reativo e tóxico radical livre de oxigênio. A catalase é uma enzima peroxissomal que contém um anel heme e que produz a quebra de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água constituindo uma importante defesa antioxidante. O alto consumo de oxigênio pelos peroxissomos, bem como a demonstração de produção de peróxido de hidrogênio, superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico e a descoberta de várias enzimas que metabolizam esses radicais dá suporte à importância dos peroxissomos como uma

organela responsável tanto pela produção como metabolização de espécies reativas de oxigênio na célula. O peróxido de hidrogênio consegue se difundir pela membrana do peroxissomo, deixando assim a organela e causando lesão de outros componentes celulares. Peroxissomos e mitocôndrias são ligados física e metabolicamente, tanto que um distúrbio do metabolismo peroxissomal ativa eventos sinalizadores para o incremento do stress mitocondrial (SCHRADER et al., 2006).

Doenças genéticas classificadas como desordens da biogênese de peroxissomos e deficiências isoladas de enzimas peroxissomais implicam em severa desmielinização, degeneração axonal e neuroinflamação que resulta numa variedade de anormalidades neurológicas o que dá base ao uso de agonista PPAR $\gamma$  como as glitazonas no tratamento destas condições nosológicas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington e danos isquêmicos (MANELLI et al., 2014).

Eventos que induzem dano neuronal ativam células gliais na medula espinhal que expressam uma variedade de receptores para neurotransmissores e neuromoduladores. Essas células também produzem e liberam numerosas moléculas sinalizadoras que contribuem para a sensibilização central e dor crônica. Agonistas PPAR $\gamma$  reduzem a ativação glial *in vitro* e *in vivo* no cérebro e na medula espinhal levando assim à redução da dor (NAIM et al., 2017).

Morgenweck et al. (2013) mostraram em modelo animal de lesão neuronal isolada que a administração prévia oral ou intraperitoneal de pioglitazona diminuiu os sinais comportamentais de hipersensibilidade mecânica e ao frio. Este efeito também foi observado quando a glitazona foi administrada somente após a indução da lesão neuronal (MORGENWECK et al., 2013). Num outro modelo animal com ligação parcial do nervo ciático, a administração prévia de rosiglitazona atenuou o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica (TAKAHASHI et al., 2011).

Portanto a administração de glitazonas pode evitar o desenvolvimento da dor neuropática bem como atenuar a dor já estabelecida. A diminuição da hipersensibilidade após lesão neuronal perdurou por 1 semana após o término da injeção de pioglitazona; como a meia vida desta glitazona é de 8-9 horas, infere-se que esse efeito é associado a ativação do receptor PPAR $\gamma$  com subsequente função de fator de transcrição. Foi demonstrado também que a injeção do antagonista

PPAR $\gamma$  GW9662 aboliu o efeito sobre a alodinia e hipersensibilidade da pioglitazona no modelo animal de lesão neuronal. No cenário de lesão neuronal, o aumento da expressão de ERK na medula espinhal emerge como um robusto marcador de sensibilização neuronal. Mostrou-se que a pioglitazona reduz a expressão de ERK após lesão neuronal isolada em ratos. A imunorreatividade para PPAR $\gamma$  também é expressa na micróglia e a pioglitazona diminui a ativação microglial evidenciado através da diminuição de expressão de p38 e CD11b que são marcadores de ativação da micróglia espinhal. A ativação de astrócitos contribui para a manutenção da hiperalgesia após dano neuronal e PPAR $\gamma$  é expresso nestas células a nível cerebral e espinhal. A pioglitazona diminui a atividade dos astrócitos no contexto de dano neural verificado através da diminuição da imunorreatividade para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Não houve desenvolvimento de tolerância analgésica durante a administração prolongada da pioglitazona, o que difere de analgésicos opioides (MORGENWECK et al., 2013).

Também em um modelo animal com ratos submetidos a transecção de ramos tibiais e fibulares do nervo ciático e que receberam injeção intratecal de rosiglitazona, foi observado uma diminuição da hipersensibilidade mecânica e ao frio. A administração concomitante de BADGE, um antagonista PPAR $\gamma$  reverteu o efeito da rosiglitazona indicando um efeito mediado por este receptor. A redução da dor neuropática foi observada já durante os primeiros 60 minutos após administração da glitazona, o que sugere a ocorrência de fenômenos não genômicos como parte da ação da TZD no efeito antiálgico. Foi detectado nesses animais níveis de RNAm para PPAR $\gamma$  na medula espinhal, 1-12 vezes menor que o nível no fígado e baço. No entanto, similar ao nível cerebral. A proteína PPAR $\gamma$ , com aproximadamente 67 kD foi detectada na medula espinhal. Em animais sem lesão neuronal, a rosiglitazona não alterou a coordenação motora, limiar de von Frey ou limiar de retirada ao estímulo térmico. Concluiu-se que drogas que tenham como alvo PPAR $\gamma$  na medula espinhal constituem um importante arsenal no manejo da dor neuropática (CHURI et al., 2008).

Griggs et al. (2016) realizaram um experimento utilizando ratos Zucker obesos e diabéticos e comparam com um grupo controle de raros Zucker magros. Os ratos obesos apresentaram glicemias elevadas, aumento

do nível de hemoglobina A1c, hiperinsulinemia, hiperalgesia mecânica e térmica na pata posterior e aumento da expressão de ERK na região lombar da medula espinhal. Quando submetidos ao tratamento por 7 semanas com pioglitazona 30 mg/kg/dia na ração, houve redução da glicemia, da hemoglobina A1c, da hiperalgesia, bem como dos níveis de expressão de ERK. Devido ao fato da pioglitazona oferecer um efeito combinado na redução da hiperglicemia, hiperalgesia e sensibilização central, esta droga representa uma atrativa opção terapêutica no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 e dor neuropática associada. A normalização dos níveis glicêmicos não pode, por si só, reverter os efeitos neurotóxicos da hiperglicemia prolongada que contribui para a neuropatia periférica (GRIGGS et al., 2016).

Além da redução da dor neuropática através da atuação da TZD em nível de sensibilização central, vários estudos demonstram que as glitazonas podem atuar inibindo mecanismos periféricos de dor neuropática crônica. Sabe-se que o receptor PPAR $\gamma$  é expresso no nervo ciático. Por sua vez as TZDs são capazes de diminuir a hiperalgesia, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a infiltração macrofágica no nervo ciático após lesão neuronal. A pioglitazona reduz a infiltração de macrófagos e a expressão de ERK fosforilado no nervo ciático em modelos de rato com diabetes induzido por estreptozocina. A co-administração de rosiglitazona e resorvina D1 no sítio de incisão na pata posterior de camundongos diabéticos reduz a hiperalgesia mecânica e induz a promoção de um fenótipo M2 dos macrófagos. A pioglitazona reduz o comportamento álgico também em animais normoglicêmicos. Novas TZDs ou terapias relacionadas devem surgir para contrapor os riscos do uso da pioglitazona em humanos, principalmente o câncer de bexiga (SAITO et al., 2015).

A falha das medidas terapêuticas atuais em tratar a dor neuropática causada pela quimioterapia reflete a falta de conhecimento sobre as bases biomoleculares desta neuropatia. Já foi previamente identificado em modelos de dor neuropática induzida pela oxaliplatina em ratos que a disfunção do sistema oxidativo está relacionada com o dano ao sistema nervoso e surgimento de dor neuropática. Como a oxaliplatina não possui efeitos oxidativos diretos, o stress oxidativo é devido a uma alteração celular no metabolismo das espécies reativas de oxigênio. Após tratamento com a oxaliplatina, as mitocôndrias sofrem modificações morfológicas e funcionais (ZANARDELLI et al., 2014)

Menos evidente nesse processo tóxico da oxaliplatina é o papel dos peroxissomos, que são também importantes no metabolismo oxidativo celular, juntamente com cooperação das mitocôndrias. Em culturas com astrócitos a exposição à oxaliplatina houve aumento no número de peroxissomos nestas células, pois eles são capazes de responder a mudanças fisiológicas que ocorrem nas células podendo adaptar-se em termos de número, morfologia, conteúdo enzimático e funções metabólicas. A oxaliplatina reduz os níveis de catalase nos astrócitos em cultura que são menos susceptíveis ao dano oxidativo do que os neurônios. Em modelos animais de dor neuropática induzida pela oxaliplatina também ocorre redução dos níveis de catalase nos gânglios da raiz dorsal e medula espinhal. Estes dados sugerem a participação dos peroxissomos no stress oxidativo provocado pela oxaliplatina tanto em astrócitos em meio de cultura como no tecido nervoso de animais neuropáticos (RIBEIRO et al., 2012).

A alteração da catalase induzida pela oxaliplatina, em termos de atividade e expressão, é comparada a provocada pelo bloqueio farmacológico com o antagonista seletivo e reversível de PPAR $\gamma$  G3335. O PPAR $\gamma$  é expresso tanto em neurônios como em células da glia e sua estimulação os protege contra o dano oxidativo associado ao aumento da atividade enzimática da catalase. A oxaliplatina tem um efeito direto na maquinaria peroxissomal. A rosiglitazona reduz a falha enzimática da catalase provocada tanto pela oxaliplatina como pelo G3335, bem como normaliza o número de peroxissomos. A manutenção das propriedades defensivas da catalase pela rosiglitazona leva a um controle da dor neuropática. Pequenas doses de rosiglitazona são necessárias para o efeito anti-neuropático. No entanto, a cardiotoxicidade da rosiglitazona impediram seu emprego clínico, sendo retirada do mercado nos EUA e Europa. É importante enfatizar que não há interação dos agonistas PPAR $\gamma$  com o efeito letal da oxaliplatina em células HT-29 de câncer de cólon humano. Assim, a neurotoxicidade da oxaliplatina altera a funcionalidade dos peroxissomos, sendo esse fenômeno bloqueado pelos agonistas PPAR $\gamma$  com consequente controle da dor neuropática, mesmo com a utilização de baixas doses de glitazonas (ZANARDELLI et al., 2014).

### 3.4.3 Glitazona em estudo:

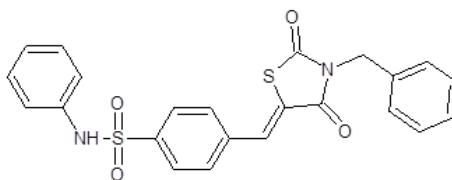
Recentemente foi demonstrado o efeito protetor e terapêutico da via de sinalização PPAR na neurotoxicidade da oxaliplatina. Deste modo, o desenvolvimento de novas tiazolidinedionas-agonistas PPAR com propriedades analgésicas na dor neuropática induzida pela oxaliplatina tem grande potencial (ZANARDELLI et al., 2014).

Obstáculos na descoberta de novos fármacos incluem a identificação de compostos agonistas PPAR bioativos com boa biodisponibilidade oral, com baixa toxicidade e grande efeito antinociceptivo. As TZDs podem diferir entre si pela quantidade e qualidade de substituintes.

Moreira et al. (2017) sintetizaram 15 novas TZDs utilizando sua estrutura heterocíclica como grupo farmacofórico principal e utilizando vários substituintes. O potencial analgésico destes compostos foi analisado num modelo com camundongos submetido à injeção de oxaliplatina e avaliação da hipersensibilidade mecânica pelo teste de von Frey. A estrutura molecular da TZD utilizada sem substituintes mostrou baixa atividade antinociceptiva. Quando foram adicionados substituintes apolares não houve melhora da atividade analgésica dos compostos. Pequeno incremento no efeito foi evidenciado com a adição de um grupo fenil. A adição de grupos polares como hidroxil ou nitro na estrutura da TZD aumentou a atividade analgésica em modelos de hipersensibilidade mecânica em 48%. A adição de halogênios como o flúor, mas não o cloro, também levou à melhora da antinocicepção. Uma significativa melhora na atividade analgésica da TZD foi constatada quando dois substituintes foram adicionados como grupos 3,4-dimetoxi, 3,4, dihidroxil e 3-metoxi-4-hidroxi (MOREIRA et al., 2017).

O composto em estudo é o *N*-fenilbenzossulfonamida-4-[(*Z*)-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil], com peso molecular de 450,530 Da, foi sintetizado no laboratório de síntese orgânica da UNIVALI (figura 10).

**Figura 10** – Estrutura química da *N*-fenilbenzossulfonamida-4-[(*Z*)-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]





## MATERIAL E MÉTODOS

### 4. Fármacos e reagentes

Nos experimentos deste estudo foram utilizados: oxaliplatina (Libbs – SP), GW9662 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), pioglitazona (Abbott do Brasil – SP), sulfassalazina (Apsen-SP), tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF), albumina de soro bovino (BSA), salina tamponada com fosfato (PBS), cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato dissódico, fosfato monopotássico, ácido sulfúrico, aprotinina, hyamina, Tween 80 (Merck, Germany), streptavidina-HRP, água miliQ, tampão Tris HCL, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

### 4.2 Animais

Camundongos C57BL/6 machos foram acondicionados em ambiente com ciclos de 12 horas de luz, 12 horas de escuridão. Os camundongos tiveram livre acesso à alimentação e água durante os experimentos. Cada grupo de estudo foi constituído de 6-10 animais para assegurar a reprodutibilidade do experimento bem como diminuir as possibilidades de falsos positivos e negativos. Os experimentos foram conduzidos de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA/ Brasília 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e liberação sob CEUA 043/15p. Os experimentos foram realizados no período de 8 a 17 h. Os animais foram mantidos na sala de cuidados do laboratório de farmacologia (209, bloco F6) em caixas de 20 cm x 30 cm com no máximo 6 animais. Os camundongos passaram por um período de ambientação de 7 dias no biotério do laboratório de farmacologia experimental, bem como foram ambientados por 30 minutos na sala de experimentação. Os animais que foram submetidos a processos cirúrgicos, receberam como anestésico quetamina 5% e xilazina 2% (0,01 mL/g). Para os experimentos bioquímicos, foi utilizado o método de decapitação para o sacrifício dos animais, pois este método conhecido como *ex-vivo* é o método que menos altera a bioquímica neuronal. O Comitê de Ética no Uso de

Animais (CEUA) aprovou todos os procedimentos experimentais sob o parecer 043/15p.

### **4.3 Rota de síntese da glitazona E1**

O composto utilizado para os ensaios farmacológicos e comportamentais neste trabalho foi *N*-fenilbenzossulfonamida-4-[(*Z*)-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil] ( figura 8 ). Este composto foi sintetizado a partir da adição de 0,180 g da glitazona *N*-fenilbenzossulfonamida-4-[(*Z*)-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil] a 0,068 g de cloreto de benzila, a 0,075 g de carbonato de potássio e a 1 mL de dimetilformamida num balão de 25mL. A reação foi realizada por microondas numa temperatura de 70 °C e potência de 300 W por 6 horas. O produto da reação foi então vertido em água/gelo e filtrado a vácuo com rendimento de 64%. Conforme resultado da cromatografia em camada delgada, não foi necessária purificação. A síntese foir realizada pela doutoranda Elaine Cristina Kormann.

### **4.4 Testes Comportamentais:**

Os testes comportamentais representam os diferentes componentes sensoriais da dor neuropática e foram conduzidos antes (avaliação basal) e após a administração de oxaliplatina e substâncias experimentais. Os animais foram habituados uma semana antes do início dos experimentos. Cada grupo experimental constará de 6-10 camundongos machos Black – C57BL/6.

### **Sensibilidade ao Frio**

A sensibilidade ao frio foi mensurada através do teste plantar ao frio. Os camundongos foram colocados numa caixa plástica transparente (12 x 8 x 6 cm) com fundo de vidro temperado transparente de 6 mm e habituados por 2,5-3 horas antes do experimento. Foi confeccionado um probe com uma seringa de 5 ml contendo gelo seco triturado, sendo retirada sua extremidade superior que entrará em contato com a superfície de vidro gerando o frio necessário para o experimento. A coluna de gelo seco que sai da extremidade superior da seringa toca o vidro na região da pata posterior

direita dos camundongos e o tempo de latência para a retirada da pata será aferida com um cronômetro. A latência para retirada é definida como qualquer movimento da pata na placa de vidro em sentido horizontal ou vertical. O tempo máximo permitido para a retirada foi de 20 segundos para evitar lesão tecidual pelo frio. Um intervalo de 15 minutos é realizado entre as 3 aferições no mesmo animal (BRENNER et al., 2012).

### **Sensibilidade mecânica**

A sensibilidade mecânica foi mensurada pelo teste de von Frey. Os camundongos foram colocados numa caixa plástica transparente (12 x 8 x 6 cm) com fundo de malha de arame e habituados por 30 minutos antes do experimento. Um filamento de von Frey de 0,4 g toca na pele da região médio-plantar em cada pata por 10 vezes, com cada aplicação perdurando por 3 segundos. O número de respostas de retiradas das patas ao filamento de von Frey foi contado e daí expresso em porcentagem de resposta global. Logo em seguida foi determinado o limiar de dor em gramas utilizando os filamentos de von Frey (JOSEPH et al., 2009).

### **Sensibilidade ao estímulo quente**

A hipersensibilidade térmica ao calor foi testada através do aparato plantar de Hargreaves. Os animais foram condicionados numa caixa plástica transparente e um estímulo térmico com intensidade de energia de 38 unidades foi aplicado na pata traseira direita. O tempo para retirada da pata foi aferido por um cronômetro conectado ao próprio aparato, sendo um tempo máximo definido como 30 segundos. As aferições foram realizadas por 3 vezes em cada animal dos grupos (MCNAMEE et al., 2011).

### **Atividade locomotora**

Com o objetivo de verificar alterações na atividade locomotora dos camundongos tratados com a glitazona E1, realizou-se o teste de campo aberto numa arena circular de acrílico de 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com um piso dividido em 12 quadrantes. O número de cruzamentos

realizados com as quatro patas foi quantificado durante uma sessão de 6 minutos (ZIMCIKOVA et al., 2017).

#### **4.5 Administração de oxaliplatina e GW9662:**

Neurotoxicidade aguda: oxaliplatina (Libbs – SP) foi diluída em solução de glicose a 5% para uma concentração de 0,6 mg/mL e foi injetada por via intraperitoneal na dose de 6 mg/kg (LI et al., 2015). O grupo controle receberá o mesmo volume de 20 microlitros de glicose 5% pela mesma via de administração.

O GW9662 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), um antagonista seletivo do receptor PPAR $\gamma$ , foi administrado em camundongos na dose de 1 mg/kg por via intraperitoneal após diluição com soro fisiológico numa concentração de 0,1 mg/mL no experimento de dor aguda induzida pela oxaliplatina (MORGENWECK et al., 2013).

Neurotoxicidade crônica: oxaliplatina (Libbs – SP) foi diluída em solução de glicose a 5% para uma concentração de 0,35 mg/ml e foi injetada por via intraperitoneal na dose de 3,5 mg/kg duas vezes por semana por um período de 4 semanas com 3-4 dias de intervalo entre as doses. Usando a fórmula de Du Bois's para calcular a superfície corporal humana, essa dose é equivalente a 130 mg/m<sup>2</sup> por administração e a uma dose acumulada de 1080 mg/m<sup>2</sup> após 8 ciclos (RENN et al., 2011).

#### **4.6 Administração do composto E1, pioglitazona e sulfassalazina**

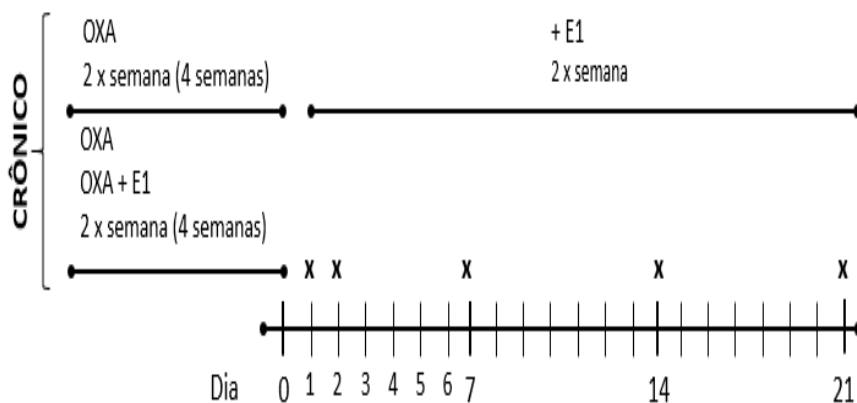
A glitazona E1 foi administrada nas doses de 0,01 – 0,1 e 1 mg/kg, diluída em soro fisiológico e injetada por via intraperitoneal concomitante com a administração de 6 mg/kg de oxaliplatina durante o experimento de hipersensibilidade aguda do quimioterápico ao frio para obtenção de uma curva dose-resposta. As drogas foram injetadas em lados opostos do abdome.

Nos demais experimentos de toxicidade aguda, a dosagem da glitazona E1 foi estabelecida em 1 mg/kg pela via intraperitoneal. Utilizou-se uma solução-mãe de glitazona E1 de 1 mg/mL diluído em soro fisiológico.

A sulfassalazina 500 mg (Apsen – SP) e a pioglitazona 30 mg (Abbott do Brasil SP) foram trituradas e diluídas com soro fisiológico para

uma concentração final de 1 mg/mL e foram injetadas por via intraperitoneal ambas na dosagem de 10 mg/kg em dose única concomitante com a oxaliplatina 6mg/kg no experimento de toxicidade aguda do quimioterápico.

No experimento de hipersensibilidade crônica à oxaliplatina, a glitazona E1 foi injetada na dose de 1 mg/kg i.p. concomitante à oxaliplatina 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana num total de 8 doses. Um segundo grupo de animais recebeu oxaliplatina 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana num total de 8 doses e somente após a oitava dose começaram a receber a glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. duas vezes por semana num total de 6 doses. Os testes comportamentais foram realizados 24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a oitava dose de oxaliplatina, conforme esquema ilustrado abaixo.



X - avaliação da hipersensibilidade

#### 4.7 Análise dos níveis de interleucina 1 $\beta$ e TNF:

Amostras de medula espinhal, nervo ciático, córtex cerebral, tálamo, hipotálamo, hipocampo e pata foram coletados dos camundongos do experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina. Essas amostras foram estocadas a -80 °C. Os tecidos foram homogeneizados em PBS contendo NaCl 0,4 M, PMSF 0,1 M, EDTA 10 mM, 0,05% de tween 20, 0,5% de BSA e 2 mg/mL de aprotinina. Os homogenatos foram centrifugados a 3000 g por 10 minutos a 4 °C. Os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF foram aferidos através de Kit ELISA de acordo com as recomendações do fabricante (R&D systems – Minneapolis USA). Os experimentos foram realizados em triplicada e repetidos por duas vezes.

#### 4.8 Determinação da atividade da catalase:

Amostras de pata, nervo ciático, medula espinhal, fígado e córtex cerebral são homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 200 mM com pH 6,5 que consta de 26,5 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M e 73,5 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M. Estas amostras foram obtidas de camundongos do experimento de hipersensibilidade crônica da oxaliplatina.

As amostras foram preparadas em placas de microtitulação com 96 poços com 10  $\mu$ L da amostra tecidual e 140  $\mu$ L da solução mix que consta de 2,5mL de tampão Tris-EDTA, pH 8 (Tris 1 mM e EDTA 5 mM), 47,4 mL de água mili-Q e 172,5 microlitros de água oxigenada. A placa é então lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm para determinação da absorbância de 1, 3 e 6 minutos de intervalo segundo método de Beutler (OGNJANOVIC et al., 2012).

A atividade da catalase é determinada em unidades/grama de tecido através do cálculo:

$$A = \frac{\Delta \text{ABS}/\text{min} \times \text{diluição} \times \text{volume da amostra}}{\epsilon \times T_e}$$

Onde:

A = atividade da catalase em Unidades por grama de tecido

$\Delta$ ABS = variação da absorbância em 1 minuto

T<sub>e</sub> = tecido, em grama, na amostra

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar de 0,071 nM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

#### **4.9 Determinação sérica de parâmetros bioquímicos, citotoxicidade e atividade da luciferase:**

Amostras de sangue foram obtidas dos animais do experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina a partir dos vasos axilares. As amostras de sangue foram centrifugadas para separação do soro que foi então congelado a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A análise bioquímica da glicose, creatinina, AST, ALT, colesterol total e triglicerídeos foi realizada no LEAC (Laboratório Escola de Análises Clínicas) da Universidade do Vale do Itajaí. Parâmetros bioquímicos de camudongos C56BL/6 naive são: glicose  $185 \pm 15\text{ mg/dL}$ ; colesterol  $89 \pm 9\text{ mg/dL}$ ; triglicerídeos  $100 \pm 10\text{ mg/dL}$ ; AST  $67,95 \pm 31,7\text{ U/L}$ ; ALT  $51,05 \pm 26,7\text{ U/L}$ ; creatinina  $0,15 \pm 0,02\text{ mg/dL}$  (SANTOS et al., 2016 e ZHON et al., 2004).

Os experimentos de citotoxicidade em células HeLa e 3T3-L1, de adipogênese em células 3T3-L1 e atividade da luciferase do gene repórter GAL4PPAR $\gamma$  em células HeLa foi realizado em colaboração com o Dr. Francisco de Assis Rocha Neves do Laboratório de Farmacologia Molecular do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Nos ensaios de citotoxicidade, células HeLa e 3T3-L1 foram tratadas com veículo (DMSO) ou com concentrações crescentes do ligante E1 (de  $10^{-11}$  até  $10^{-4}\text{ M}$ ). Após 24 hs, as células foram incubadas com MTT, sendo os dados apresentados como porcentagem de células viáveis. Resultado de dois experimentos independentes realizados em replicatas de 8.

Nos ensaios de adipogênese, células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina  $167\text{ nM}$ , dexametasona  $1\text{ }\mu\text{M}$  e isobutilmetilxantina  $0,5\text{ mM}$  e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona  $10^{-7}\text{ M}$  (agonista total de PPAR $\gamma$ ), GQ-16  $10^{-5}\text{ M}$  (agonista parcial de PPAR $\gamma$ ) ou com a glitazona E1 (de  $10^{-6}$  até  $10^{-4}\text{ M}$ ) por 48 horas. A seguir, as células foram mantidas em meio de cultura com insulina  $167\text{ nM}$  e tratadas a cada 48 horas. No 15 $^{\circ}$  dia de diferenciação, as células foram fixadas, coradas com óleo vermelho O (reagente que pigmenta os triglicerídeos de vermelho) e fotodocumentadas (registro de uma área de  $9,5\text{ cm}^2$ , e aumentos microscópicos de 5 e 10 vezes). Este resultado se reproduziu em, pelo menos, dois experimentos independentes. As células

foram diferenciadas por 48 ou 72 horas como descrito anteriormente e coletadas para avaliação da expressão do gene *Fabp4* (*Fatty acid binding protein* - marcador específico de adipócitos) por PCR quantitativa em tempo real. Os dados foram expressos como níveis de transcritos dos ligantes em relação ao veículo DMSO (MILTON et al., 2017).

Nos ensaios de transativação, células HeLa foram co-transfectadas com o plasmídeo contendo a sequência que codifica o receptor nuclear quimérico constituído pelo domínio ligante de PPAR $\gamma$  fusionado ao domínio ligante de DNA do fator de transcrição de leveduras GAL4, e com o plasmídeo GAL4-Luciferase, que possui o elemento responsivo do GAL4 fusionado ao gene repórter da luciferase. As transfecções foram realizadas usando o reagente de transfecção FuGENE<sup>®</sup> HD (Promega). As células foram tratadas com o veículo (DMSO), rosiglitazona  $10^{-5}$  M e concentrações crescentes do ligante E1. Um kit do ensaio do gene repórter da luciferase (Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System – Promega) foi utilizado para medir a atividade da luciferase de acordo com as instruções do fabricante, com um luminômetro. Cada experimento foi realizado em triplicata e o resultado comparado com o veículo onde \*  $p < 0,01$  (SANTIN et al., 2013).

#### 4.10 Quantificação de BH4

As amostras de urina foram precipitadas pela adição de um volume de ácido metafosfórico 5%, contendo ditioeritritol 6,5 mM (DTE). As amostras foram centrifugadas a  $16.000 \times g$  durante 10 min a 4 °C. As concentrações de BH4 presentes no sobrenadante foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à detecção eletroquímica. Vinte microlitros foram injetados no sistema de HPLC. A análise foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa *Waters Atlantis dC-18* 5 $\mu$ m (4,6 x 250 mm), com um fluxo de 0,70 mL/min e uma eluição isocrática de fosfato de sódio 90 mM, ácido cítrico 50 mM, sódio 1-heptano sulfonato 2,5 mM, ácido etilenodiaminotetracético 50  $\mu$ M, cloreto de sódio 200 mM, 5% de acetonitrila, pH 3,0. A temperatura da coluna foi ajustada a 35 °C. A quantificação de BH4 foram realizadas por um detector eletroquímico (modulo 2465, Waters, Milford, USA) com uma voltagem de +450 mV. Os resultados foram expressos em  $\mu$ mol/mol creatinina. As concentrações de creatinina presentes na urina foram determinadas usando um kit comercial (Pointe Scientific Inc., Canton, Michigan, Estados Unidos)

e seguindo as recomendações técnicas do fabricante (LATREMOLIERE et al., 2015). Esta análise laboratorial foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Alexandra Latini no Laboratório de Bio Energética e Estresse Oxidativo da UFSC.

#### **4.11 Análise Histopatológica**

Foram analisados rim, fígado e coração dos grupos de camundongos do experimento de hipersensibilidade aguda à oxaliplatina. As vísceras foram fixadas em formalina, que foi substituída por solução de formaldeído a 10% tamponado e mantidas durante 10 dias até o dia da análise macroscópica e preparo para as amostras em inclusão de parafina.

Os rins foram seccionados no plano coronal, de forma a estudar todas as suas áreas (cortical e medular), além de permitir a visualização macro e microscópica dos cálices, mucosa calicial e pelve renal. De cada rim, a duas metades foram utilizadas para inclusão em parafina e depois blocadas lado a lado, registradas como amostras naive, oxaliplatina, oxaliplatina + E1, oxaliplatina + E1 + GW9662. Para cada animal foi confeccionada uma lâmina contendo cinco cortes histológicos e separados entre si por 9 micrômetros de espessura.

Os corações foram seccioandos no plano coronal de forma a permitir a análise das paredes atriais, ventriculares e dos septos inter-atrial e inter-ventricular. As amostras foram preparadas de forma semelhante à descrita para os rins.

Os fígados foram seccioandos no plano sagital. De cada fígado foi retirado um fragmento de cada lobo e foram processados para a inclusão em parafina, blocados lado a lado. Foi então confeccionada uma lâmina contendo 5 cortes histológicos separados entre si por 9 micrômetros de espessura. As amostras foram preparadas de forma semelhante à descrita para os rins.

A análise das amostras foi realizada individualmente por dois médicos patologistas em dois microscópios Nikon, modelos Eclipse E200, com oculares CFI 10X/20 e cinco objetivas planacromáticas de 4, 10, 40 e 100X. A histopatologia foi realizada no CITOPREVE Consultoria em Patologia na cidade de Jaraguá do Sul/SC sob responsabilidade do Dr. Antônio Carlos Scaramello.

Foram prioritariamente buscadas alterações gerais como infiltrados inflamatórios, sinais de isquemia miocárdica, necrose de fibras musculares cardíacas, fibrose portal, dilatação sinusoidal, peliose, necrose e esteatose hepáticas, alterações glomerulares, necrose e hemorragia tubular renal.

#### **4.12 Análise estatística**

Os resultados dos experimentos foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As porcentagens de inibição foram citadas como a média  $\pm$  o erro padrão da média da diferença entre as áreas sob as curvas obtidas para cada experimento individual em relação ao grupo controle correspondente.

Para cálculo da AUC das figuras x, y e z, todos os valores obtidos foram subtraídos de um valor arbitrário, de modo que as curvas ficassem de maneira invertida.

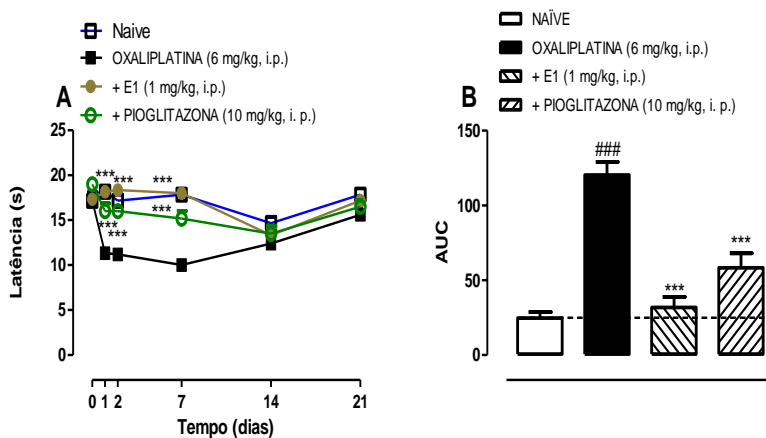
A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias com pós-testes de Bonferroni e Newman-Keuls. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad PRISM®.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito do composto E1 e pioglitazona na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina:

No experimento de hipersensibilidade ao frio induzido pela oxaliplatina, este quimioterápico reduziu significativamente o tempo de latência ao estímulo térmico, sendo esse efeito revertido pela administração concomitante da glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. como mostrado na figura 11. O percentual de inibição da glitazona foi de  $87,3 \pm 8,1\%$ . A pioglitazona administrada na dose de 10 mg/kg i.p. também reverteu o efeito da oxaliplatina com percentual de inibição de  $74 \pm 7,8\%$ . O efeito inibitório do composto E1 e da pioglitazona sobre a hipersensibilidade ao frio da oxaliplatina persistiu até o décimo quarto dia do experimento.

**Figura 11** – Efeito sistêmico do composto E1 e pioglitazona na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina.



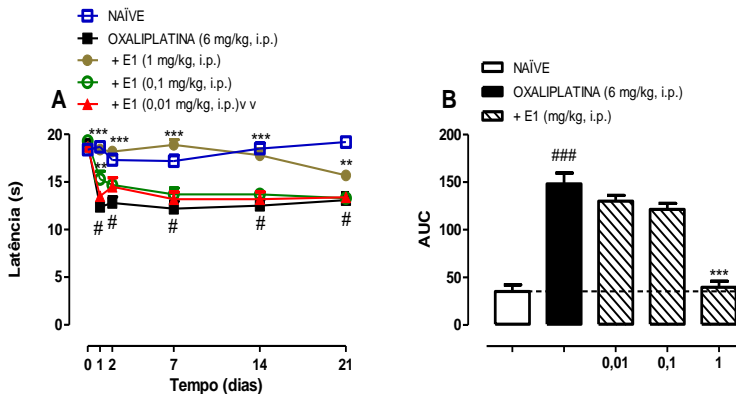
Tempo de latência para retirada de pata direita traseira em segundos nos 4 grupos de 10 camundongos (A). AUC calculada até o vigésimo primeiro dia do experimento (B). Os grupos foram constituídos de naive, tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p., tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg, i.p. concomitante com

a glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. e tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p. concomitante com pioglitazona na dose de 10 mg/kg, i.p., todos no primeiro dia do experimento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via seguida de pós-teste Bonferroni. Os asteriscos indicam uma diferença significativa na latência ao frio onde \*\*\* significam  $p < 0,001$  e ### difere significativamente do grupo naíve  $p < 0,001$ .

## 5.2 Efeito do composto E1 em três diferentes dosagens na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina (curva dose-resposta):

O efeito anti-hiperálgico da glitazona no modelo de hipersensibilidade aguda ao frio induzido pela oxaliplatina foi testado em três doses: 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, i.p. Os percentuais de inibição da glitazona 1 mg/kg foi de  $92,8 \pm 3,2\%$ , glitazona a 0,1 mg/kg foi de  $24,6 \pm 6,8\%$  e na dose de 0,01 mg/kg foi de  $20,7 \pm 4,2\%$ . Somente a dose de 1 mg/kg da glitazona E1 reduziu a hipersensibilidade ao frio da oxaliplatina de maneira significativa como mostra a figura 12.

**Figura 12** - Efeito da glitazona E1 em três diferentes dosagens na hipersensibilidade ao frio induzida pela oxaliplatina.



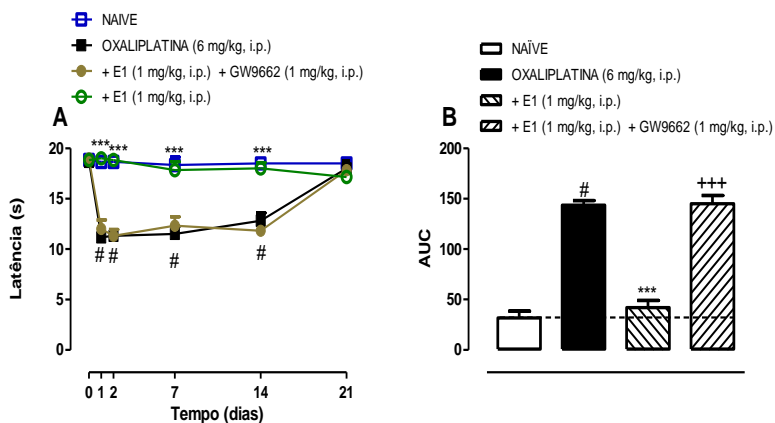
Tempo de latência para retirada de pata direita traseira em segundos nos 5 grupos de 10 camundongos (A). AUC calculada até o vigésimo primeiro dia do experimento (B). Os grupos foram constituídos de naíve, tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p. e tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i. p. concomitante

com a glitazona E1 nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg i.p. no primeiro dia do experimento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via seguida de pós-teste Bonferroni. Os asteriscos indicam um aumento significativo na latência ao frio no grupo de animais que recebeu a glitazona E1 na dose 1 mg/kg, i.p., onde \*\*\* difere significativamente do grupo Oxaliplatina, onde  $p < 0,001$  e ### difere significativamente do grupo naíve  $p < 0,001$ .

### 5.3 Efeito da glitazona E1 e do antagonista PPAR $\gamma$ GW9662 na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina:

Com o objetivo de verificar a participação da via PPAR $\gamma$  no mecanismo de ação da glitazona E1 na hipersensibilidade ao frio induzida pela oxaliplatina, este experimento testou o efeito do antagonista GW9662 administrado concomitante ao composto E1. O composto GW9662 reverteu de maneira significativa o efeito anti-hiperálgico da glitazona, evidenciando o envolvimento da via PPAR $\gamma$  no mecanismo de ação da glitazona E1 (figura 13).

**Figura 13** – Efeito da glitazona E1 e do antagonista PPAR $\gamma$  GW9662 na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina.



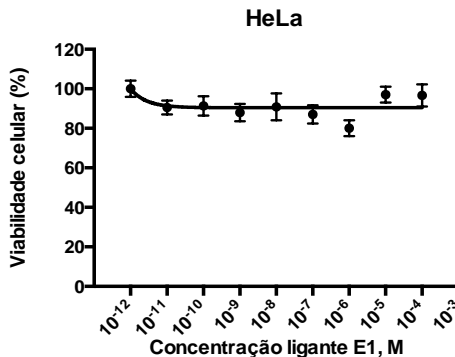
Tempo de latência para retirada de pata direita traseira em segundos nos 4 grupos de 10 camundongos (A). AUC calculada até o vigésimo primeiro dia do experimento (B). Os grupos foram constituídos de naíve, tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p., tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p. concomitante com

a glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. e tratamento com oxaliplatina 6 mg/kg i.p. concomitante com glitazona E1 1 mg/kg i.p. e GW9662 1 mg/kg i.p. no primeiro dia do experimento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via seguida de pós-teste Bonferroni Os asteriscos indicam uma diferença significativa na latência ao frio onde \*\*\* difere significativamente do grupo Oxaliplatina, onde  $p < 0,001$  e ### difere significativamente do grupo naïve  $p < 0,001$ .

#### 5.4 Efeito da glitazona E1 em concentrações crescentes na atividade da luciferase em células HeLa no experimento do gene repórter da luciferase:

Os dados apresentados na figura 14 são de cultura de células HeLa tratadas com veículo DMSO e concentrações crescentes da glitazona E1. Após 24 horas as células foram incubadas com MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular expressa em percentual de células viáveis demonstrando-se não haver citotoxicidade evidente do composto E1, o que permitiu dar sequência ao experimento da atividade da luciferase com gene repórter GAL4PPAR da glitazona E1.

**Figura 14** – Efeito da glitazona E1 na viabilidade de células HeLa.



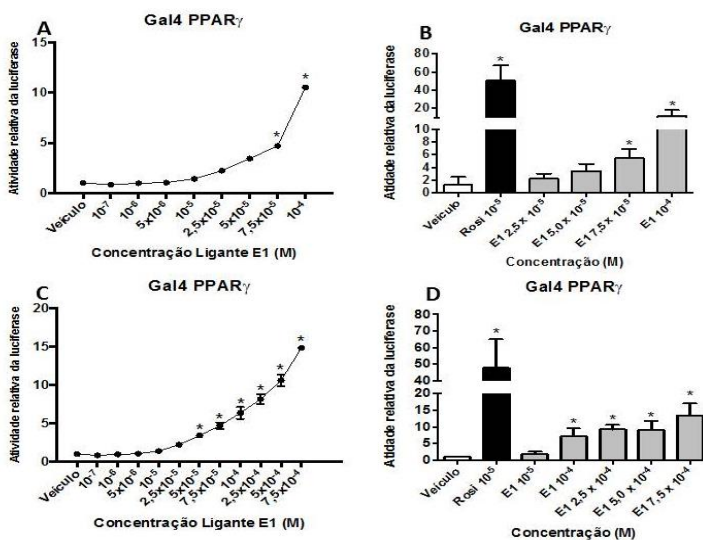
Células HeLa (A) foram tratadas com veículo (DMSO) ou com concentrações crescentes da glitazona E1 ( de  $10^{-11}$  até  $10^{-4}$  M). Após 24h as células foram incubadas com MTT. Os dados são apresentados como porcentagem de células viáveis e resultados consistem de dois experimentos independentes realizados em replicatas de 8.

A figura 15A demonstra a atividade de luciferase em células HeLa submetidas a concentrações crescentes (M) do composto E1. Na concentração de  $10^{-4}$  M da glitazona E1 há aumento significativo da atividade luciferase Gal4PPAR $\gamma$  quando comparado ao veículo (DMSO).

A figura 15B demonstra a atividade de luciferase em células HeLa submetidas a concentrações intermediárias da glitazona E1 (entre  $2,5 \times 10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M) para verificar se há formação de um platô na curva dose-resposta (concentração do agonista *versus* resposta). Também verificou-se que a glitazona E1 apresentou uma atividade de luciferase menor comparada à rosiglitazona (agonista total de PPAR $\gamma$ ).

As figuras 15C e 15D demonstram a atividade de luciferase em células Hela submetidas a concentrações da glitazona E1 superiores a  $10^{-4}$  M. Este ensaio evidenciou que a glitazona E1 comportou-se como um agonista parcial de PPAR $\gamma$ . A concentração de  $10^{-3}$  M não foi solúvel no meio no qual as células foram cultivadas.

**Figura 15** – Experimento da atividade da luciferase com gene repórter GAL4PPAR da glitazona E1.

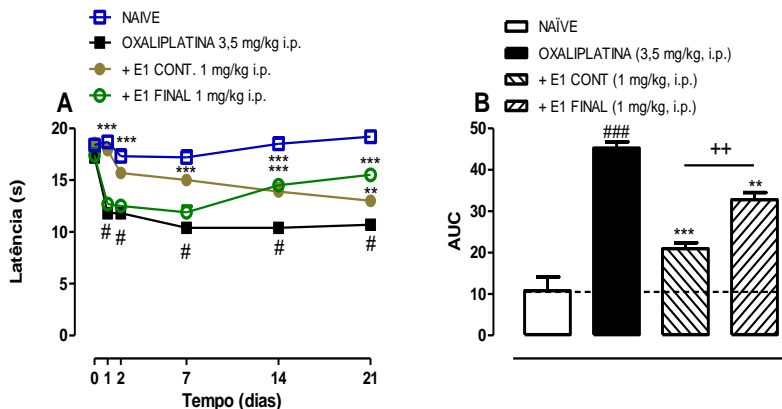


Células HeLa foram co-transfectadas com o plasmídeo contendo a sequência que codifica o receptor nuclear quimérico constituído pelo LBD do PPAR $\gamma$  fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 e com o plasmídeo GAL4-LUC, que possui o elemento responsivo do GAL4 fusionado ao gene repórter da luciferase. As células foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (agonista total de PPAR $\gamma$ ) ou com concentrações crescentes do ligante E1. Resultados de, pelo menos, três experimentos independentes realizados em triplicata. \*  $p < 0,01$  (comparado ao veículo).

### **5.5 Efeito da glitazona E1 na hipersensibilidade crônica ao frio induzida pela oxaliplatina.**

No modelo de dor crônica a oxaliplatina foi administrada na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana durante 4 semanas, ou seja, tratamento com 8 doses. Um grupo de camundongos recebeu a glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. concomitante à oxaliplatina e outro grupo recebeu as mesmas doses de oxaliplatina, porém a glitazona E1 foi administrada duas vezes por semana somente após o término da administração das doses do quimioterápico por um período de 21 dias. A glitazona concomitante atenuou a hipersensibilidade ao frio que perdurou até o décimo quarto dia do experimento. Já a glitazona administrada a partir do término da oxaliplatina diminuiu a sensibilidade da dor ao frio de modo significativo a partir do décimo quarto dia do experimento. As diferenças temporais na injeção da glitazona E1 correspondem a estratégias de prevenção (glitazona concomitante) e terapêutica (glitazona após término da oxaliplatina) como demonstrado na figura 16. O percentual de inibição da glitazona concomitante foi de  $69,4 \pm 4,5\%$  e da glitazona ao final da oxaliplatina foi de  $35,9 \pm 4,5\%$  durante o período de 21 dias.

**Figura 16** – Efeitos da glitazona concomitante e ao final da injeção da oxaliplatina no modelo de hipersensibilidade crônica ao frio induzida pela oxaliplatina.



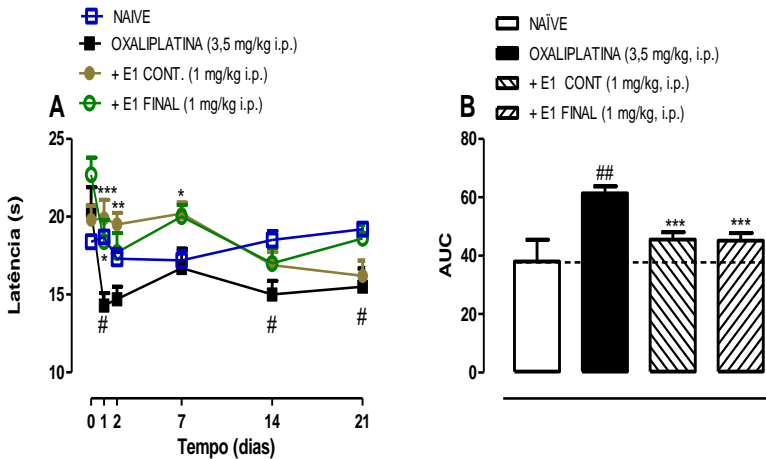
Tempo de latência para retirada de pata direita traseira em segundos nos 4 grupos de 10 camundongos (A). AUC foi calculada até o vigésimo primeiro dia do experimento (B). Os grupos foram constituídos de naïve, tratamento com oxaliplatina na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses, tratamento com oxaliplatina na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses concomitante com a glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. e tratamento com oxaliplatina 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses seguido de glitazona E1 1 mg/kg i.p. duas vezes por semana após término das injeções de oxaliplatina, por 21 dias. Os dados são expressos como a média ± E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via seguida de pós-teste Bonferroni. Difere do grupo Oxaliplatina \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , difere significativamente do grupo Naïve #  $p < 0,001$  e difere significativamente entre os tratamentos final e contínuo ++  $p < 0,01$ .

### 5.6 Efeito da glitazona E1 na hipersensibilidade crônica ao calor induzida pela oxaliplatina:

Neste modelo de dor crônica ao calor induzido pela oxaliplatina, apenas a administração concomitante de glitazona E1 à oxaliplatina reduziu a hipersensibilidade térmica que ocorreu, de modo significativo, somente até o sétimo dia do experimento (figura 17). A inibição da glitazona E1

concomitante foi de  $65,1 \pm 11,2\%$ , e da glitazona E1 ao final da quimioterapia foi de  $62,67 \pm 9,1\%$  durante o período de 21 dias.

**Figura 17** – Efeitos da glitazona concomitante e ao final da injeção da oxaliplatina no modelo de hipersensibilidade crônica ao calor induzida pela oxaliplatina.



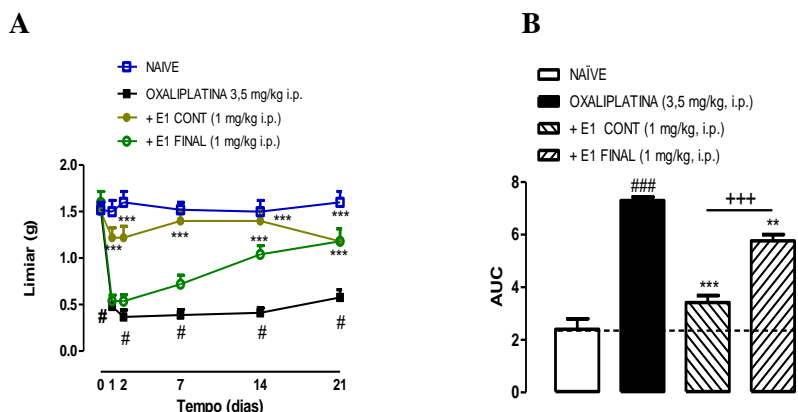
Tempo de latência para retirada de pata direita traseira em segundos nos 4 grupos de 10 camundongos (A). AUC foi calculada até o vigésimo primeiro dia do experimento (B). Os grupos foram constituídos de naíve, tratamento com oxaliplatina na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses, tratamento com oxaliplatina na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses concomitante com a glitazona E1 na dose de 1mg/kg i.p. e tratamento com oxaliplatina 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses seguido de glitazona E1 1 mg/kg i.p. duas vezes por semana no final da administração do quimioterápico, por 21 dias. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via seguida de pós-teste Bonferroni. Difere do grupo Oxaliplatina \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , difere significativamente do grupo Naíve #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$ .

### 5.7 Efeito da glitazona E1 na hipersensibilidade crônica mecânica induzida pela oxaliplatina:

Com a utilização dos filamentos de von Frey foi verificada a hipersensibilidade crônica mecânica induzida pela oxaliplatina e o efeito da glitazona E1 concomitante e ao final da injeção do quimioterápico. A

administração concomitante da glitazona E1 conferiu diminuição da hipersensibilidade mecânica à oxaliplatina durante os 21 dias do experimento. A glitazona injetada ao final do quimioterápico reduziu a sensibilidade mecânica a partir do décimo quarto dia do experimento como mostra a figura 18. A inibição da oxaliplatina concomitante foi de  $78,3 \pm 4,7\%$  e da glitazona ao final da oxaliplatina foi de  $31,3 \pm 4,4\%$  no período de 21 dias.

**Figura 18** - Efeitos da glitazona concomitante e ao final da injeção da oxaliplatina no modelo de hipersensibilidade crônica mecânica induzida pela oxaliplatina.

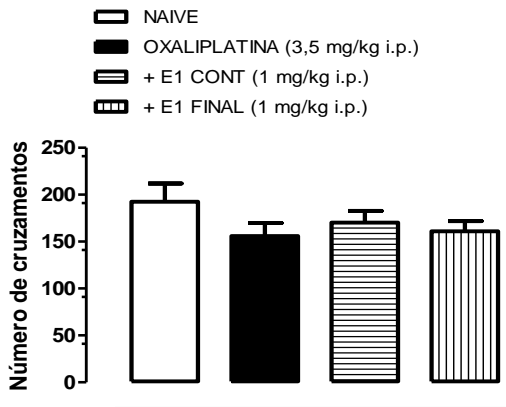


Limiar de dor em gramas da pata direita traseira nos 3 grupos de 10 camundongos (A). AUC foi calculada até o vigésimo primeiro dia do experimento (B). Os grupos foram constituídos de tratamento com oxaliplatina na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses, tratamento com oxaliplatina na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses concomitante com a glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. e tratamento com oxaliplatina 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses seguido de glitazona E1 1 mg/kg i.p. duas vezes por semana no final da quimioterapia, por 21 dias. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via seguida de pós-teste Bonferroni. Difere do grupo Oxaliplatina \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , difere significativamente do grupo Naïve ###  $p < 0,001$  e difere significativamente entre os tratamentos final e contínuo +++  $p < 0,001$ .

### 5.8 Efeito do composto E1 sobre a atividade locomotora (campo aberto) na hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina:

O teste de campo aberto foi realizado após os testes de hipersensibilidade crônica, com o objetivo de verificar a possível interferência de alterações na capacidade de locomoção dos animais, descartando assim a possibilidade de uma resposta analgésica falso-positiva. Como mostrado na figura 19, não houve diferença entre os grupos testados em relação a sua capacidade locomotora.

**Figura 19** - Efeito da glitazona E1 sobre a atividade locomotora no modelo de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina.

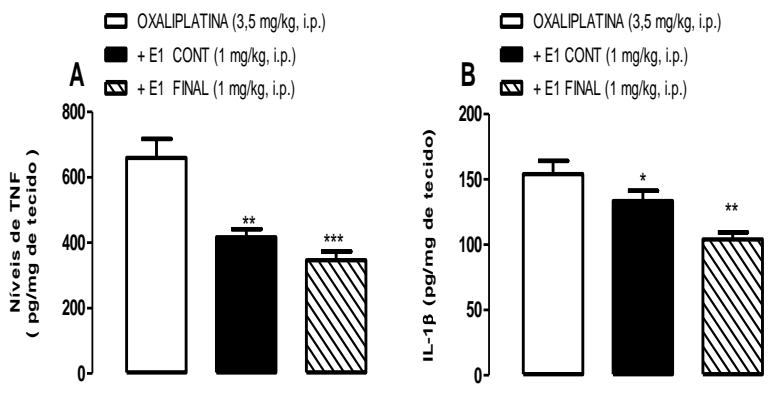


Efeito do composto E1 no modelo de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina sobre a atividade locomotora dos animais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M de 10 animais em cada grupo. ANOVA de uma via.

### 5.9 Avaliação dos níveis de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) na medula espinhal nos grupos do experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina:

A glitazona E1 administrada por via intraperitoneal, tanto de forma concomitante quanto ao final da oxaliplatina, foi capaz de reduzir o nível de TNF (fig. 20A) e IL-1 $\beta$  (fig. 20B) na medula espinhal dos camundongos no modelo de hipersensibilidade crônica.

**Figura 20** – Efeito da glitazona E1 nos níveis de TNF e IL-1 $\beta$  na medula espinhal de camundongos no modelo de hipersensibilidade crônica da oxaliplatina.

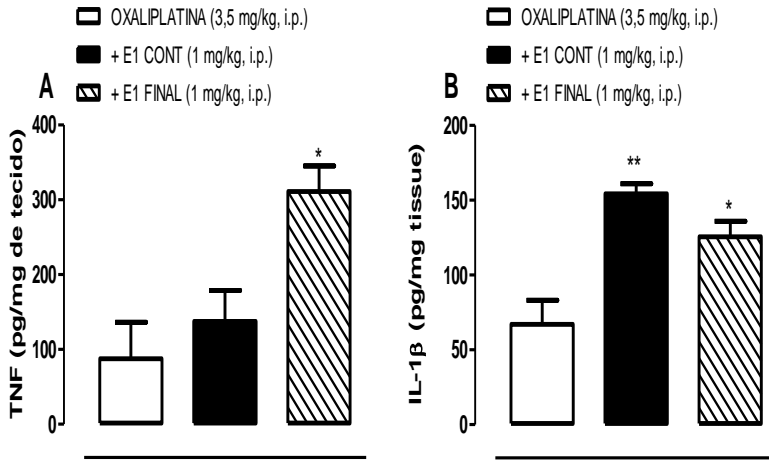


Efeito da glitazona E1 concomitante e ao final da oxaliplatina nos níveis de TNF (A) e IL-1 $\beta$  (B) na medula espinhal. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M num grupo de 5 animais, onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.10 Avaliação dos níveis de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) no córtex cerebral dos grupos do experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina:

A glitazona E1 aumentou os níveis de TNF (figura 21A) e IL-1 $\beta$  (Figura 21B) no córtex cerebral de camundongos do experimento crônico de hipersensibilidade induzida pela oxaliplatina.

**Figura 21** – Efeito da glitazona E1 nos níveis de TNF e IL-1 $\beta$  em córtex cerebral.

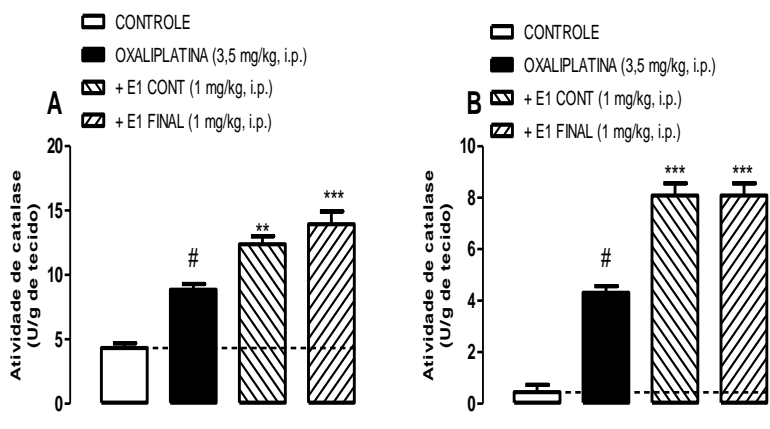


Efeito da glitazona E1 concomitante e ao final da oxaliplatina nos níveis de TNF (A) e IL-1 $\beta$  (B) em córtex cerebral de camundongos. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M num grupo de 3 animais onde \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls.

### 5.11 Avaliação da atividade de catalase na pata e nervo ciático de camundongos no modelo de hipersensibilidade crônica da oxaliplatina:

Os níveis de catalase no nervo ciático aumentaram nos grupos de tratamento com a glitazona E1 concomitante ou no final da oxaliplatina quando comparados ao grupo que recebeu somente oxaliplatina (figura 22A). Nas amostras de pata pode-se observar o mesmo efeito de acréscimo nos níveis de catalase nos grupos que receberam a TZD (figura 22B). Tanto nas amostras de nervo ciático como de pata observa-se aumento da atividade de catalase no grupo que recebeu oxaliplatina com relação ao controle.

**Figura 22** – Efeito da glitazona E1 na atividade da catalase em nervo ciático e pata de camundongos.

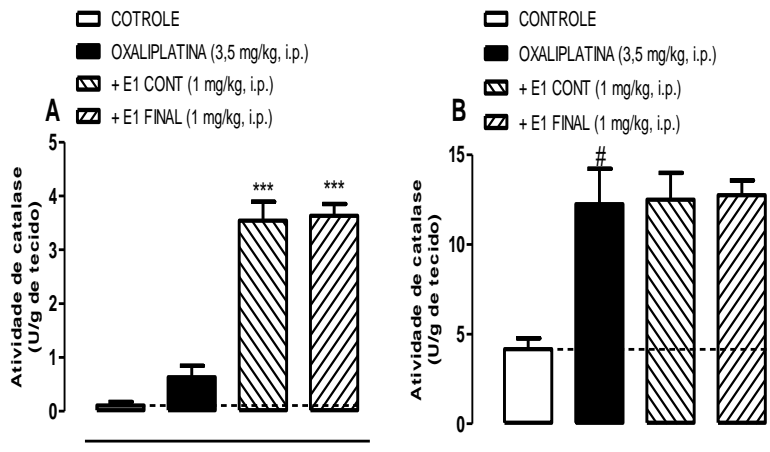


Efeito da glitazona E1 concomitante e ao final da oxaliplatina na atividade da catalase no nervo ciático (A) e pata (B). ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. num grupo de 5 animais onde \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , difere do grupo naíve #  $p < 0,05$ .

### 5.12 Avaliação da atividade de catalase no córtex cerebral e medula espinhal de camundongos no modelo de hipersensibilidade crônica da oxaliplatina:

A glitazona E1 gerou um acréscimo da atividade da catalase no córtex cerebral de maneira significativa com relação ao grupo de animais tratados somente com oxaliplatina como mostra a figura 23A. Nas amostras de medula espinhal não houve diferença entre os camundongos tratados com oxaliplatina somente ou quando tratados também com a glitazona E1 (figura 23B).

**Figura 23** – Efeito da atividade da catalase em córtex cerebral e medula espinal de camundongos.

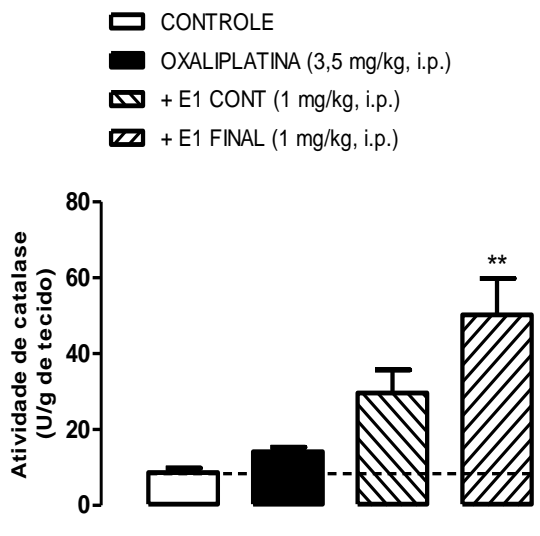


Efeito da glitazona E1 concomitante e ao final da oxaliplatina na atividade da catalase no córtex cerebral (A) e medula espinal (B). ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. num grupo de 5 animais onde \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , difere do grupo naïve #  $p < 0,05$ .

### 5.13 Efeito da glitazona E1 na atividade da catalase no fígado de camundongos no modelo de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina:

Em amostras de fígado, o grupo tratado com a glitazona E1 ao final das injeções de oxaliplatina teve o nível de atividade da catalase aumentada de maneira significativa em relação ao grupo tratado somente com o quimioterápico (figura 24).

**Figura 24** – Efeito da glitazona E1 na atividade de catalase no fígado de camundongos.

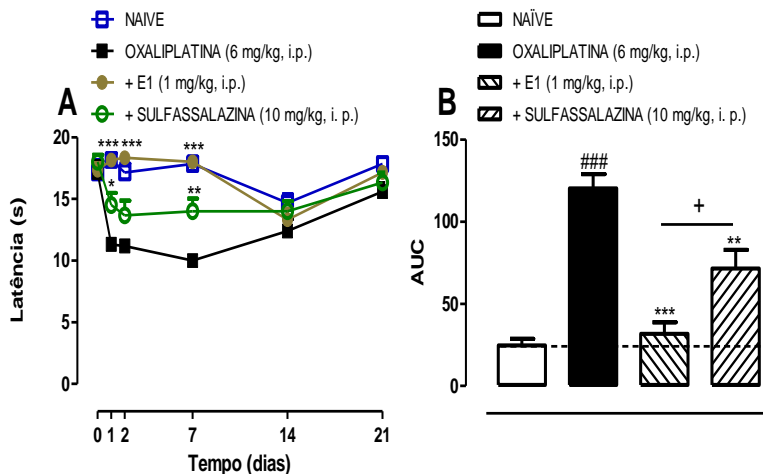


Efeito da glitazona E1 concomitante e ao final da oxaliplatina na atividade da catalase no fígado de camundongos. ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. num grupo de 5 animais onde  $**p < 0,01$ .

#### 5.14 Efeito da glitazona E1 e sulfassalazina na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina:

Neste modelo animal de dor aguda ao frio induzida pela oxaliplatina foram testadas a glitazona E1 e a sulfassalazina. A sulfassalazina é um inibidor da síntese de tetrahydrobiopterina (BH4). As duas substâncias testadas mostraram-se efetivas na diminuição da hipersensibilidade ao frio da oxaliplatina, sendo o efeito mais significativo demonstrado pela glitazona E1 (figura 25). Os percentuais de inibição foram: glitazona E1 de  $88,7 \pm 4,49\%$ , e da sulfassalazina de  $51,1 \pm 11,4\%$ .

**Figura 25** – Efeito da glitazona E1 e sulfassalazina na hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina.



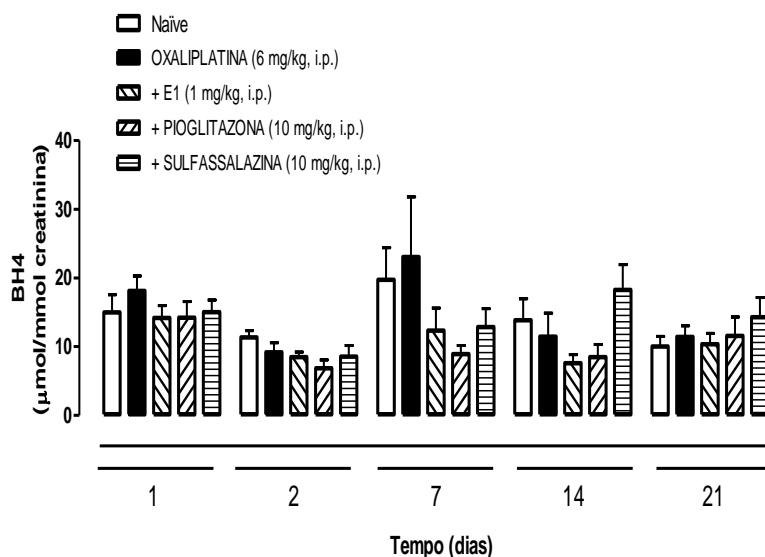
Tempo de latência para retirada de pata direita traseira em segundos nos 4 grupos de 10 camundongos (A). AUC foi calculada no período de 21 dias do experimento. Os grupos foram constituídos de naíve, tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p., tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p. concomitante com a glitazona E1 na dose de 1 mg/kg i.p. e tratamento com oxaliplatina 6 mg/kg i.p. concomitante com sulfassalazina 10 mg/kg i.p. no primeiro dia do experimento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via seguida de pós-teste Bonferroni. Difere do grupo Oxaliplatina \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , difere significativamente do grupo Naíve #  $p < 0,001$  e difere significativamente entre os tratamentos final e contínuo +  $p < 0,05$ .

### 5.15 Efeito da oxaliplatina, glitazona E1, pioglitazona e sulfassalazina nos níveis de BH4 na urina dos camundongos na hipersensibilidade aguda induzida pela oxaliplatina.

No modelo de hipersensibilidade aguda à oxaliplatina foram aferidos os níveis de BH4 na urina dos camundongos dos grupos naíve, oxaliplatina, oxaliplatina + glitazona E1, oxaliplatina + pioglitazona e oxaliplatina + sulfassalazina (figura 26). Houve diferença nos níveis de BH4 entre os grupos oxaliplatina e oxaliplatina + glitazona E1 e também

entre os grupos oxaliplatina e oxaliplatina + pioglitazona no sétimo dia do experimento ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa nos níveis de BH4 entre o grupo naíve e da oxaliplatina e entre os grupos oxaliplatina e oxaliplatina + sulfassalazina.

**Figura 26** – Níveis de BH4 na urina de camundongos do experimento de hipersensibilidade aguda da oxaliplatina.



Mensuração dos níveis de BH4 por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) na urina dos camundongos do experimento agudo de hipersensibilidade da oxaliplatina. Os grupos foram constituídos de naíve, tratamento com oxaliplatina na dose de 6 mg/kg i.p., tratamento com oxaliplatina 6 mg/kg i.p. e glitazona E1 1 mg/kg i.p., tratamento com oxaliplatina 6 mg/kg i.p. e pioglitazona 10 mg/kg i.p., e tratamento com oxaliplatina 6 mg/kg i.p. e sulfassalazina 10 mg/kg i.p. todos administrados no primeiro dia do experimento como dose única. Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais em cada grupo. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via.

### **5.16 Avaliação dos níveis de transaminases (AST e ALT), colesterol total, triglicerídeos, creatinina e glicemia dos camundongos nos grupos do experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina.**

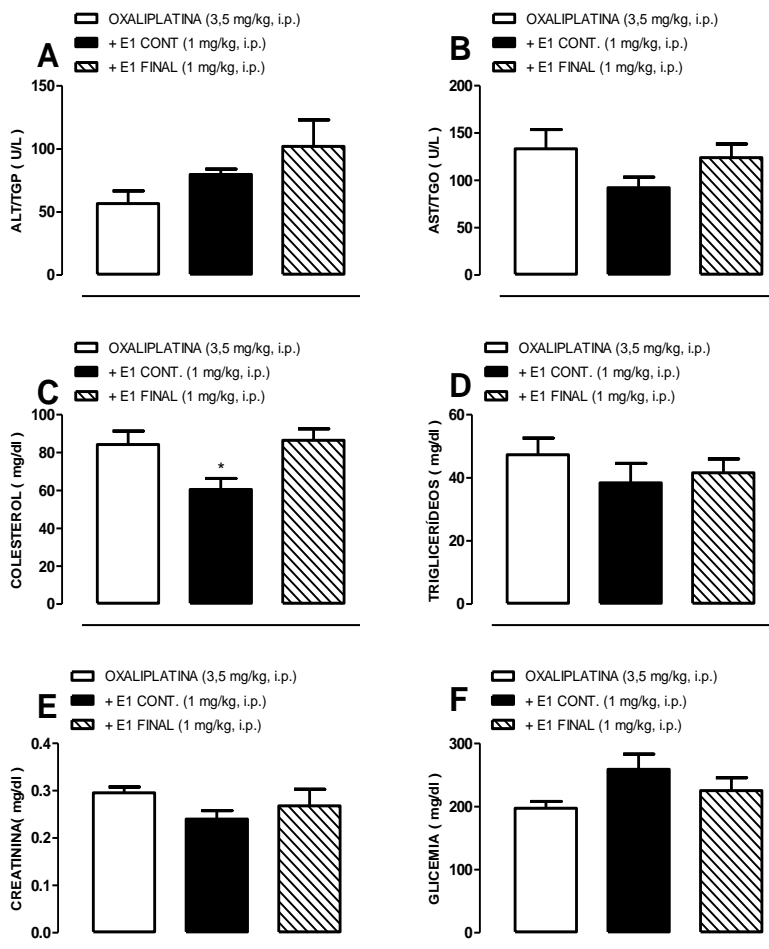
Como demonstrado nas figuras 27A e 27B, não houve alteração significativa nas mensurações das transaminases (AST e ALT) séricas entre os 3 grupos de camundongos do experimento de dor crônica induzida pela oxaliplatina, não demonstrando toxicidade hepática evidente da glitazona em estudo.

A glitazona E1 reduziu os níveis de colesterol sérico quando administrada concomitantemente à oxaliplatina no experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina em relação ao grupo que recebeu somente a oxaliplatina. Esse efeito de redução do colesterol não foi observado no grupo tratado com glitazona E1 somente no final da administração do quimioterápico (figura 27C).

Com relação aos níveis de triglicerídeos os grupos do experimento não apresentaram diferenças significativas entre si (figura 27D).

Os níveis séricos de creatinina e glicose não diferiram entre os grupos de camundongos no experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina, não demonstrando-se assim efeito tóxico a nível renal e metabólico glicêmico (figura 27E e 27F).

**Figura 27** – Mensurações das transaminases, colesterol total, triglicerídeos, creatinina e glicemia nos grupos de camundongos.

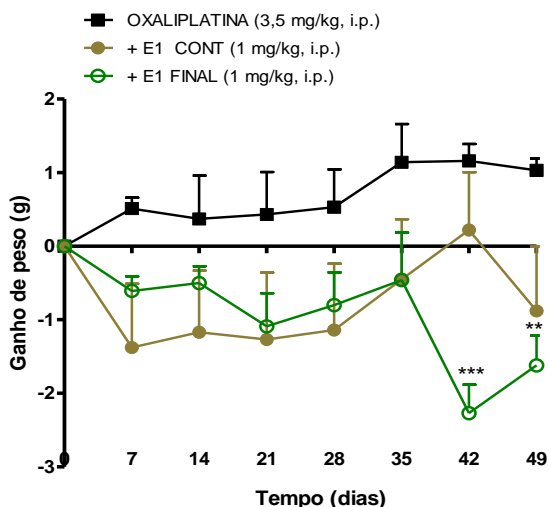


Nível de transaminases (ALT e AST), colesterol total, triglicerídeos, creatinina e glicemia de camundongos tratados com oxaliplatina, oxaliplatina concomitante com glitazona E1 e oxaliplatina com glitazona E1 ao final da quimioterapia. Realizado ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. num grupo de 10 animais.

### 5.17 Avaliação do ganho de peso corporal de camundongos durante o experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina.

O gráfico da figura 28 mostra a evolução do peso corporal dos animais durante o experimento de hipersensibilidade crônica à oxaliplatina, sendo acompanhado por um período de 7 semanas após o término da injeção do quimioterápico. O grupo em tratamento com a glitazona, após o término da administração do quimioterápico, teve uma perda de peso significativa a partir da quinta semana de acompanhamento em relação ao grupo da oxaliplatina isolada. Não houve controle da ingesta alimentar.

**Figura 28** – Evolução do peso corporal dos camundongos tratados com a glitazona e submetidos ao modelo de neurotoxicidade induzido pela oxaliplatina.



Evolução do ganho de peso corporal de camundongos tratados com oxaliplatina, oxaliplatina concomitante com glitazona E1 e oxaliplatina com glitazona E1 ao final da quimioterapia. Realizado ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. num grupo de 10 animais onde \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.18 Avaliação do peso absoluto e relativo de órgãos de camundongos do experimento agudo de hipersensibilidade induzida pela oxaliplatina:

A tabela 1 relaciona os pesos absolutos e relativos dos órgãos fígado, rins, coração, baço e pulmões nos grupos naive, oxaliplatina, oxaliplatina com glitazona E1 e oxaliplatina com glitazona E1 e com GW9662 no experimento de hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina. Houve aumento nos pesos tanto absoluto como relativo do fígado e baço do grupo de animais que receberam oxaliplatina quando comparados ao grupo naive, no entanto o peso voltou a assemelhar-se ao naive no grupo com oxaliplatina e glitazona E1. No grupo que recebeu também a substância GW9662 não houve alteração no peso do fígado e baço em relação ao grupo naive. O peso de rins, corações e pulmões não diferiu de modo evidente entre os grupos de tratamento.

**Tabela 1** – Pesos absolutos (g) e relativos (%) dos órgãos de camundongos.

Órgão	Naive	Oxa	Oxa + Glita	Oxa + Glita + GW
<b>Fígado</b>				
Absoluto (g)	0,84 ± 0,07	1,01 ± 0,04	0,88 ± 0,04	0,95 ± 0,03
Relativo (%)	4,09 ± 0,19	4,75 ± 0,18	4,24 ± 0,17	4,56 ± 0,16
<b>Rins</b>				
Absoluto (g)	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Relativo (%)	1,43 ± 0,07	1,26 ± 0,03	1,29 ± 0,02	1,27 ± 0,07
<b>Baço</b>				
Absoluto (g)	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Relativo (%)	0,46 ± 0,02	0,55 ± 0,08	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,02
<b>Coração</b>				
Absoluto (g)	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Relativo (%)	0,70 ± 0,05	0,69 ± 0,04	0,58 ± 0,04	0,66 ± 0,03
<b>Pulmões</b>				
Absoluto (g)	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Relativo (%)	0,88 ± 0,05	0,87 ± 0,08	0,93 ± 0,08	0,86 ± 0,03

Relação dos pesos absolutos e relativos dos órgãos fígado, rins, baço, coração e pulmões de camundongos do experimento de hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina. Grupos N (naive), O (oxaliplatina), OG (oxaliplatina com

glitazona E1) e OGGW (oxaliplatina, glitazona E1 e GW9662). Os dados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais em cada grupo.

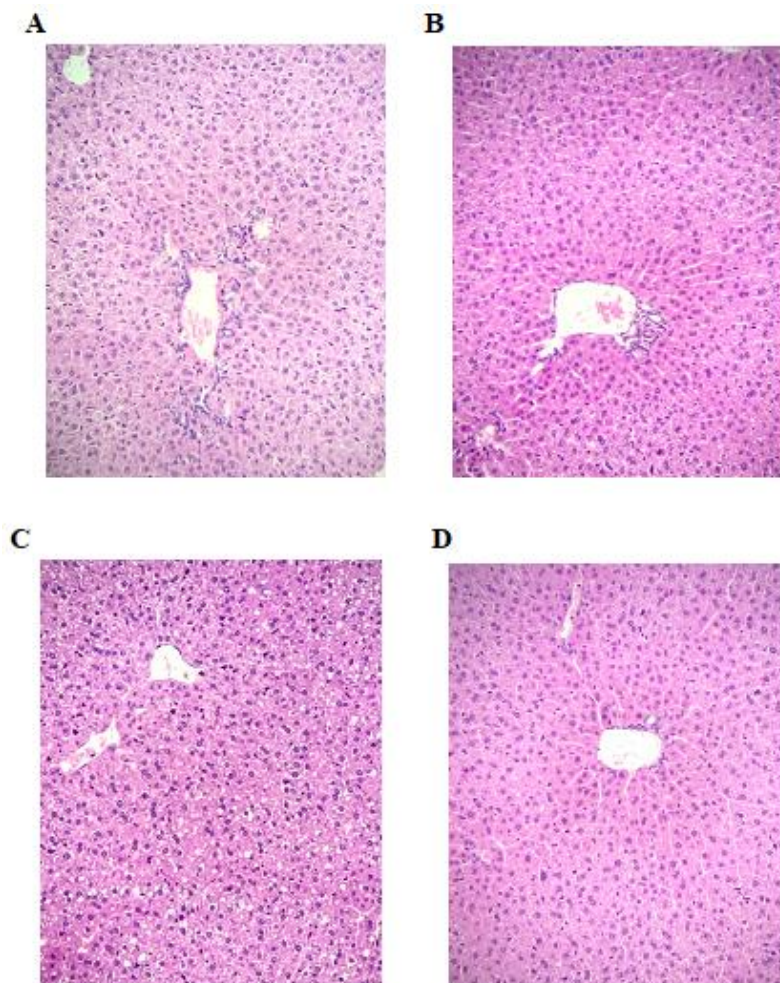
### **5.19 Avaliação histopatológica de fígado, rim e coração de camundongos do experimento de hipersensibilidade aguda induzida pela oxaliplatina.**

Na análise macroscópica de todos os órgãos examinados, não foram encontradas alterações morfológicas dignas de nota, em nenhum dos espécimes dos grupos naive, oxaliplatina, tratado com o composto E1 ou E1 mais GW 9662 (antagonista PPAR $\gamma$ ).

Na avaliação microscópica pela coloração hematoxilina-eosina, os dois patologistas não encontraram alterações histológicas significativas nos órgãos analisados entre os diferentes grupos de estudo.

Foram identificados mínimos focos de infiltrado linfocitário centro-lobular em um espécime de fígado do grupo naive, um micro-trombo calcificado em um coração do grupo naive, mínimos focos de esteatose em um fígado do grupo oxaliplatina + glitazona E1 e em dois fígados do grupo naive, um foco de hemorragia recente sub-endocárdica em um coração do grupo naive, entre os 40 espécimes de fígado, rim e coração analisados.

**Figura 29** - Análise histopatológica pela coloração H.E. do fígado de camundongos.



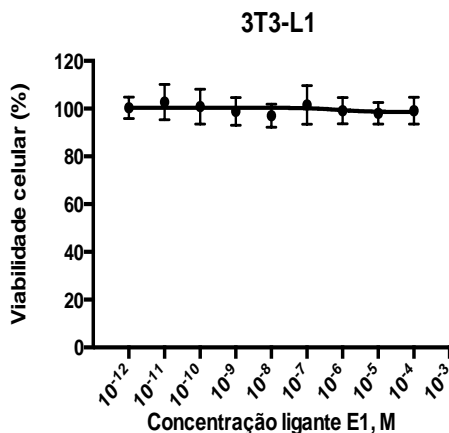
Cortes histológicos de fígado com coloração em hematoxilina-eosina, aumento de 100x (lente de 10x). Não houve alterações histopatológicas dignas de nota entre os 4

diferentes grupos analisados: naíve (A), oxaliplatina (B), oxaliplatina + glitazona E1 (C) e oxaliplatina + glitazona E1 + GW9662 (D).

## 5.20 Avaliação dos efeitos da glitazona E1 sobre a diferenciação de adipócitos em cultura de células 3T3-L1.

Os dados apresentados na figura 30 são de cultura de células 3T3-L1 tratadas com veículo DMSO e concentrações crescentes da glitazona E1. Após 24 horas as células foram incubadas com MTT. O gráfico mostra a viabilidade celular expressa em percentual de células viáveis demonstrando-se não haver citotoxicidade evidente do composto E1, o que permitiu dar sequência ao experimento de adipogênese.

**Figura 30** – Efeito da glitazona E1 na viabilidade de células 3T3-L1.

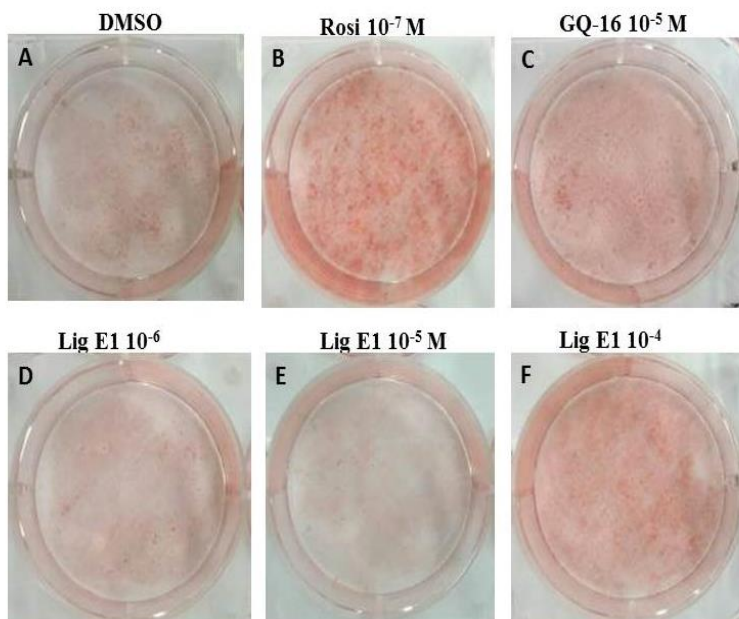


Células 3T3-L1 (B) foram tratadas com veículo (DMSO) ou com concentrações crescentes da glitazona E1 (de  $10^{-11}$  até  $10^{-4}$  M). Após 24h as células foram incubadas com MTT. Os dados são apresentados como porcentagem de células viáveis e resultados consistem de dois experimentos independentes realizados em replicatas de 8.

Visto ser a via do PPAR $\gamma$  um regulador chave na diferenciação adipocítica, avaliou-se o efeito da glitazona E1 na adipogênese em células mesenquimais pré-adipocíticas (3T3-L1). A glitazona E1 promoveu o acúmulo de lipídeos, principalmente na maior concentração de  $10^{-4}$  M. A

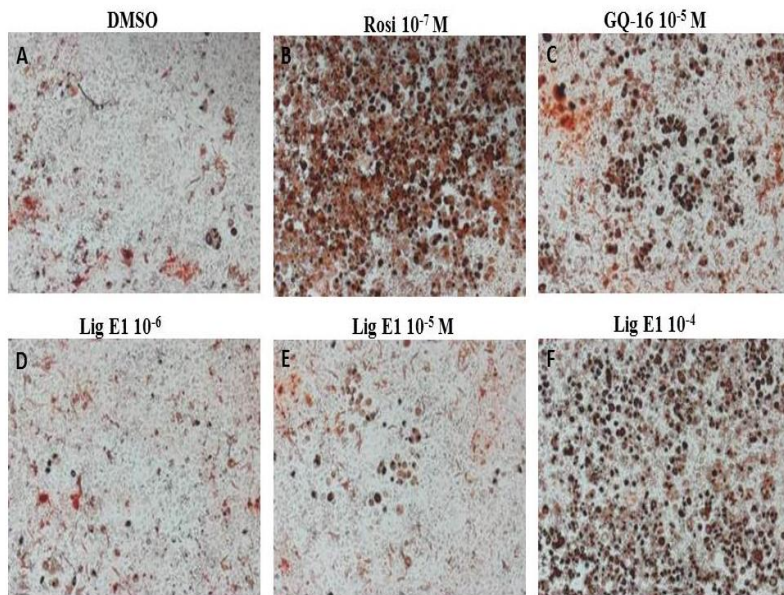
adipogênese foi evidenciada através da coloração vermelha dos triglicerídeos (corante óleo vermelho O) e fotodocumentada em uma área de  $9,5 \text{ cm}^2$  (figura 31 A-F), em aumento microscópico de 5 x (figura 32 A - F) e de 10 x (figura 33 A - F).

**Figura 31** – Avaliação da adipogênese da glitazona E1 em cultura de células 3T3-L1.



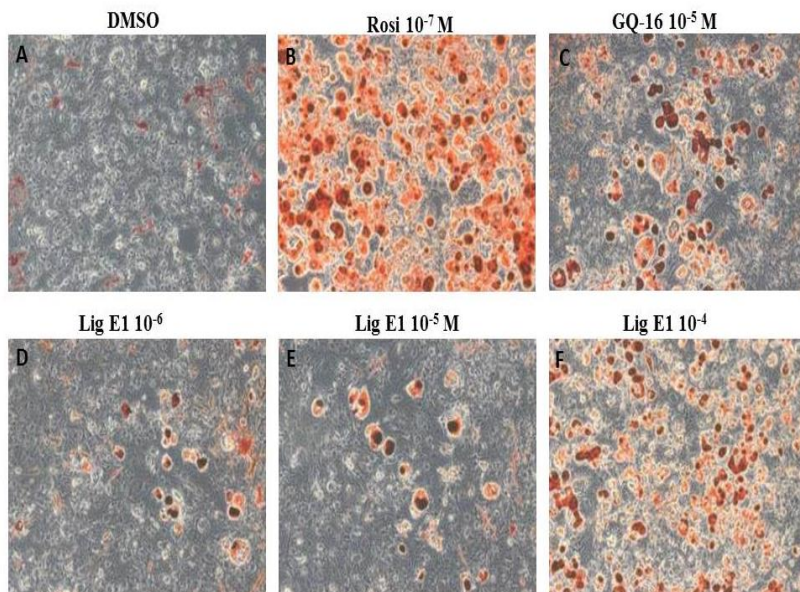
Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1  $\mu\text{M}$  e isobutilmetilxantina 0,5 mM e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona  $10^{-7}$  M (agonista total de PPAR $\gamma$ ), GQ-16  $10^{-5}$  M (agonista parcial de PPAR $\gamma$ ) ou com o ligante E1 (de  $10^{-6}$  até  $10^{-4}$  M) por 48 horas. A seguir, as células foram mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e tratadas a cada 48 horas. No 15º dia de diferenciação, as células foram fixadas, coradas com óleo vermelho O (reagente que pigmenta os triglicerídeos de vermelho) e fotodocumentadas (registro de uma área de  $9,5 \text{ cm}^2$ ). Este resultado se reproduziu em, pelo menos, dois experimentos independentes.

**Figura 32** – Avaliação da adipogênese da glitazona E1 em cultura de células 3T3-L1- fotodocumentação no aumento de 5x.



Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1  $\mu$ M e isobutilmetilxantina 0,5 mM e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona  $10^{-7}$  M (agonista total de PPAR $\gamma$ ), GQ-16  $10^{-5}$  M (agonista parcial de PPAR $\gamma$ ) ou com o ligante E1 (de  $10^{-6}$  até  $10^{-4}$  M) por 48 horas. A seguir, as células foram mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e tratadas a cada 48 horas. No 15<sup>o</sup> dia de diferenciação, as células foram fixadas, coradas com óleo vermelho O (reagente que pigmenta os triglicerídeos de vermelho) e fotodocumentadas com aumento de 5 x. Este resultado se reproduziu em, pelo menos, dois experimentos independentes.

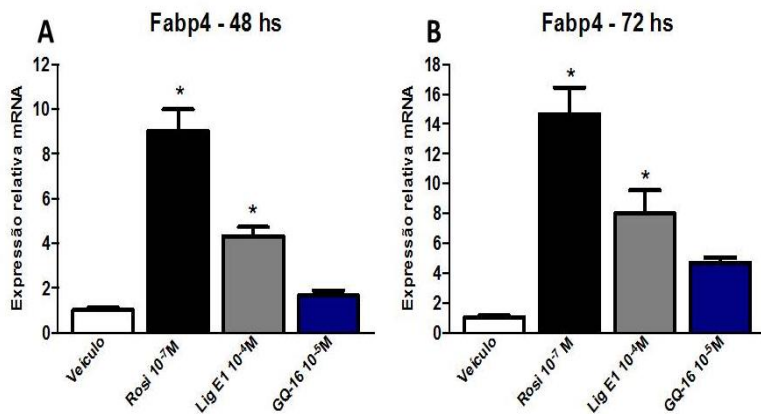
**Figura 33** – Avaliação da adipogênese da glitazona E1 em cultura de células 3T3-L1- fotodocumentação no aumento de 10x.



Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1  $\mu$ M e isobutimetilxantina 0,5 mM e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (agonista total de PPAR $\gamma$ ), GQ-16 10<sup>-5</sup> M (agonista parcial de PPAR $\gamma$ ) ou com o ligante E1 (de 10<sup>-6</sup> até 10<sup>-4</sup> M) por 48 horas. A seguir, as células foram mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e tratadas a cada 48 horas. No 15<sup>o</sup> dia de diferenciação, as células foram fixadas, coradas com óleo vermelho O (reagente que pigmenta os triglicerídeos de vermelho) e fotodocumentadas com aumento de 10 vezes. Este resultado se reproduziu em, pelo menos, dois experimentos independentes.

A glitazona E1 induziu a adipogênese em cultura de células, o que foi confirmado pelo aumento da expressão de Fabp4 (*Fatty acid binding protein* - marcador específico de adipócitos), por PCR quantitativa em tempo real. O efeito adipogênico da glitazona E1 é menor do que o provocado pela rosiglitazona (agonista total de PPAR $\gamma$ ), entretanto maior do que o do GQ-16 (agonista parcial deste receptor nuclear) conforme mostra a figura 34 (A e B).

**Figura 34** – Expressão do gene Fabp4 da adipogênese em células 3T3-L1 tratadas com a glitazona E1.



As células 3T3-L1 foram diferenciadas por (A) 48 ou (B) 72 horas e coletadas para avaliação da expressão do gene Fabp4 (*Fatty acid binding protein* - marcador específico de adipócitos) por PCR quantitativa em tempo real. Os dados estão expressos como níveis de transcritos dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). Resultados de três experimentos independentes. \*  $p < 0,01$  (comparado ao veículo).

## 6 DISCUSSÃO

Como um componente da família dos quimioterápicos derivados da platina, a oxaliplatina é extensivamente usada como um fármaco primordial no tratamento de pacientes com carcinoma colorretal localmente avançado e metastático. A oxaliplatina está incluída na décima nona edição da lista de medicações essenciais para doenças prioritárias da Organização Mundial de Saúde (OMS) publicada em abril de 2015. No entanto, este quimioterápico também é conhecido por causar severa e debilitante neuropatia sensorial periférica aguda e crônica com envolvimento do estresse oxidativo na sua fisiopatologia. De acordo com a severidade da neuropatia crônica, a dosagem da oxaliplatina pode ser postergada, modificada ou mesmo descontinuada, comprometendo sua eficácia terapêutica. Uma vez estabelecida a neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina, há comprometimento da qualidade de vida dos pacientes, já que não existem intervenções medicamentosas eficientes no manejo desse efeito adverso (CHO et al., 2016).

Tiazolidinedionas (TZD) ou glitazonas são compostos heterocíclicos derivados do sistema tiazólico e agonistas de PPAR. Quando combinados com outros anéis heterocíclicos produzem uma variedade de atividades biológicas como antidiabéticos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos e antiproliferativos (ASATI et al., 2014).

Assim, este trabalho teve como objetivo explorar o efeito de uma nova glitazona, a *N*-fenilbenzossulfonamida-4-[(*Z*)-(3-benzil-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno) metil], denominada glitazona E1, na neurotoxicidade aguda e crônica induzida pela oxaliplatina em camundongos.

No modelo de neurotoxicidade aguda do presente estudo, a oxaliplatina, na dose de 6 mg/kg i.p., diminui o tempo de latência ao estímulo térmico frio quando comparado ao grupo naive de maneira significativa, demonstrando o efeito neurotóxico agudo de uma injeção única de oxaliplatina. Esta mesma dose induziu hipersensibilidade aguda ao frio e mecânica no experimento de Li et al. (2015), os quais avaliaram o efeito da PLA2 derivada do veneno de abelha como agente antinociceptivo (LI et al., 2015).

O aumento da hipersensibilidade ao frio induzida pela oxaliplatina do presente estudo iniciou após 24hs após a administração do

quimioterápico e persistiu até o décimo quarto dia. Toyama et al. (2014) verificaram que o pico de resposta de hipersensibilidade ao frio induzida pela oxaliplatina em camundongos ocorre 4 dias após a administração do quimioterápico, com diminuição progressiva após 1 semana, dados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Este mesmo autor também demonstrou um aumento da expressão de c-Fos na medula espinhal dos animais que receberam injeção única de oxaliplatina, confirmando assim ativação neuronal em nível de corno posterior da medula espinhal (TOYAMA et al., 2014).

O rápido início das alterações sensoriais produzidas pela oxaliplatina, que precedem as alterações estruturais do nervo periférico, sugere o envolvimento da excitabilidade neural neste tipo de toxicidade aguda. A capacidade da oxaliplatina em alterar a expressão gênica de canais iônicos envolvidos na sensibilidade ao frio, inclusive com a regulação de eventos epigenéticos, é bem documentada e crítica no desenvolvimento da neuropatia tóxica aguda da oxaliplatina (DESCOEUR et al., 2011).

A hipersensibilidade aguda ao frio é a característica marcante da toxicidade da oxaliplatina e se desenvolve em praticamente todos os pacientes que recebem este quimioterápico. Não há, atualmente, estratégia terapêutica para aliviar esse efeito adverso. Ainda, segundo Descouer et al. (2011), esses efeitos são mediados por neurônios sensoriais aferentes primários que expressam o termorreceptor TRPM8, sendo que a oxaliplatina ainda promove a hiperexcitabilidade neuronal diminuindo a expressão de canais de potássio TREK1, TRAAK e  $K_v1.1$ , bem como aumentando a expressão de canais pró-excitatórios como canais ativados por hiperpolarização (HCNs) (DESCOEUR et al., 2011).

Zhao et al. (2012) demonstraram que a injeção única de oxaliplatina (1-10 mg/kg) por via intraperitoneal induz hipersensibilidade ao frio dentro de um intervalo de duas horas da administração do quimioterápico. Estes pesquisadores também demonstraram que a hipersensibilidade ao frio provocada pela oxaliplatina foi bloqueada com a utilização do antagonista TRPA1, HC-030031, implicando também esse receptor na gênese da dor ao frio provocada pela oxaliplatina. A oxaliplatina e seu metabólito oxalato parecem aumentar a responsividade dos canais TRPA1 em neurônios sensoriais que pode perdurar até 3 dias após a administração do quimioterápico, caracterizando um efeito sub-agudo. Esta sensibilização de TRPA1 pode ocorrer através de sua translocação para a

membrana plasmática em condições inflamatórias via fosfolipase C ou proteína quinase A, ou através de radicais livres de oxigênio e nitrogênio. A neuropatia aguda ao frio induzida pela oxaliplatina não parece ser mediada pelos receptores TPRV1 (ZHAO et al., 2012).

Quando a glitazona E1 foi injetada na dose de 1 mg/kg concomitante à oxaliplatina na dose de 6 mg/kg por via intraperitoneal, houve reversão da hipersensibilidade ao frio. O efeito inibitório do composto E1 sobre a hipersensibilidade ao frio da oxaliplatina persistiu até o décimo quarto dia do experimento em consequência da perda do efeito neurotóxico agudo do quimioterápico.

Churi et al. (2008) também evidenciaram o efeito analgésico de um agonista sintético de PPAR $\gamma$  na dor neuropática aguda. Estes autores induziram a dor neuropática por transecção do nervo ciático em ratos e demonstraram que a injeção intratecal única de 100 $\mu$ g de rosiglitazona diminuiu a hipersensibilidade ao frio, sendo esse efeito revertido pelo antagonista PPAR $\gamma$  BADGE (CHURI et al., 2008).

Sugere-se que as glitazonas, agindo como agonistas do receptor PPAR $\gamma$ , interfiram no metabolismo oxidativo por meio da estimulação da catalase peroxissomal com redução dos níveis de EROs produzidas em consequência da toxicidade da oxaliplatina. Descoeur et al. (2011) relataram que a neuropatia aguda induzida pela oxaliplatina é causada principalmente pelos radicais livres de oxigênio produzidos pelas mitocôndrias e peroxissomos e que essas substâncias afetam e sensibilizam diretamente receptores de potencial transitório (TRPs) e canais de sódio e potássio dependentes de voltagem (DESCOEUR et al., 2011). Assim, estabelece-se uma via farmacológica de ação da glitazona E1 na atenuação da hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina.

A sensibilização de canais iônicos como mecanismo de neurotoxicidade aguda ao frio da oxaliplatina também abrange os canais de sódio Na $_v$ 1.6, cuja inibição farmacológica aboliu a dor ao frio induzida pela oxaliplatina. Não foram implicados na alodinia ao frio deste quimioterápico os canais Na $_v$ 1.3 e Na $_v$ 1.7 (DEUIS et al., 2013).

A hiperalgesia ao frio induzida pela oxaliplatina foi abolida em animais sem expressão gênica para Na $_v$ 1.9, bem como em ratos tratados com oligonucleotídeos antisense Na $_v$ 1.9, identificando-se, assim, mais um

potencial alvo terapêutico no tratamento da alodinia ao frio da oxaliplatina (LOLIGNIER et al., 2015).

Deste modo, vários TRPs e canais de sódio e potássio dependentes de voltagem estão implicados na fisiopatologia da hiperalgesia ao frio induzida pela oxaliplatina. Tanto a expressão alterada destes receptores quanto sua sensibilização mediada por citocinas inflamatórias ou EROs ocorre dentro do contexto da neurotoxicidade aguda ao frio da oxaliplatina.

A pioglitazona é a única TZD disponível no mercado brasileiro com indicação para o tratamento do diabetes mellitus tipo II. A toxicidade limitante do seu uso a longo prazo é a maior incidência de carcinoma de bexiga (FROHLICH et al., 2015).

No presente trabalho, testou-se a eficácia da pioglitazona na redução da hiperalgesia aguda ao frio induzida pela oxaliplatina. Esta glitazona aumentou o tempo de latência ao frio em camundongos tratados com oxaliplatina em relação ao grupo que recebeu somente o quimioterápico com valor de  $p < 0,001$ . Este resultado foi semelhante ao grupo que recebeu oxaliplatina e a glitazona E1 no mesmo experimento.

A pioglitazona também diminuiu a hipersensibilidade e alodinia térmica e mecânica em ratos submetidos à transecção do nervo ciático, bem como reduziu os níveis de CD11b, GFAP e p-p38 na coluna dorsal da medula espinhal indicando o envolvimento da micróglia e astrócitos neste modelo de dor neuropática (MORGENWECK et al., 2013)

Griggs et al. (2016) estudaram o efeito da pioglitazona na neuropatia diabética. Os pesquisadores utilizaram ratos Zucker magros e obesos, sendo que o grupo de obesos apresentava aumento dos níveis de glicose, hemoglobina A1C, metilglicoxal e níveis de insulina bem como uma hiperalgesia térmica e mecânica na pata posterior e ainda aumento da expressão de ERK na forma fosforilada. O tratamento destes animais com a pioglitazona reduziu os níveis de glicose, hemoglobina A1C, pERK e o quadro de hiperalgesia em relação ao grupo controle (GRIGGS et al., 2016).

O efeito anti-neuropático das glitazonas é dependente de tempo e dose (ZANARDELLI et al., 2014). No presente trabalho foram avaliadas três doses da glitazona E1 no primeiro dia do experimento de hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina. Somente a dose de 1mg/kg mostrou-se eficaz na redução da hipersensibilidade; doses 10 e 100 vezes inferiores não foram efetivas.

Zanardelli et al. (2014) verificaram que doses de 3 e 10 mg/kg i.p. de rosiglitazona não produziram diferença na redução da hipersensibilidade na plataforma de frio induzida pela oxaliplatina. A menor dose testada por estes pesquisadores, de 3 mg/kg i.p., mostrou uma melhora da coordenação motora e uma significativa restauração da expressão e atividade da catalase em ratos (ZANARDELLI et al., 2014).

Avaliou-se o efeito do antagonista seletivo de PPAR $\gamma$ , GW9662, no modelo de dor neuropática aguda induzida pela oxaliplatina. O antagonista reverteu o efeito da glitazona EI de maneira significativa, corroborando a participação da via PPAR $\gamma$  no efeito antinociceptivo da TZD em estudo.

Morgenweck e al. (2013) testaram o efeito da pioglitazona na dor neuropática induzida pela transecção do nervo ciático em ratos e observaram uma redução dos sinais de hipersensibilidade somatosensorial no grupo de animais que receberam a glitazona. Estes autores também verificaram que o antagonista GW9662 inibiu o efeito antinociceptivo da pioglitazona indicando uma ação PPAR $\gamma$  dependente (MORGENWECK et al., 2013).

Em cultura primária de astrócitos murinos, o antagonista irreversível PPAR $\gamma$  GW9662 reduziu a atividade da catalase, a enzima de defesa antioxidante mais importante nos peroxissomos. O agonista PPAR $\gamma$  rosiglitazona promoveu a reversão deste dano enzimático da catalase (MANNELLI et al., 2014).

Também em cultura primária de astrócitos de ratos, Zanardelli et al. (2014) verificaram que a oxaliplatina (10  $\mu$ M por 48 horas e 1  $\mu$ M por 5 dias) aumentou o número de peroxissomos, porém a expressão e funcionalidade da catalase foi significativamente reduzida. Durante 5 dias de incubação com o antagonista seletivo reversível de PPAR $\gamma$ , G3335, verificou-se um dano peroxissomal similar à oxaliplatina, sugerindo uma relação entre a via de sinalização PPAR $\gamma$  e a neurotoxicidade da oxaliplatina.

O agonista rosiglitazona (10  $\mu$ M) reduziu os efeitos deletérios na cultura de astrócitos induzidos tanto pelo G3335 quanto pela oxaliplatina. A rosiglitazona também previniu o aumento da densidade de astrócitos na medula espinhal provocada pela oxaliplatina e não alterou a mortalidade

induzida pela oxaliplatina em células de tumor colorretal humano da linhagem HT-29 (ZANARDELLI et al., 2014).

Deste modo, no presente experimento, bem como em dados demonstrados na literatura, verifica-se uma relação evidente entre a via de sinalização PPAR $\gamma$  e a neurotoxicidade aguda da oxaliplatina, e a consequente atenuação desta toxicidade por meio do agonismo desta via induzida pelas glitazonas. No entanto, a ausência de TZD disponíveis comercialmente com perfil toxicológico aceitável limita a incorporação desta classe de drogas no arsenal terapêutico para manejo da dor neuropática produzida pela oxaliplatina.

A concentração de  $10^{-4}$  M de glitazona E1 causou aumento significativo da atividade da luciferase Gal4PPAR $\gamma$  em células HeLa, quando comparado ao veículo ( $p < 0,01$ ) no teste do gene repórter da luciferase, o que confirma a ação da glitazona E1 sobre a via PPAR $\gamma$ . Concentrações superiores a  $10^{-4}$  M mostraram atividade de luciferase máxima até  $7,5 \times 10^{-4}$  M. A atividade máxima da glitazona E1 corresponde a aproximadamente um terço da atividade máxima da luciferase da rosiglitazona (agonista total de PPAR $\gamma$ ), ou seja, a glitazona E1 comportou-se como um agonista parcial de PPAR $\gamma$ . A glitazona E1 comportou-se de maneira semelhante em relação à atividade de luciferase com o derivado tiazolidínico GC-16, quando comparado a rosiglitazona (AMATO et al., 2012).

Após a comprovação da atuação do composto E1 em receptores PPAR $\gamma$ , o próximo passo foi testar o mesmo em um modelo animal de hipersensibilidade crônica térmica (calor e frio) e mecânica induzida pela oxaliplatina. Os camundongos receberam oxaliplatina na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana num total de 08 doses.

A glitazona E1 concomitante atenuou a hipersensibilidade crônica ao frio que perdurou até o décimo quarto dia do experimento. Já a glitazona administrada a partir do término da oxaliplatina diminuiu a sensibilidade álgica ao frio de modo significativo somente a partir do décimo quarto dia.

Utilizando um modelo semelhante ao presente estudo de sensibilidade crônica à oxaliplatina, Ushio et al. (2012) demonstraram que o Goshajinkigan (GJG), um derivado herbáceo da planta Kampo da medicina japonesa, reduziu a hipersensibilidade ao frio num modelo com ratos que receberam oxaliplatina na dose de 4 mg/kg i.p. duas vezes por semana por 8 doses. Foi demonstrado que GJG tem efeito antinociceptivo por meio da

estimulação de receptores opióides kappa, via dinorfina, e ainda aumenta o fluxo sanguíneo periférico por incrementar a produção de óxido nítrico. GJG também possui propriedades antioxidativas bem como diminui a ativação de fibras C por meio da redução de receptores TRPV1 e  $P_2X_3$  (USHIO et al., 2012).

Em modelos animais de toxicidade crônica, verificou-se que a oxaliplatina induz à diminuição da velocidade de condução neural, ao dano neuronal com diminuição da área nuclear e nucleolar e axonopatia periférica. O maior sítio de dano neurológico ocorre no gânglio da raiz dorsal, onde há acúmulo de platina nos neurônios (CAVALLETTI et al., 2010).

A oxaliplatina também aumenta os níveis de EROs e óxido nítrico nas células neuronais dos gânglios da raiz dorsal sugerindo alteração do metabolismo oxidativo e dano mitocondrial, com inibição da produção de energia por estas organelas. Neste contexto foi evidenciado aumento da ativação de receptores  $P_2X_7$ , que se constitui em um dos marcadores iniciais de dano mitocondrial e apoptose (MASSICOT et al., 2013).

A neuropatia crônica induzida pela oxaliplatina depende da dose cumulativa do quimioterápico sendo que 10-20% dos pacientes desenvolvem sintomas neuropáticos severos na dose acumulada de 750-850 mg/m<sup>2</sup>, sendo que 10% dos pacientes podem ter a sintomatologia persistente por até 2 anos após a interrupção da quimioterapia. Os pacientes apresentam parestesia distal, ataxia sensorial, dor e parestesia mandibular, dor ocular, câimbras em membros inferiores e alterações da voz (PULVERS et al., 2016).

A magnitude e o impacto desses efeitos adversos no paciente concretizaram a realização de um grande estudo cooperativo, de fase III randomizado, para validar a não inferioridade de 03 versus 06 meses de quimioterapia adjuvante com oxaliplatina em pacientes com câncer colorretal estágio III, com o intuito de diminuir os efeitos adversos neurotóxicos nesse grupo de pacientes com intenção curativa. Os resultados desse estudo foram apresentados na reunião anual da Sociedade Americana de Oncologia em maio de 2017 e não foi atingido o objetivo de não inferioridade entre os regimes de 03 e 06 meses, principalmente para um grupo de pacientes com mais de 3 gânglios regionais acometidos pelo tumor (SOBRERO et al., 2017).

Com isso, 6 meses de esquemas quimioterápicos contendo oxaliplatina continuam sendo a terapia padrão e a neuropatia da oxaliplatina ainda persiste como um importante desafio clínico. Novas opções farmacológicas se fazem necessárias para mitigar esse efeito adverso.

No modelo de sensibilidade crônica ao calor induzido pela oxaliplatina, a administração concomitante de glitazona E1 ao quimioterápico reduziu a hipersensibilidade térmica de modo significativo, que ocorreu somente até o sétimo dia do experimento. Deve-se ressaltar que não se conseguiu verificar uma diferença altamente significativa na hipersensibilidade crônica ao calor entre os grupos naive e tratados com oxaliplatina.

Também Renn et al. (2011), em um estudo de toxicidade crônica utilizando a mesma dosagem de oxaliplatina do presente estudo, não demonstraram alteração da hipersensibilidade ao calor entre o grupo naive e com quimioterapia (RENN et al., 2011). Já em um modelo animal com ratos submetidos à transecção de nervo ciático, a pioglitazona também não foi capaz de reduzir a hipersensibilidade ao calor (MORGENWECK et al., 2013).

Ratos Zucker diabéticos apresentam um aumento da hipersensibilidade ao calor quando comparado a um grupo não diabético. A pioglitazona mostrou-se eficaz apenas temporariamente na redução da hiperlgesia ao calor nesses animais (GRIGGS et al., 2016).

Deste modo, parece não haver uma relação nítida entre o desenvolvimento de uma hipersensibilidade ao calor e a utilização crônica de oxaliplatina. Em modelos animais de lesão neural e diabetes, o papel da redução da hipersensibilidade ao calor pelas glitazonas também permanece indefinido.

O presente experimento também foi capaz de demonstrar a redução da hipersensibilidade crônica mecânica induzida pela oxaliplatina quando a glitazona E1 foi administrada concomitante com o quimioterápico durante os 21 dias do estudo. No entanto, quando a glitazona E1 foi injetada após o término da quimioterapia, seu efeito antinociceptivo ocorreu tardiamente, ou seja, a partir do décimo quarto dia do experimento.

Azevedo et al. (2013), em um modelo de hipersensibilidade crônica ao frio e mecânica da oxaliplatina em camundongos, verificaram que os flavonoides antioxidantes quercitina e rutina reduziram a hiperlgesia ao frio e mecânica, de modo semelhante ao demonstrado com a

glitazona E1 no presente estudo. Ensaios de estresse oxidativo mostraram que a oxaliplatina induz peroxidação na medula espinhal e que a rutina e quercitina diminuem esse efeito. Esses flavonoides também reduzem a iNOS e a coloração por nitrotirosina no corno posterior da medula espinhal, sugerindo haver um envolvimento do óxido nítrico e peroxinitrito na neurotoxicidade da oxaliplatina (AZEVEDO et al., 2013).

Toyama et al. (2014) testaram o efeito da substância SS-31, um antioxidante mitocondrial, administrando-o concomitantemente à oxaliplatina e verificaram diminuição da hipersensibilidade mecânica e também redução da perda de fibras neurais intraepidérmicas. A injeção de SS-31 após o início dos sintomas não reverteu a hipersensibilidade mecânica (TOYAMA et al., 2014).

No modelo animal de hipersensibilidade crônica deste trabalho, a oxaliplatina foi administrada na dose de 3,5 mg/kg i.p. duas vezes por semana num total de 08 doses, o que perfaz uma dose cumulativa de 28 mg/kg. Utilizando a conversão de doses animais para dose equivalente humana, tem-se a dose cumulativa de 1165mg/m<sup>2</sup> semelhante aos 12 ciclos de oxaliplatina utilizados no tratamento adjuvante de pacientes com câncer colorretal.

Utilizando o mesmo parâmetro de dose cumulativa da oxaliplatina, Zanardelli et al. (2014) observaram redução na hipersensibilidade mecânica e ao frio quando foi administrado rosiglitazona na dose de 3 e 10 mg/kg por via oral concomitante à oxaliplatina em ratos, o que também foi verificado no estudo com a glitazona E1 na dose de 3,5 mg/kg (ZANARDELLI et al., 2014).

No sentido de descartar uma possível interferência da glitazona E1 na atividade locomotora dos camundongos ocasionando testes anti-hiperálgicos falso-positivos, foi realizado o teste de campo aberto no modelo de hiperalgesia crônica induzida pela oxaliplatina. Os dados obtidos demonstraram que não houve diferença na locomoção e atividade exploratória entre os grupos de animais, aferido através de cruzamentos em 6 minutos.

Renn et al. (2011) também demonstraram que, em um experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina, o grupo que recebeu o quimioterápico teve boa tolerância em relação ao grupo naive. Os camundongos que receberam oxaliplatina continuaram com

o comportamento de limpar-se, fazer ninhos, explorar o ambiente e escalar o topo de suas gaiolas e 20% deles apresentavam acentuação leve da cifose e piloereção (RENN et al., 2011).

Morgenweck et al. (2013), em seu modelo de dor neuropática induzido pela transecção de nervo ciático, mostraram que a pioglitazona injetada em animais sem a lesão neural não ocasionou nenhuma disfunção da coordenação motora (MORGENWECK et al., 2013). A injeção intratecal de rosiglitazona em animais naive no experimento de Churi et al. (2008) também não demonstrou redução na coordenação motora em testes rotaroad (CHURI et al., 2008).

No modelo de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina do presente estudo, verificou-se uma redução nos níveis de TNF e IL-1 $\beta$  na medula espinhal, aferidos por ensaio imunoenzimático nos grupos que receberam tratamento com o quimioterápico e glitazona E1, quando comparado ao grupo de animais que receberam oxaliplatina isolada. Nas amostras de nervo ciático o TNF não foi detectado nos grupos testados e não demonstrou-se diferença significativa nos níveis de IL-1 $\beta$  entre os grupos.

Deste modo, a glitazona E1, por intermédio da via PPAR $\gamma$ , reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$  na medula espinhal, contribuindo para o seu efeito antinociceptivo. Este dado encontrado é consistente com dados de literatura que demonstram o efeito anti-inflamatório dos agonistas PPAR $\gamma$  (NAIM et al., 2017).

PPARs, uma superfamília de receptores nucleares alvo das glitazonas, está ativamente envolvido na imunoregulação. Eles regulam vários fatores de transcrição inflamatórios bem como sensibilidade à apoptose, homeostasia energética, proliferação celular e composição lipídica das membranas (NAIM et al., 2017).

Massicot et al. (2013) verificaram que, em cultura de células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas com oxaliplatina 200  $\mu$ M, houve ativação dos receptores P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> e caspase-3 associados com apoptose, como também aumento significativo de 2,5 vezes na produção de TNF e de 6 vezes na produção de IL-6 pelas células tratadas com oxaliplatina. Já a produção de IL-1 $\beta$  foi apenas levemente aumentada. Já foi demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias induzem alodinia e hiperalgesia aguda e crônica em modelos animais de neuropatia (MASSICOT et al., 2013).

Já em córtex cerebral, por outro lado, detectou-se um aumento dos níveis de TNF e IL-1 $\beta$  nos grupos de camundongos que receberam oxaliplatina com a glitazona E1 em relação ao grupo da oxaliplatina isolada, ou seja, um dado contrário ao esperado efeito anti-inflamatório dos agonistas PPAR $\gamma$  como a glitazona E1 em estudo. No entanto, dados semelhantes foram encontrados por Gélinas et al. (2005) que verificaram um aumento dos níveis de TNF e IL-1 $\beta$  no cérebro de ratos saudáveis tratados com o agonista PPAR $\gamma$  ciglitazona. Estes autores sugerem que o tecido cerebral que não sofreu alteração na homeostasia de seus mediadores inflamatórios por evento nocivo prévio, responde de maneira pró-inflamatória aos agonistas PPAR $\gamma$ , com aumento das citocinas como TNF, IL-1 $\beta$  e iNOS, porém com mecanismo ainda não elucidado (GÉLINAS et al., 2005). Postula-se, assim, que a oxaliplatina não ocasionou uma alteração na dinâmica das citocinas inflamatórias no cérebro dos camundongos tratados e que neste cenário a glitazona E1 provocou o aumento dos níveis de TNF e IL-1 $\beta$ .

Deve-se considerar que o tipo de estímulo causador de dano neuronal (tóxico, isquêmico, traumático, infeccioso), tempo decorrido da lesão, bem como o sítio anatômico do sistema nervoso mais afetado por esse estímulo, influenciam o mecanismo fisiopatológico preponderante da dor neuropática, seja primariamente por meio de alteração do metabolismo oxidativo ou de citocinas inflamatórias, como verificado em modelo animal de trauma cerebral e efeito neuroprotetor da pioglitazona (PILIPOVIC et al., 2015). Isto pode explicar os resultados distintos nos parâmetros oxidativos e inflamatórios dos experimentos do presente estudo, conforme o órgão do sistema nervoso analisado, como observado em homogenato de córtex cerebral, onde a glitazona E1 aumentou a atividade da catalase mostrando seu efeito antioxidante, porém em relação às citocinas, o composto em estudo não evidenciou efeito anti-inflamatório, pois houve aumento dos níveis de TNF e IL-1 $\beta$  no grupo que recebeu a glitazona E1.

A oxaliplatina causa um dano funcional em mitocôndrias de nervos periféricos levando a uma quebra na cadeia de elétrons e produção de EROs e ERNs (XIAO et al., 2012).

As glitazonas interferem no estresse oxidativo neuronal provocado pela oxaliplatina aumentando o metabolismo de EROs e ERNs produzidas por mitocôndrias e peroxissomos, sendo a catalase a defesa enzimática

antioxidante mais importante em peroxissomos de mamíferos (MANELLI et al., 2013).

Com o intuito de verificar a participação do metabolismo oxidativo na toxicidade crônica da oxalipaltina, realizou-se o estudo da atividade da catalase no experimento de hipersensibilidade crônica da oxaliplatina em pata, nervo ciático, córtex cerebral e medula espinhal. Com relação ao grupo tratado somente com oxaliplatina, os animais que receberam também a glitazona E1 concomitante e ao final da quimioterapia tiveram seus níveis de atividade da catalase aumentados em nervo ciático, córtex cerebral e pata, sem haver diferença na medula espinhal. Portanto, na hipersensibilidade crônica à oxaliplatina, o metabolismo oxidativo também tem um papel crucial na fisiopatologia da dor neuropática tornando-se um potencial alvo terapêutico das TDZs.

Zanardelli et al. (2014) também demonstraram alterações semelhantes na atividade da catalase, quando utilizaram um modelo animal com ratos que foram submetidos a uma dose cumulativa de oxaliplatina de 36mg/kg correspondente a 1332 mg/m<sup>2</sup> no homem, suficiente para desencadear neuropatia crônica em estudos clínicos. Eles observaram uma redução na atividade e expressão da catalase em neurônios do gânglio da raiz dorsal e medula espinhal em animais que receberam a oxaliplatina. A administração concomitante do agonista PPAR $\gamma$ , rosiglitazona, nos ratos tratados com oxaliplatina, melhorou o nível de atividade da catalase e normalizou o número de peroxissomos, bem como reduziu a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas na medula espinhal, ocorrendo concomitantemente com o controle da dor exercida pela rosiglitazona neste modelo animal. (ZANARDELLI et al., 2014).

O estudo *in vitro* de Argyriou et al. (2013) mostrou que a oxaliplatina causa lesões citotóxicas mais potentes que a cisplatina com consequente maior dano mitocondrial e severidade da neuropatia periférica. Ao passo que a neurotoxicidade aguda da oxaliplatina está mais relacionada a uma sensibilização de receptores de potencial transitório (TRPs) e canais iônicos de sódio e potássio por EROs e ERNs, a neuropatia sensorial crônica resulta de acúmulo de platina e alterações metabólicas (estresse oxidativo) nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (ARGYRIOU et al., 2013).

A glitazona E1 também foi capaz de aumentar os níveis de atividade da catalase em fígado de camundongos tratados com oxaliplatina,

principalmente quando ela foi administrada após término da quimioterapia.

Tabassum et al. (2015) observaram que em mitocôndrias isoladas de hepatócitos de ratos tratados com oxaliplatina houve elevação dos índices de estresse oxidativo como peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, além de alterações de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos comprometendo a integridade do parênquima hepático (TABASSUM et al., 2015).

No experimento de sensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina do presente trabalho, observou-se que a sulfassalazina também foi capaz de reduzir a hipersensibilidade ao frio do quimioterápico com valor de  $p < 0,01$ , sugerindo uma interferência da via da síntese da tetrahydrobiopterina (BH4) no mecanismo antinociceptivo da toxicidade aguda da oxaliplatina. No entanto, esta redução na hipersensibilidade foi inferior à observada nos grupos tratados com a glitazona E1.

Na mensuração dos níveis de BH4 na urina dos camundongos tratados com oxaliplatina, somente houve redução significativa de BH4 nos grupos que receberam também pioglitazona e glitazona E1. Não detectou-se diferença significativa no grupo que recebeu sulfassalazina.

Altos níveis de BH4 são produzidos por neurônios sensoriais com dano axonal e por macrófagos que infiltram nervos lesados e tecido inflamatório. Essa grande produção de BH4 pelos neurônios sensoriais aumenta a sensibilidade à dor e o bloqueio da produção de BH4 somente nessas células neurais poderia reduzir a hipersensibilidade consequente à lesão neural sem afetar a dor nociceptiva. Uma alternativa para reduzir a síntese elevada de BH4 na dor neuropática é o bloqueio da enzima sepiapterina redutase, uma enzima terminal na via de síntese de novo do BH4. A sulfassalazina, um composto anti-inflamatório, inibe a atividade da sepiapterina redutase por meio do seu metabólito sulfapiridina, e mostrou uma modesta redução da hipersensibilidade mecânica em camundongos submetidos a transecção de nervo ciático (LATREMOLIERE et al., 2015).

O menor efeito da sulfassalazina no experimento comportamental e a ausência de diminuição significativa de níveis de BH4 quando administrada em conjunto com a oxaliplatina pode ter uma explicação na via de administração do fármaco. A microbiota intestinal metaboliza a sulfassalazina em seu metabólito ativo, a sulfapiridina (IC<sub>50</sub> de 200 µM)

(HARUKI et al., 2013). No presente estudo a sulfassalazina foi injetada por via intraperitoneal podendo ter interferido nos resultados finais.

Também detectou-se um melhor resultado na redução da hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina proporcionada pela glitazona E1 e pioglitazona em comparação com a sulfassalazina. E na mensuração de BH4 urinário, tanto a glitazona E1 como a pioglitazona mostraram níveis reduzidos desta pterina em relação ao grupo de oxaliplatina isolado, o que não ocorreu de maneira significativa com a sulfassalazina.

Ressalta-se aqui, que essa diferença pode estar relacionada a distintos locais de ação dos fármacos, sendo que a sulfassalazina atua primariamente na sepiaterina redutase (SPR) e as glitazonas atuam na guanosina trifosfato ciclohidrolase (GTPCH1) como demonstrado por Linscheid et al. (2003) utilizando a rosiglitazona em cultura de adipócitos 3T3-L1 (LINSCHIED et al., 2003). A GTPCH1 é um passo limitante da biossíntese de BH4 e é regulada transcricionalmente por concentrações de interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF e peróxido de hidrogênio (SHIMIZU et al., 2003). Como mecanismos fisiopatológicos da neurotoxicidade da oxaliplatina estão relacionados à neuroinflamação e metabolismo oxidativo, a interferência das glitazonas na enzima GTPCH1 torna-se uma alternativa terapêutica promissora.

Devido ao efeito pleiotrópico das glitazonas na via PPAR $\gamma$ , uma preocupação na utilização desta classe de fármacos são os efeitos adversos. A troglitazona foi a primeira TZD aprovada para o tratamento do diabetes mellitus em 1997, porém foi retirada do mercado no ano 2000 devido à severa hepatotoxicidade, inclusive com casos de falência hepática fatal. A segunda TZD, rosiglitazona, foi banida do mercado europeu e tem uso restrito nos EUA devido ao aumento da morbidade cardiovascular. A pioglitazona facilita o desenvolvimento de câncer de bexiga e também tem seu uso restrito (FROHLICH et al., 2015).

No experimento de hipersensibilidade crônica induzida pela oxaliplatina, mensurou-se o nível de AST, ALT, glicose, colesterol total, triglicérides e creatinina no plasma dos camundongos. Exceto por uma diminuição do nível de colesterol ( $p < 0,05$ ) no grupo de camundongos que recebeu glitazona E1 concomitante com a oxaliplatina, todos os demais parâmetros bioquímicos não mostraram alteração significativa entre os grupos, demonstrando ausência de sinais tóxicos.

Gawly et al. (2009) já mostraram que doses de 4 mg/kg oral de pioglitazona administradas diariamente por 8 semanas em ratos não mostraram hepatotoxicidade quando analisados níveis séricos de transaminases e cortes histopatológicos do fígado. Esses pesquisadores sugerem que a toxicidade hepática não seja característica da classe das tiazolidinedionas, e sim um efeito típico da troglitazona (GAWLY et al., 2009).

Já Elshama et al., (2016) demonstraram alterações em exames de função hepática, renal e cardíaca em camundongos tratados com dose de 200 e 400 mg/kg/dia de pioglitazona por gavagem por 90 dias, sendo que a alterações nos testes bioquímicos foram dose-dependentes (ELSHAMA et al., 2016). Destaca-se que, neste estudo, a TZD foi administrada por um período três vezes mais longo e em doses muito superiores ao experimento do presente trabalho (doses de 1 mg/kg duas vezes na semana num período de 30 dias).

Saha et al. (2013), por sua vez, analisaram alterações bioquímicas e toxicidade hepática num grupo de 20 homens saudáveis que receberam uma dose única de 30mg de pioglitazona. Os autores não encontraram alterações nos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, glicose aferidos 30 minutos e 24 horas após a ingestão da pioglitazona. A dosagem de AST e ALT foi normal, excluindo efeitos tóxicos hepáticos (SAHA et al., 2013).

Com relação ao peso dos animais, não houve ganho ponderal nos grupos de animais que receberam tratamento com glitazona E1, inclusive havendo perda de peso na sexta e sétima semana de acompanhamento em nível significativo no grupo de recebeu a glitazona E1 somente no final da quimioterapia. Não foi realizado controle de ingesta alimentar e hídrica dos camundongos. Este dado é contrário ao efeito adverso clássico de ganho de peso e edema dos agonistas PPAR $\gamma$ , como demonstrado por Filipova et al. (2017), onde uma meta-análise em humanos evidencia um aumento de peso e do índice de massa corporal durante o tratamento com pioglitazona em pacientes com diabetes tipo 2 (FILIPOVA et al., 2017).

Já Amato et al. (2012) demonstraram que, em camundongos tratados com o agonista parcial PPAR $\gamma$  GQ-16, houve manutenção da atividade antidiabética desta tiazolidinediona similar à rosiglitazona, no entanto, sem ganho de peso ou edema, um efeito comumente associado aos

agonistas totais de PPAR $\gamma$  devido a hiperfagia e retenção hídrica induzida por estes fármacos (AMATO et al., 2012). Como a glitazona E1 mostrou comportar-se também como um agonista parcial de PPAR $\gamma$  similar ao GQ-16, poderia justificar-se a ausência de ganho de peso com a glitazona E1 devido ao agonismo parcial de PPAR $\gamma$ .

No experimento de hipersensibilidade aguda induzida pela oxaliplatina avaliou-se o peso absoluto e relativo dos pulmões, fígado, baço, rins e coração dos camundongos, onde tanto a glitazona E1 como a oxaliplatina eram injetados somente no primeiro dia dos grupos em teste. Não houve alteração nos pesos dos pulmões, coração e rins nos diferentes grupos.

É sabido que um possível efeito colateral da oxaliplatina é o dano sinusoidal hepático o que gera hipertensão portal, com consequente esplenomegalia e trombocitopenia (OVERMAN et al., 2010). O peso absoluto e relativo do baço e fígado foi maior no grupo tratado com oxaliplatina isolada em relação ao naive, o que não ocorreu nos camundongos tratados com oxaliplatina e glitazona E1, ou seja, esta TZD parece mitigar a hepatoesplenomegalia provocada pela oxaliplatina.

Na análise histopatológica de rim, fígado e coração pela coloração HE dos animais deste experimento de hipersensibilidade aguda, as amostras não apresentaram alterações histológicas significativas entre os diferentes grupos, inferindo ausência de modificações da arquitetura tecidual sugestivas de toxicidade aguda tanto da oxaliplatina como da glitazona E1.

Quando Chinnam et al. (2012) administraram a pioglitazona em doses elevadas via oral ( $1/4$  a  $1/2$  da dose letal mediana) em camundongos, a análise histopatológica mostrou elevada incidência de hipertrofia ventricular bem como congestão hepática e renal (CHINNAM et al., 2012).

Em cultura de células de carcinoma de colo uterino HeLa e de células mesenquimais pré-lipocíticas 3T3-L1, os dados apresentados no presente trabalho não demonstraram citotoxicidade da glitazona E1 em concentrações crescentes até  $10^{-4}$  M, no teste de viabilidade celular com MTT.

No ensaio de adipogênese do presente trabalho, a glitazona E1 na concentração de  $10^{-4}$  M induziu a adipogênese em cultura de células 3T3-L1, o que foi evidenciado pelo acúmulo de triglicérides no meio de cultura e pelo aumento da expressão da Fabp4 por PCR em tempo real. O efeito adipogênico da glitazona E1 foi menor do que o provocado pela

rosiglitazona (agonista total de PPAR $\gamma$ ). Este dado encontra-se em concordância com os experimentos de Amato et al. (2012) que demonstraram que a glitazona GQ-16, um agonista parcial de PPAR $\gamma$ , também induziu adipogênese em células 3T3-L1, porém em menor intensidade que o agonista total rosiglitazona (AMATO et al., 2012).



## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos por este estudo, verificou-se que a glitazona E1 foi efetiva na redução da hipersensibilidade aguda ao frio induzida pela oxaliplatina, sendo esse feito revertido pelo antagonista GW9662, confirmando assim a ação desta TZD pela via de estimulação PPAR $\gamma$ . A dose da glitazona E1 que demonstrou esse efeito antinociceptivo no modelo agudo foi de 1mg/kg intraperitoneal. No experimento do gene repórter da luciferase a glitazona E1 comportou-se como um agonista parcial de PPAR $\gamma$ .

No modelo de neurotoxicidade crônica da oxaliplatina, a glitazona E1 diminuiu a hipersensibilidade mecânica e ao frio de maneira contundente, o que não ocorreu ao estímulo do calor. Também foi demonstrado que a glitazona E1 aumentou a atividade de catalase em tecido nervoso bem como diminuiu os níveis de TNF e interleucina 1 $\beta$  na medula espinhal dos camundongos.

Não se constatou efeito tóxico da glitazona E1 quando avaliado peso de órgãos, atividade locomotora, peso corporal, viabilidade celular, adipogênese e função hepática e renal através de dosagens séricas de transaminases e creatinina. Lipídeos séricos e glicemia também não foram significativamente afetados, o que demonstrou segurança na administração desta substância, porém essa análise toxicológica requer estudos futuros mais detalhados, em vista dos deletérios efeitos adversos obtidos da experiência clínica com as glitazonas disponíveis comercialmente.

Em virtude da premente necessidade de novas opções farmacológicas para o tratamento da dor neuropática induzida por quimioterápicos, a glitazona E1 torna-se uma alternativa promissora para estudos futuros que corroborem sua eficácia e determinem seu perfil toxicológico.



## REFERÊNCIAS

ABBOTT, C.A.; MALIK, R.A.; VAN ROSS, E.R.; KULKARNI, J., BOULTON, A.J. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based population in the U.K. **Diabetes Care.**, v. 34, p. 2220-2224, 2011.

AMATO, A.A.; RAJAGOPALAN, S.; LIN, J.Z.; CARVALHO, B.M.; FIGUEIRA, A.C.M.; LU, J.; AYERS, S.D.; MOTTIN, M.; SILVEIRA, R.L.; SOUZAS, P.C.T.; MOURÃO, R.H.V.; SAADA, M.J.A.; TOGASHI, M.; SIMEONI, L.A.; ABDALA, D.S.P.; SKAF, M.S.; POLIKPARPOV, I.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; BRENNAN, R.G.; BAXTER, J.D.; PITTA, I.R.; WEBB, P.; PHILLIPS, K.J.; NEVES, F.A.R. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 287, p. 28169-28179, 2012.

AMREEN, M.; KUMAR, D. VIKRAM, A. Effects of thiazolidinediones on metabolismo and cancer: relative influence of PPAR $\gamma$  and IGF-1 signaling. **European Journal of Pharmacology.**, v. 768, p. 217-225, 2015.

ANAND, P. et al. Clinical trial of the p38-Map kinase inhibitor dimapimod in neuropathic pain following nerve injury. **European Journal of Pain.**, v. 15, p. 1040-1048, 2011.

APKARIAN, A.V.; HASHMI, J.A.; BALIKI, M.N. Pain and the brain; specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. **Pain.**, p. 49-64, 2011.

ARGYRIOU, A.A.; CAVALETTI, G.; ANTONOCOPOULOU, A.; GENAZZANI, A.A.; BRIANI, C.; BRUNA, J.; TERRAZZINO, S.; VELASCO, R.; ALBERTO, P.; CAMPAGNOLO, M.; LONARDI, S.; CORTINOVIS, D.; CAZZANIGA, M.; SANTOS, C.; PSAROMYALOU, A.; ANGELOPOULOU, A.; KALOFONOS, H.P. Voltage-gatd sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of

oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: results from a prospective multicentre study. **Cancer.**, v. 119, p. 3570-3577, 2013.

ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BARTHI, S.K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-target scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry.**, v. 87, p. 814-833, 2014.

AZEVEDO, M.I.; PEREIRA, A.F.; NOGUEIRA, R.B.; ROLIM, F.E.; BRITO, G.A.C.; WONG, D.V.T.; LIMA, R.C.P.; RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L. The antioxidante effects of the flavonoids rutin and quercitin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheric neuropathy. **Molecular Pain.**, v. 9, p. 1-14, 2013.

BANNISTER, K.; DICKENSON, A.H. What the brain tells the spinal cord. **Pain.**, v. 157, p. 2148-2151, 2016.

BARON, R.; BINDER, A; WASNER, A.G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology.**, v. 9, p. 807-819, 2010.

BASBAUM, A.L.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BELFER, I; YOUNGBLOOD, V.; DARBAN, D.S.; WANG, Z.; DLAW, L.; FREEMANN, L.; DESAI, K.; DIZON, M.; ALIEN, D.; CUNNINGTON, C. A GCH1 haplotype confers sex-specific susceptibility to pain crises and altered endothelial function in adults with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology.**, v. 89, p. 187-193, 2014.

BENNETT, G.J.; DOYLE, T.; SALVEMINI, D. Mitotoxicity in distal symmetrical sensory peripheral neuropathies. **Nature Reviews Neurology.**,v. 10, p. 326-336, 2014.

BOUHASSIRA, D.; LANTERI-MINET, M.; ATTAL, N.; LAURENT, B.; TOUBOUL, C. Prevalence of crhonic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain.**, v. 136, p. 380-387, 2008.

BRENNER, D.S.; GOLDEN, J.P.; GEREAU, R.W. A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice. **Plos One.**, v.7, p. 1-8, 2012.

CANTA, A.; POZZI, E.; CAROZZI, V.A. Mitochondrial dysfunction in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Toxis.**, v. 3, p. 198-223, 2015.

CAROZZI, V.A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters.**, v. 596, p. 90-107, 2015.

CARVALHO, F.C.; SILVA, A.M.F.; CARVALHO, A.A. The use of antioxidant agents for chemotherapy-induced peripheral neuropathy treatment in animal models. **Clinical Pharmacology Physiology.**, p. 1-9, 2017.

COSENS, D.J.; MANNING, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature.**, v. 224, p. 285-287, 1969.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in pain pathway. **Nature.**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CAVALLETTI, G.; MARMIROLI, P. Chemotherapy induced peripheral neurotoxicity. **Nature Reviews Neurology.**, v. 6, p. 657-666, 2010.

CERSOSIMO, R.J. Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. **Annals Pharmacotherapy.**, v. 39, p. 128-135, 2005.

CHEN, K.; ZHANG, Z.; LIAO, M.F.; YAO, W.L.; WANG, J.; WANG, X.R. Blocking PARP2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord. **Journal of the Neurological Sciences.**, v. 352, p. 62-67, 2015.

CHICHORRO, J.G.; Zampronio, A.R.; RAE, G.A. Endothelin ET<sub>B</sub> receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Experimental Biology and Medicine.**, v. 231, p. 1136-1140, 2006.

CHINNAM, P.; MOHSIN, M.; SHAFEE, L.M. Evaluation of acute toxicity of pioglitazone in mice. **Toxicology International.**, v. 19, p. 250-254, 2012.

CHO, E.S.; YI, J.M.; PARK, J.S.; LEE, Y.J.; LIM, C.J.; BANG, O.S.; KIM, N.S. Aqueous extract of *Lithospermi radix* attenuates oxaliplatin-induced neurotoxicity in both in vitro and in vivo models. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, v. 16, P. 1-13, 2016.

CHOWDHURY, S.K.; SMITH, D.R.; FERNYHOUGH, P. The role of aberrant mitochondrial bioenergetics in diabetic neuropathy. **Neurobiology Diseases.**, v. 51, p. 56-65, 2013.

CHURI, S.B.; ALEEM, O.S.A.; TUMBER, K.K.; PORTER, H.S.; TAYLOR, B.K. Intrathecal rosiglitazone acts at peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  to rapidly inhibit neuropathic pain in rats. **Journal of Pain.**, v. 9, p. 639-649, 2008

COLLOCA, L.C.; KALSO, E.; ; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A.H.; YARNITSKY, D.; FREEMAN, R.; TRUINI, A.; ATTAL, N.; FINNERUP, N.B.; ECCLESTON C.; KALSO, E.; BENNETT, D.L.; DWORKIN, R.H.; RAJA, S.N. Neuropathic pain. **Nature Reviews.**, v. 3, p. 1-19, 2017.

CORIAT, E. et al. Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 124, p. 262-272, 2014.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Reviews Neuroscience.**, v. 32, p. 1-32, 2009.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, p. 364-378, 2014.

DE FELICE, M.; SANOJA, R.; WANG, R.; VERA-PORTOCARRERO, L.; OYARZO, J.; KING, T. Engagement of descending inhibition from rostral ventromedial medula protects against chronic neuropathic pain. **Pain**, v.152, p. 2701-2709, 2011.

DESCOEUR, J.; PEREIRA, V.; PIZZOCCARO, A.; FRANCOIS, A.; LING, B.; MAFFRE, V.; COUETTE, B.R.; BUSSEROLLES, J.; COURTEIX, C.; NOEL, J.; LAZDUNKI, M.; ESCHALIER, A.; AUTHIER, N.; BOURINET, E. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodeling of ion channel expression in nociceptors. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, p. 266-278, 2011.

DEUIS, J.R.; ZIMMERMANN, K.; ROMANOVSKY, A.A.; POSSANI, L.; CABOT, P.J.; LEWIS, R.J. VETTER, I. An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for  $Na_v1.6$  in peripheral pathways. **Pain**, v. 154, p. 1749-1757, 2013.

DIB-HAJJ, S.D.; CUMMINS, T.R.; BLACK, J.A.; WAXMAN, S.G. Sodium channels in normal and pathological pain. **Annual Reviews Neuroscience**, v. 33, p. 325-347, 2010

DOYLE, T. Targeting the overproduction of peroxynitrite for the prevention and reversal of paclitaxel-induced neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 6149-6160, 2012.

ELDABE, S.; BUCHSER, E.; DURTE, R.V. Complications of spinal cord stimulation and peripheral nerve stimulation techniques; a review of the literature. **Pain Medicine**, v. 17, p. 325-336, 2016.

ECHEVERRY, S.; SHI, X.Q.; RIVEST, S.; ZHANG, J. Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier function and molecular integrity

through a selective inflammatory pathway. **Jornal of Neuroscience.**, v. 31, p. 10819-10828, 2011.

ELSHAMA, S.S.; KENAWY, E.M.E.; OSMAM, H.EH. Toxicological evaluation of subchronical use of pioglitazone in mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences.**, v. 19, p. 712-719, 2016.

FAN, W.; EVANS, R. PPARs and EERs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. **Current Opinion in Cell Biology.**, v. 33, p. 49-54, 2015.

FILIPOVA, E.; UZUNOVA, K.; KALINOV, K.; VEKOV, T. Effects of pioglitazone therapy on blood parameters, weight and BMI: a meta-analysis. **Diabetology & Metabolic Syndrome.**, v. 9, p. 1-11, 2017.

FINNERUP, N.B. et al. Neuropathic pain: an update grading system for research and clinical practice. **Pain.**, v. 157, p. 1599-1606, 2016.

FINNERUP, N.B.; ATTAL, N. Pharmacotherapy of neuropathic pain: time to rewrite the rulebook? **Pain Management Journal.**, v. 6, p. 1-3, 2016.

FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. **Biomed Research International.**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

GAUCHAN, P.; ALDOH, T.; KATO, A.; KURAIISHI, Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. **Neuroscience Letters.**, v. 458, p. 93-95, 2009.

GAWLY, H.W.; TAWFIK, M.K.; RASHWAN, M.E.; BARUZAIG, A.S. The effect of pioglitazone on the liver of streptozocin-induced diabetic albino Wistar rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences.**, v. 13, p. 443-451, 2009.

GÉLINAS, D.S.; LAMBERMON, M.H.L.; MCLAURIN, J. Ciglitazone increases basal cytokine expression. In the central nervous system of adult rats. **Brain Research.**, v. 1034, p. 139-146, 2005.

GEWANDTER, J.S. Research design considerations for chronic pain prevention clinical trials. IMMPACT recommendations. **Pain.**, v. 156, p. 1184-1197, 2015.

GHOREISHI, Z. et al. Omega-3 fatty acids are protective against paclitaxel-induced peripheral neuropathy: a randomized double-blind placebo controlled trial. **BMC Cancer.**, v. 12, p. 355, 2012.

GORNIAK, B.G. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications. **Nutrition Journal.**, v. 13, 2014.

GRIFFITH, K.A. et al. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and identification of unique severity groups in colorectal cancer. **Journal of Pain and Symptom Management.**, p. 2-12, 2017.

GRIGGS, R.B.; DONAHUE, R.R.; ADKINS, B.G.; ANDERSON, K.L.; THIBAUT, O.; TAYLOR, B.K. Pioglitazone inhibits the development of hyperalgesia and sensitization of spinal nociceptive neurons in type 2 diabetes. **The Journal of Pain.**, v. 17, p. 359-373, 2016.

GUO, Z.; MAN, Y.; WANG, X.; JIN, H.; SUN, X.; SU, X.; HAO, J.; MI, W. Levo-tetrahydropalmatine attenuates oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia in mice. **Scientific Reports.**, v. 4, p. 1-4, 2014.

GWILYM, S.E.; FILIPPINI, N.; DOUAUD G.; CARR, A.J.; TRACEY, I. Thalamic atrophy associated with painful osteoarthritis of the hip is reversible after arthroplasty: a longitudinal voxel-based morphometric study. **Arthritis and Rheumatology.**, v. 62, p. 2930-2940, 2010.

HAROUTOUNIAN, S. et al. Primary afferent input critical for maintaining spontaneous pain in peripheral neuropathy. **Pain.**, v. 155, p. 1272-1279, 2014.

HARUKI, H.; PEDERSEN, M.G.; GORSKS, K.I.; POJER, F.; JOHNSON, K. Tetrahydropterin biosynthesis as an off-target of sulfa drugs. **Science.**, v. 340, p. 987-991, 2013.

HSIEH, Y.L.; FAN, Y.C.; YANG, C.C. Low-level therapy alleviates mechanical and cold allodynia induced by oxaliplatin administration in rats. **Support Care Cancer.**, p. 1-10, 2015.

ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature.**, v. 347, p. 645-650, 1990.

JOSEPH, E.K.; LEVINE, J.D. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. **Pain.**, v. 10, p. 534-541, 2009.

KANBARA, T.; NAKAMURA, A.; SHIBASAKI, M.; MORI, T.; SUZUKI, T.; SAKAGUCHI, G.; KANEMASE, T. Morphine and oxycodone, but not fentanyl, exhibit antinociceptive effects mediated by G-protein inwardly rectifying potassium ( GIRK ) channels in a oxaliplatin-induced neuropathy rat model. **Neuroscience Letters.**, v. 580, p. 119-124, 2014.

LAPOINTE, N.E. et al. Effects of eribulin, vincristine, paclitaxel and ixabepilone on fast axonal transport and kinesin-1 driven microtubule gliding: implications for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Neurotoxicology.**, v. 37, p. 231-239, 2013.

LATREMOLIERE, A.; LATINI, A.; ANDREWS, N.; CRONIN, S.J.; FUJITA, M.; GORSKA, K.; HOVIUS, R.; ROMERO, C.; CHUAIPHICHAJ, S.; PAINTER, M.; MIRACCA, G.; BABANIYI, O.; REMOR, A.P.; DOUNG, K.; RIVA, P.; BARRET, L.B.; FERREIROS, N.; NAYLOR, A.; PENNINGER, J.M.; TEGEDER, I.; ZHONG, J.; BLAGG,

J.; CHANNON, K.M.; JOHANSSON, K.; COSTIGAN, M. WOOLF, C.J. Reduction of neuropathic and inflammatory pain through inhibition of the tetrahydrobiopterin pathway. **Neuron.**, v. 86, p. 1393-1406, 2015.

LEHMANN, H.C.; CHEN, W.; BORZAN, J.; MANKOWSKI, J.L. HOKE, A. Mitochondrial dysfunction in distal axons contributes to human immunodeficiency virus sensory neuropathy. **Annals of Neurology.**, v. 68, p. 100-110, 2011.

LI, D.; LEE, Y.; KIM, W.; LEE, K.; BAE, H.; KIM, S.K. Analgesics effects of bee venom derived phospholipase A2 in a mouse model of oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Toxins.** v. 7, p. 2422-2434, 2015.

LINSCHIED, P.; KELLER, U.; BLAU, N.; CHAER, D.S.; MULLER, B. Diminished production of nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin by rosiglitazone in adipocytes. **Biochemical Pharmacology.**, v. 65, p. 593-598, 2003.

LOLIGNIER, S; BONNET, C.; GAUDIOSO, C.; NOEL, J.; RUEL, J.; MURIEL, A.; FERRIER, J.; DESPOIX, L.R.; BOUVIER, V.; AISSOUNI, Y.; PRIVAL, L.; PADILHA, F.; ESCHALIER, A.; DELAS, P.; BUSSEROLLES, J.; CHAPUY, E. The Na<sub>v</sub>1.9 channel is a key determinant of cold pain sensation and cold allodynia. **Cell Reports.**, v.11, p. 1067-1078, 2015.

LOPRINZI, C.L. et al. Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of intravenous calcium and magnesium to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 997-1005, 2014.

LOURENÇO, M.V.; LEDO, J.I.I. Targeting alzheimer's pathology through PPAR $\gamma$  signaling: modulation of microglial function. **Journal of Neuroscience.**, v. 33, p. 5083-5084, 2013.

LU, R.; KALLENBORN-GERHARDT, W.; GEISLINGER, G.; SCHMIDTKO, A. Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. **Plos One.**, v.6, 2011.

MANELLI, L.C.; ZANARDELLI, M.; FAILI P.; GHELARDINI, C. Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin. **Journal of Pain.**, v. 13, p. 276-284, 2012.

MANELLI, L.C.; ZANARDELLI, M.; FAILI P.; GHELARDINI, C. Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: Could it correlate with in vivo neuropathy? **Free Radical Biology and Medicine.**, v. 61, p. 143-150, 2013.

MANELLI, L.C.; ZANARDELLI, M.; MICHELI, L. GHELARDINI, C. PPAR $\gamma$  impairment alters peroxisome functionality in primary astrocyte cell cultures. **BioMed Research International.**, p. 1-11, 2014.

MASSICOT, F.; HACHE, G.; DAVID, L.; CHEN, D.; LEUXE, C.; LEGRAND, L.G.; RAT, P.; LAPREVOTE, O.; COUDORE, F. P2X7 cell death receptor activation and mitochondrial impairment in oxaliplatin-induced apoptosis and neuronal injury: cellular mechanisms and in vivo approach. **Plos One.**, v. 8, p. 1-15, 2013.

MCNAMEE, K.E.; ALZABIN, S.; HUGHES, J.P.; ANAD, P.; FELDMANN, M.; WILLIAMS, R.O.; INGLIS, J.J. IL-17 induces hyperalgesia via TNT-dependent neutrophil infiltration. **Pain.**, v. 152, p. 1838-1845, 2011.

MIHARA, Y.; EGASHIRA, N.; SADA, H.; KAWASHIRI, T.; USHIO, S.; YANO, T.; IKESUE, H.; OISHI, R. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. **Molecular Pain.**, v. 7, p. 1-7, 2011.

MILTON, F.A.; LACERDA, M.G.; SINOTI, S.B.P.; MESQUITA, P.G.; PRAKASAN, D.; COELHO, M.S.; LIMA, C.L.; MARTINI, A.G.; PAZZINE, G.T.; BORIN, M.F.; AMATO, A.A.; NEVES, F.A.R. Dibutyltin compounds effects on PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  activity, adipogenesis, and inflammation in mammalian cells. **Frontiers in Pharmacology.**, v.8, p. 1-11, 2017.

MOREIRA, D.R.M.; SANTOS, D.S.; SANTO, R.F.E.; SANTOS, F.E.; OLIVEIRA, G.B.F.; LEITE, A.C.L.; SOARES, M.B.P.; VILLAREAL, C.F. Structural improvement of new thiazolidinones compounds with antinociceptive activity in experimental chemotherapy-induced painful neuropathy. **Chemical Biology and Drug Design** v. 90, p. 297-307, 2017.

MORGENWECK, L.; GRIGGS, R.B.; DONAHUE, R.R.; ZADINA, J.E.; TAYLOR, B.K. PPAR $\gamma$  activation blocks development and reduces established neuropathic pain in rats. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 236-246, 2013.

NAIM, M.J.; ALAM, M.J.; AHMAD, S.; NAWAZ, F.; SHRIVASTAVA, N.; SAHU, M.; ALAM, O. Therapeutic journey of 2,4-thiazolidinediones as a versatile scaffold: an insight into structure activity relationship. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 129, p. 218-150, 2017.

OGNJANOVIC, B.I.; DJORDJEVIC, N.G.; MATIC, M.M.; OBRADOVIC, J.M.; MLADENOVIC, J.M.; STAJN, A.S.; SAICIC, Z. Lipid peroxidative damage on cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 1790-1803, 2012.

OVERMAN, M.J.; MARU, D.M.; CHARNSANGAVEJ, C.; LOYER, E.M.; WANG, H.; PATHAK, P. Oxaliplatin-mediated increase in spleen size as a biomarker for the development of hepatic sinusoidal injury. **Journal of Clinical Oncology** v. 28, p. 2549-2555, 2010.

PARK, J.H.; CHAE, J.; ROH, K.; KIL, E.J.; LEE, M.; AUH, C.K.; LEE, M.A.; YEOM, C.H.; LEE, S. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via TRPA1 stimulation in mice dorsal root ganglion is correlated with aluminum accumulation. **Plos One**, v. 10, p. 1-20, 2015.

PFAU, D.DB.; KLEIN, T.; POGATZKI-ZAHN, E.M.; TREEDE, R.D.; MAGERL, W. analysis of hyperalgesia time courses in humans after painful

electrical high-frequency stimulation identifies a possible transition from early to late LTP-like pain plasticity. **Pain.**, v. 152, p. 1532-1539, 2011.

PILIPOVIC, K., ZUPAN, Z.; DOLENEC, P.; PELCIC, J.M.; ZUPAN, G. A single dose of PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone reduces cortical oxidative damage and microglial reaction following lateral fluid percussion brains injury in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.**, v. 59, p. 8-20, 2015.

PULVERS, J.N.; MARX, G. Factors associated with the development and severity of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: a systematic review. **Asian-Pacific Journal of Clinical Oncology.**, p. 1-11, 2017.

RAMIREZ, E.A.; LORPINZI, C.L.; WIENDEBANK, A.; TA, L.E. Neuropathic pain: from mechanism to clinical application. **InTech.**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/55277> Acesso em 31 ago 2017.

RENN, C.L.; CAROZZI, V.A.; RHEE, P.; GALLOP, D.; DORSEY, S.G.; CAVALETTI, G. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. **Molecular Pain.**, v. 7, p 1-13, 2011.

RIBEIRO, D.; CASTRO, I.; FAHIMI, H.D.; SCHRADER, M. Peroxisome morphology in pathology. **Histology and Histopathology.**, v. 27, p. 661-676, 2012.

SAHA, S.K.; EMRAN, A.A.; SARKER, M.; UDDIN, M.A.; CHOWHHURY, A.K.; BACHAR, S.C. Biochemical alterations and liver toxicity analysis with pioglitazone in healthy subjects. **Drug and Chemical Toxicology.**, v.36, p. 149-154, 2013.

SAITO, T.; MORIYAMA, H.; KURIMOTO, T.; YAMADA, T.; INADA, E.; KANMURA, Y. Resolution of inflammation by resolvin D1 is essential for peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated analgesia during postincisional pain development in type 2 diabetes. **Anesthesiology.**, v. 123, p. 1420-1434, 2015.

SANTIN, J.R.; UCHOA, F.D.T.; LIMA, M.C.A.; RABELLO, M.M.; MACHADO, I.D.; HERNANDES, M.Z.; AMATO, A.A.; MILTON, F.A.; WEBB, P.; NEVES, F.A.R.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; FARSKY, S.H.P. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **European Journal Of Sciences.**, v. 48, p. 689-697, 2013.

SANTOS, E.W.; OLIVEIRA, D.C.; HASTREITER, A.; SILVA, G.B.; BELTRAN, J.S.O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A.R.; NEVES, S.M.P.; FOCK, R.A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/1, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v. 53, p. 138-145, 2016.

SAYIN, V.I.; IBRAHIM, M.X.; LARSSON, E.; NILSSON, J.A.; LINDAHL, P.; BERGO, M.O. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. **Science Translational Medicine.**, v. 6, p. 221, 2014.

SCHIFFRIN, E.L.; AMIRI, F.; BENKIRANE, K.; IGLARZ, M.; DIEP, Q.N. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors – vascular and cardiac effects in hypertension. **Hypertension.**, v. 42, p. 664-668, 2003.

SCHRADER, M.; FAHIMI, I.D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1763, p. 1755-1766, 2006.

SCHULZE, C.; MCGOWAN, M.; JORDT, S.E.; EHRLICH, B.E. Prolonged oxaliplatin exposure alters intracellular calcium signalling: a new mechanism to explain oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **Clinical Colorectal Cancer.**, v. 10, p. 126-133, 2011.

SCUTERI, A.; GALIMBERTI, A.; RAVASI, M.; PASINI, S.; DONZELLI E.; CAVALETTI, G.; TREDICI, G. NGF protects dorsal root ganglion neurons from oxaliplatin by modulating JNK/Sapk and ERK1/2. **Neuroscience Letters.**, v. 486, p. 141-145, 2010.

SHANKAR, G.A.; KALLANAGOUDA, R.A. New thiazolidinedione-5-acetic acid amine derivatives: synthesis, characterization and investigation

of antimicrobial and cytotoxic properties. **Medicinal Chemistry Research.**, 21, p. 816-824, 2012.

SHIMIZU, S.; SHIOTA, K.; YAMAMOTO, S.; MIYASAKA, S.; ISHII, M.; WATABE, T.; NISHIDA, M.; MORI, Y.; YAMAMOTTO, T.; KIUCHI, Y. Hydrogen peroxide stimulates tetrahydrobiopterin synthesis through the induction of GTP-cyclohydrolase I and increases nitric oxide synthase activity in vascular endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine.**, v. 34, p. 1343-1352, 2003.

SISIGNANO, M.; BARON, R.; SCHOLICH, K.; GEISLINGEL, G. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology.**, v. 10, p. 694-707, 2014.

SMITH, E.M.L.; PANG, H.; CIRRINCIONE C. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy; a randomized clinical trial. **JAMA.**, v. 308, p. 1359-1367, 2013.

SOBRERO, A.F.; SHIELDS, A.F.; YOSHINO, T.; PAUL, J.; TAIEB, J.; SOUGKLAKOS, I.; KERR, R.; LABIANCA, R.; MEYERHARDY, J.A.; BONNETAIN, F.; WATANABE, T.; BOULOVINAS, I.; RENFRO, L.A.; GROTHEY, A.; NIEDZWIECKI, D.; TORRI, V.; ANDRE, T.; SARGENT, D.J.; IVESON, T. Prospective pooled analysis of six phase III trials investigating duration of adjuvant oxaliplatin-based therapy ( 3 vs 6 months ) for patients with stage III colon cancer: The IDEA ( International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy ) collaboration. **ASCO Proceedings.**, 2017.

SOUZA, D.B.; MANNELLI, L.D.C.; ZANARDELLI, M.; MICHELI, L.; SOUZA, R.L.N.; SOUZA, A.C.; GHELARDINI, C. Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: effect on the 5HT<sub>2c</sub> receptor. **European Journal of Pharmacology.**, v. 735, p. 141-149, 2014.

SPROWL, J.A.; CIARIMBOLI, G.; LANCASTER, C.S.; GIOVINAZZO, H.; GIBSON A.A.; DU, G.; JANKE, L.J., CVALETTI, G. SHIELDS, A.F.; SPARREBOOM, A. Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent

on the organic cation transporter OCT2. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 110, p. 11199-11204, 2013.

STAROBOVA, H.; VETTER, I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 1-21, 2017.

TA, L.E.; BIEBER, A.J.; CARLTON, S.M.; LOPRINZI, C.L.; LOW, P.A.; WINDEBANK, A.J. Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. **Molecular Pain**, v. 6, 2010.

TABASSUM, H.; MOHAMMAD, W.; PARVEZ, S.; QURESHI, M.I. Oxaliplatin-induced oxidative stress provokes toxicity in isolated rat liver mitochondria. **Archives of Medical Research**, v. 46, p. 597-601, 2015.

TAKAHASHI, Y.; HASEGAWA-MORIYAMA, M.; SAKURAI, T.; INADA, E. The macrophage-mediated effects of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuate tactile allodynia in the early phase of neuropathic pain development. **Anesthesia and Analgesia**, v. 113, p. 398-404, 2011.

THANGAVEL, N.; BRATTY, M.A.; JAVED, S. A.; AHSAN, W.; ALHAZMI, H.A. Targeting peroxisome proliferator-activated receptors using thiazolidinediones: strategy for design of novel antidiabetic drugs. **International Journal Of Medicine Chemistry**, p. 1-20, 2017.

TODD, A. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 823-836, 2010.

TOYAMA, S.; SHIMOYAMA, N.; ISHIDA, Y.; KOYASU, T.; SZETO, H.H.; SHIMOYAMA, M. Characterization of acute and chronic neuropathies induced by oxaliplatin in mice and differential effects of a novel mitochondrial-targeted antioxidant on the neuropathies. **Anesthesiology**, v. 120, p. 459-473, 2014.

TROMPIER, D.; VEJUX, A.; ZARROUK, A.; GONDCAILLE, C.; GEILLON F. Brain peroxisomes. **Biochemic.**, v. 98, p. 102-110, 2014.

TSUBACKI, M.; TAKEDA, T.; TANI, T.; SHIMAOKA, H.; SUZUYAMA, N.; SAKAMOTO, K.; FUJITA, A.; OGAWA, N.; ITOH, T.; IMANO, M.; FUNAKAMI, Y.; ICHIDA, S.; SATOU, T. PKV/MEK inhibitors suppress oxaliplatin-induced neuropathy and potentiate the antitumor effects. **International Journal of Cancer.**, v. 137, p. 243-250, 2015.

USHIO, S.; EGASHIRA, N.; SADA, H.; KAWASHIRI, T.; SHIRAHAMA, K.; OISHI, R. Goshajinkigan reduces oxaliplatin-induced peripheral neuropathy without affecting anti-tumor efficacy in rodents. **European Journal of Cancer.**, v.48, p. 1407-1413, 2012.

VAN HECKE, O.; AUSTIN, S.K.; KHAN, R.A.; SMITH, B.H.; TORRANCE, N. Neuropathic pain in the general population; a systematic review of epidemiological studies. **Pain.**, v. 155, p. 654-662, 2014.

VON HEHN, C.A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 638-652, 2012.

WASEEM, M.; PARVEZ, S. Neuroprotective activities of curcumin and quercetin with potential relevance to mitochondrial dysfunction induced by oxaliplatin. **Protoplasma.**, v.253, p. 417-430, 2016.

WEINER, M.; SARANTOPOULOS, C.; GORDON, E. Transdermal buprenorphine controls central neuropathic pain. **Journal of Opioid Management.**, v. 8, p. 414-415, 2012.

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **The Journal Of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010.

WUERTZ, B.R.; DARRAH, L.; WUDEL, J.; ONDREY, F.G. Thiazolidinediones abrogate cervical cancer growth. **Experimental Cell Research.**, v. 353, p. 63-71, 2017.

XIAO, W. H.; ZHENG, H.; BENNETT, G. L. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy by paclitaxel. **Neuroscience.**, v. 203, p. 194-206, 2012.

YARNITSKY, D. Role of endogenous pain modulation in chronic pain mechanisms and treatment. **Pain.**, p. 24-31, 2015.

YOON, S.Y.; ROBINSON, C.R.; ZHANG, H.; DOUGHERTY, P.M. Spinal astrocyte gap junction contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. **Journal of Pain.**, v. 14, p. 205-214, 2013.

ZANARDELLI, M.; MICHELI, L.; CINCI, L.; FAILLI, P.;GHELARDINI, C.; MANELLI, L.C. Oxaliplatin neurotoxicity involves peroxisome alterations. PPAR $\gamma$  agonism as preventive pharmacological approach. **Plos One.**, v 9, p 1-15, 2014.

ZHAO, M.; ISAMI, K.; NAKAMURA, S.; SHIRAKAWA, H.; NAKAGAWA, T.; KANEKO, S. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. **Molecular Pain.**, v. 8, p. 1-11, 2012.

ZHENG, H.; XIAO, W.; BENNETT, G.J. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel an oxaliplatin evoked painful peripheral neuropathy. **Experimental Neurology.**, v. 232, p. 154-161, 2011.

ZHENG, H.; XIAO, W.; BENNETT, G.J. Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Experimental Neurology.**, v. 238, p. 225-234, 2012.

ZHOU, X.; HANSSON, G.K. Effect os sex and age on serum biochemical reference ranges in C57BL/6J mice. **Comparative Medicine.**, v. 54, p. 176-178, 2004.

ZIMCIKOVA, E.; SIMKO, J.; KARESOVA, I.; KREMLACEK, J.; MALAKOVA, J. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: are the effects on mood and behavior detectable in open-field test? **Seizure.**, v. 52, p. 35-40, 2017.