



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIA ISABEL CARNEIRO DE AZEVEDO

EFEITO DOS FLAVONÓIDES RUTINA E QUERCETINA NA
NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA
POR OXALIPLATINA

Fortaleza

2012

Maria Isabel Carneiro de Azevedo

**EFEITO DOS FLAVONÓIDES RUTINA E QUERCETINA NA
NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA
POR OXALIPLATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mariana Lima Vale

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
(LAFICA) da Universidade Federal do Ceará

Fortaleza

2012

MARIA ISABEL CARNEIRO DE AZEVEDO

**EFEITO DOS FLAVONÓIDES RUTINA E QUERCETINA NA
NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR
OXALIPLATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Mariana Lima Vale (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará – UFC

A meus pais (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus pelo dom da vida, pela força, paciência e determinação para a realização e conclusão deste trabalho. Obrigada, Senhor.

A minha eterna gratidão, com emoção verdadeira, à minha orientadora Prof^a Mariana Vale, por ter sido verdadeiramente minha estrela guia neste trabalho e mais ainda pela amizade que me dedicou e pelas lições de firmeza e disciplina, que aliadas a seu brilhantismo intelectual, muito contribuíram no meu crescimento científico. Obrigado Professora.

Agradeço ao Prof. Ronaldo Ribeiro, nosso mestre principal do LAFICA, que com sua onipresença no laboratório, nos faz construir ao seu redor laços de boa convivência. Obrigado professor pela sua disponibilidade e amizade.

Agradeço também aos professores do LAFICA, Prof. Roberto César, Prof. Pedro Marcos, Prof. Marcellus Henrique, todas presenças amigas e solícitas sempre disponíveis quando necessário.

Agradeço ainda às professoras do departamento de Morfologia, Prof^a GerlyAnne, Prof^a Gutencilda, Prof^a Renata Leitão, e às funcionárias Socorro, Josiane e Andrea.

Às professoras da Banca de qualificação Prof^a Geane Matos de Andrade e Prof^a Flávia Santos por prontamente aceitarem meu convite, e também agradeço antecipadamente aos professores da Banca de defesa Prof. Ronaldo Ribeiro e Prof^a Ana Maria Assreuy pela disponibilidade pronta em colaborar com este trabalho.

Um agradecimento especial a Deysi Viviana, pela sua ajuda valiosa na minha pesquisa, além do obrigado também pela carinho da sua amizade.

Agradeço ainda às colegas do LAFICA, Karoline Saboia, Ana Paula Macedo, Juliana Lino, e obrigado muito especial a Ana Paula Fragoso que muito me ajudou nessa pesquisa e também pelo seu carinho e amizade. E ainda ao Fábio, presença constante no Lafica, sempre solícito e risonho. Obrigado.

Aos estudantes da graduação Anamaria, minha companheira de experimentos, à Joana, Ricardo e Flávio. E ainda um obrigado especial ao Caio Abner por ter cedido seus desenhos quando solicitei.

A minha gratidão profunda à Vandinha, que é o nosso anjo do Lafica, e é uma presença chave com sua experiência e disposição de ajudar tanto com os experimento como junto ao animais de pesquisa, e também ao apoio técnico da Tiara, Carol, Karine e Álvaro.

Um agradecimento especial também às secretárias do Departamento de Ciências Médicas, Ritinha e Ivone, pela sua dedicação e eficiência, além do carinho e disponibilidade que sempre me dedicaram.

Aos funcionários do biotério pela dedicação em cuidar dos nossos animais de pesquisa, principalmente ao Haroldo, pela sua disponibilidade e colaboração.

Agradeço a meu filho, fonte inesgotável do meu amor, que junto com meu neto recarregava minhas energias com seu carinho e alegria. È pra eles que dedico também este trabalho. A meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando com seu amor e admiração, sempre me incentivando e cuidando de mim.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho, e ao Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,
CNPq e à CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de
Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos

“Sua visão só ficará clara quando
você olhar em seu coração. Quem
olha para fora sonha, quem olha
dentro desperta”.

Carl Gustav Jung

RESUMO

Oxaliplatina (OXL) é um agente antineoplásico de terceira geração, com potente atividade citotóxica em vários tipos de câncer, mas apresenta um efeito neurotóxico importante que causa uma severa e dolorosa neuropatia periférica. Dados da literatura também sugerem que o efeito neurotóxico inicial da OXL seria dependente do estresse oxidativo, nos tecidos periféricos. Os flavonóides Rutina (RT) e Quercetina (QC) foram descritos como agentes protetores celulares por sua ação antioxidante, assim como por seus efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos. O objetivo deste estudo é investigar o efeito do tratamento com RT e QC na neuropatia sensitiva periférica (NSP) induzida pela OXL em camundongos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (n° 36/2011). A neuropatia sensitiva foi induzida em camundongos *Swiss* machos (25-30 g), através de duas injeções por semana de OXL (1 mg/kg, e.v.) durante 4,5 semanas, no total de nove injeções, juntamente com a avaliação de testes nociceptivos semanais. Alodínia térmica foi avaliada pelo teste de imersão da cauda em água fria (10 °C), e hipernocicepção mecânica plantar pelo teste eletrônico de *Von Frey*. Os animais tratados com OXL foram divididos nos grupos: grupo controle (pré-tratado com salina), e três grupos pré-tratados com RT ou QC (25, 50 e 100 mg/kg, i.p), 30 min antes de cada injeção de OXL. No final dos experimentos, as medulas espinhais foram removidas e processadas para avaliação histopatológica e imunohistoquímica. Em outros experimentos a medula espinha também foi retirada para testes bioquímicos (MDA e NP-SH). Nossos resultados mostraram que a OXL reduziu significativamente ($p < 0,05$) tanto o limiar nociceptivo térmico como mecânico. O tratamento com QC, preveniu esses efeitos ($p < 0,05$) em todas as doses (efeito máximo na dose de 50 mg/kg), aumentando o limiar em 68,6 % para alodínia térmica e em 47,6 % para hipernocicepção mecânica. O tratamento com RT também preveniu esses efeitos ($p < 0,05$) em todas as doses (efeito máximo na dose de 50 mg/kg) aumentando o limiar em 448 % para alodínia térmica e em 25,5 % para hipernocicepção mecânica. A imunohistoquímica mostrou que a RT e QC diminuíram a imunoexpressão para c-fos, NOSi (óxido nítrico sintase induzida) e nitrotirosina, no corno posterior da medula espinhal, quando comparada ao grupo controle. OXL aumentou significativamente os níveis de MDA, mas não de NP-SH com inibição pelo tratamento com RT e QC. Nossos resultados mostraram que RT e QC tem efeito antinociceptivo em ambos os testes, térmico e mecânico, juntamente com a inibição da imunoexpressão para c-fos pela QC na neuropatia sensitiva periférica da OXL. Além disso, a QC foi capaz de inibir a imunoexpressão para nitrotirosina e para NOSi no corno posterior da medula espinhal, indicando um possível mecanismo envolvendo NO e estresse oxidativo. Os dados sugerem que RT e QC podem ter um efeito neuroprotetor, vindo a ser uma alternativa promissora na prevenção a neuropatia sensitiva periférica causada pela OXL na quimioterapia do Câncer.

Palavras-chave: Oxaliplatina, dor, quercetina, rutina, neuropatia.

ABSTRACT

Oxaliplatin is a third-generation platinum compound and the first-line treatment for colorectal cancer. The main limiting factor in oxaliplatin treatment is painful neuropathy that is difficult to treat. This side effect has been studied for several years, but its full mechanism is still inconclusive, and effective treatment does not exist. Data suggest that oxaliplatin's initial neurotoxic effect is peripheral and oxidative stress-dependent. A spinal target is also suggested in its mechanism of action. The flavonoids rutin and quercetin have been described as cell-protecting agents because of their antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory actions. We proposed a preventive effect of these agents on oxaliplatin-induced painful peripheral neuropathy based on their antioxidant properties. Methods: Oxaliplatin (1 mg/kg, i.v.) was injected in male Swiss mice, twice per week for 4 weeks. The development of sensory alterations, such as thermal allodynia and mechanical hypernociception, was evaluated using the tail immersion test in cold water (10°C) and the von Frey test. Rutin and quercetin (25-100 mg/kg, i.p.) were injected 30 min before each oxaliplatin injection. The animals' spinal cords were removed for histopathological and immunohistochemical evaluation and malondialdehyde and non-protein sulfhydryl group assays. Results: Oxaliplatin significantly reduced thermal and mechanical nociceptive thresholds, effects prevented by quercetin and rutin at all doses. Fos immunostaining in the dorsal horn of the spinal cord confirmed these results. The oxidative stress assays mainly showed that oxaliplatin induced peroxidation in the spinal cord and that rutin and quercetin decreased this effect. The flavonoids also decreased inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunostaining in the dorsal horn of the spinal cord. These results suggest that nitric oxide and peroxynitrite are also involved in the neurotoxic effect of oxaliplatin and that rutin and quercetin can inhibit their effect in the spinal cord. We also observed the preservation of dorsal horn structure using histopathological analyses. Conclusions: Oxaliplatin induced painful peripheral neuropathy in mice, an effect that was prevented by rutin and quercetin. The mechanism of action of oxaliplatin appears to be at least partially oxidative stress-induced damage in dorsal horn neurons, with the involvement of lipid peroxidation and protein nitrosylation.

Keywords: Oxaliplatin, pain, rutin, quercetin, neuropathy.

LISTA DE FIGURAS

1	Análogos platinos usados na quimioterapia do câncer	18
2	Expectativa de vida do câncer colorretal metastático	21
3	Mecanismo de ação da oxaliplatina	22
4	Retirada de radicais livres pelo flavonóide	32
5	Organização da via nociceptiva	36
6	Estrutura básica do flavonóide	42
7	Estrutura química da rutina	43
8	Estrutura química da quercetina	44
9	Desenho esquemático do protocolo experimental	51
10	Desenho esquemático dos testes nociceptivos	53
11	Efeito antinociceptivo da rutina e quercetina na hipernocicepção mecânica plantar induzida pela oxaliplatina em camundongos	59
12	Efeito da rutina e quercetina sobre a alodínia ao frio (10 ^o) em camundongos tratados com OXL	60
13	Fotomicrografias do corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT).	62
14	Fotomicrografias da pele retirada das patas de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT).	63
15	Efeito da rutina e quercetina nos níveis de malondialdeído (MDA) e grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) na medula espinhal.	65
16	Fotomicrografias da imunexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT).	68
17	Fotomicrografias da imunexpressão para nitrotirosina no corno posterior da medula espinhal de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT).	69
18	Fotomicrografias da imunexpressão para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT).	70

LISTA DE TABELAS

1	Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma*.	17
2	Características clínicas da neuropatia induzida por oxaliplatina	24
3	Estudos clínicos de prevenção e tratamento da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina	29
4	Sintomas e sinais sensitivos na dor neuropática	38
5	Efeito da Rutina e Quercetina na imunexpressão da c-FOS, iNOS e Nitrotirosina no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos neuropatia dolorosa induzida pela oxaliplatina	67

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	delta
μ l	microlitro
μ l	micrômetro
AMPA	Alfaamino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropiónico
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativada
AVC	Acidente vascular cerebral
Ca ²⁺	Cálcio
CEPA	Comite de Etica em Pesquisa Animal
CGRP	Peptideo Relacionado ao Gen da Calcitonina
CTC-NCI	Critério de Toxicidade Comum – Instituto Nacional do Câncer
DACH	Diaminociclohexano
DFNS	Rede de Pesquisa Alemã em Dor Neuropática
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOC	Complexo de Oxaliplatina Desidratada
DTNB	Ácido Nitrobenzóico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOLFOX/FOX	5-Fluorouracil, Oxaliplatina e Leucovorin
FOS-jun	Fator de transcrição
FU	Fluorouracil
GABA	Ácido Gaba-aminobutírico
GDGF	Fatores de Crescimento Derivado da Glia
GDNF	Fator derivado do Crescimento do Nervo
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
GSH	Glutathiona Reduzida
H ₂ PO ₄	Dihidrogênio Fostado
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HO	Radical Hidroxil
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IB-4	Isolectin B4
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
K ⁺	Potássio
LAFICA	Laboratorio de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MG ⁺⁺	Magnésio
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B
NITRO	Nitrotirosina
NMDA	Ácido N-Metil-D-Aspartato

NO	Óxido Nítrico
NOSi	Oxido Nítrico Sintase Induzível
NOSn	Oxido Nítrico Sintase Neuronal
NSP	Neuropatia Sensitiva Periférica
NP-SH	Grupos Sulfidrilícos Não Proteicos
O2-	Superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO	Peroxinitrito
OSNS	Escala de Neurotoxicidade Específica da oxaliplatina
OXL	Oxaliplatina
PBS	Solucao Salina Tamponada
PFA	Paraformaldeído
Pt	Platino
Pt(dach)Cl	Monocloro(1,2,diaminociclohexano)
Pt(dach)Cl2	Dicloro(1,2-diaminociclohexano)platino
QT	Quercetina
QST	Teste Sensorial Quantitativo
RNA _m	Ácido Ribonucleíco Mensageiro
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RUT	Rutina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
TBARS	Teste das Substâncias Reativas ao Ácido tiobarbitúrico
TRPA1	Receptor Potencial Transitório Ankyrin 1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Neoplasias.....	16
1.2 Agentes platinos e tratamento quimioterápico no câncer.....	18
1.3 Oxaliplatina.....	20
1.3.1 Mecanismo de ação na quimioterapia.....	21
1.3.2 Farmacocinética.....	22
1.3.3 Efeitos adversos da oxaliplatina.....	23
1.3.4 Efeito neurotóxico.....	23
1.3.5 Avaliação clínica da dor em pacientes com neuropatia periférica induzida por oxaliplatina e estudos de tratamento.....	27
1.3.6 Estresse oxidativo e a neurotoxicidade da oxaliplatina.....	30
1.3.7 Substâncias antioxidantes e efeito protetor sobre neurônios	31
1.4 Dor nociceptiva.....	32
1.5 Dor neuropática.....	37
1.5.1 Modelos experimentais de dor neuropática.....	39
1.6 Flavonóides Rutina e Quercetina.....	41
1.6.1 Ação antioxidante da rutina e quercetina.....	42
1.7 Justificativa.....	46
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 Animais.....	50
3.2 Aspectos Éticos.....	50
3.3 Protocolo experimental e desenho do estudo.....	52
3.4 Indução da neuropatia sensitiva periférica por oxaliplatina.....	52
3.4.1 Diluição e Injeção da oxaliplatina.....	52
3.4.2 Testes Nociceptivos.....	52
3.5 Análise histopatológica.....	53
3.6 Análise imunohistoquímica.....	54

3.7	Ensaio bioquímico em tecido medular.....	55
3.7.1	Grupos sulfidrídicos não protéicos (NP-SH).....	55
3.7.2	Malondialdeído (MDA)	55
3.8	Análise estatística.....	56
4	RESULTADOS.....	57
4.1	Efeito da rutina e quercetina na hipernocicepção mecânica em camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina.....	58
4.2	Efeito da rutina e quercetina na alodínia térmica ao frio em camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina.....	58
4.3	Análise histopatológica do corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina e tratados com rutina e quercetina.....	61
4.4	Análise histopatológica da pele recolhida das patas dos camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina e tratados com rutina e quercetina.....	61
4.5	Efeito da rutina e quercetina na peroxidação lipídica induzida pela oxaliplatina, nos níveis de malonyaldeído (MDA) e grupos sulfidrídicos não protéicos (NP-SH).....	64
4.6	Análise imunohistoquímica do corno posterior da medula espinhal de camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina e tratados com rutina e quercetina.....	66
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias

As neoplasias representam a segunda maior causa de mortalidade no mundo, juntamente com as chamadas causas externas, sendo diagnosticados cerca de 10 milhões de novos casos a cada ano. As neoplasias malignas (Câncer) representam uma classe de doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células aberrantes. A invasão destrutiva de órgãos normais por estas células pode ser por extensão direta ou por disseminação à distância através do sangue, linfa ou superfície serosa e leva a perda de função dos órgãos atingidos e conseqüentemente à morte do organismo (SCHOITENJELD; BEEBE-DIMMER, 2006).

Atualmente o câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. Em países com grande volume de recursos financeiros, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon. Em países de baixo e médio recurso, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são válidas também para o ano de 2013 e apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata, pulmão, cólon, reto e estômago no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero, cólon, reto e glândula tireóide no sexo feminino (tabela 1), acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2011).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma*.

HOMENS			MULHERES		
Localização primária	Casos novos	%	Localização primária	Casos novos	%
Próstata	60.180	30,8%	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%	Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%	Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%	Glândula Tireóide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%	Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%	Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%	Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%	Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%	Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Próstata	60.180	30,8%	Mama Feminina	52.680	27,9%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer-INCA, 2010. *Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

É importante enfatizar que, de um modo geral, o termo câncer é empregado para designar mais de uma centena de diferentes doenças. Logo, não seria possível apresentar estimativas para cada localização. O desenvolvimento de várias formas comuns de câncer é resultado da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável desses fatores, a dieta. Uma dieta com base em um alto consumo de frutas, vegetais frescos, cereais e peixes, bem como a prática de atividade física estão associados a um baixo risco de desenvolvimento de câncer colorretal.

O número de agentes antineoplásicos tem crescido nas últimas décadas e contribuído para o aumento da sobrevivência de pacientes com inúmeros tipos de câncer. Entretanto, os efeitos adversos da quimioterapia se tornaram motivo de sofrimento para os pacientes e de limitação ao tratamento, como por exemplo, náuseas e vômitos, neutropenia, infecções, mucosites e neuropatias entre outros. (AUTHIER *et al.*, 2009). Esses fatores, além de prejudicar a qualidade de vida dos

pacientes, representam prejuízo à eficácia terapêutica, pois são freqüentes os atrasos em ciclos de tratamento subseqüentes, reduções de doses e baixa adesão por parte dos pacientes (SONIS *et al.*, 2004b; RUBENNSTEIN *et al.*, 2004).

1.2 Agentes platinos e tratamento quimioterápico no câncer

Desde 1960, uma grande quantidade de análogos platinos tem sido sintetizada com o intuito de aumentar a atividade antitumoral ou prevenção do câncer. Os compostos platinos (Pt) representam uma classe importante de drogas antitumorais sendo largamente utilizados no tratamento de um amplo espectro de tumores sólidas humanas, tais como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, como vemos na figura 1.

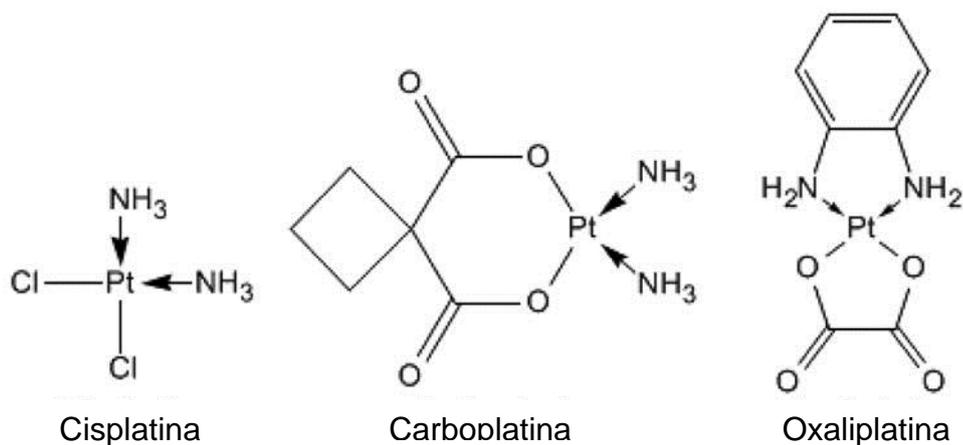


Figura 1. Análogos platinos usados na quimioterapia do câncer.
Fonte: MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009.

O primeiro composto metálico desenvolvido para o tratamento do câncer foi a cisplatina (cisdiaminodicloroplatino II) sintetizada no século XIX em 1844 por Reiset e Peyrone. Algum tempo depois em 1893 Werner idealizou a formação de dois compostos isômeros: trans 5, o complexo de Reiset e a forma cis, o composto de Peyrone (CHU *et al.*, 2004). Em 1961 foi observado por Barnett Rosenberg em Michigan (EUA) que essa molécula era capaz de inibir a mitose, experiência realizada com a bactéria *Escherichia coli* (ROSENBERG *et al.*, 1965). Em pesquisas subseqüentes, foi descoberto que eram formadas espécies complexas de Pt (platino), possíveis responsáveis pela inibição celular (CHU *et al.*, 2004). De posse desses resultados, compostos platinos passaram a ser sintetizados e testes em animais realizados. A molécula foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1978 e foi lançada no mercado americano sob o nome de Platinol. Foi usado no tratamento do câncer de ovário e testículo, que na época tinham alta mortalidade e tiveram eficácia quimioterápica de 80% (KELLAND, 2007). Sua utilização foi limitada pelos seus efeitos nefrotóxicos e ototóxicos importantes, além dos clássicos efeitos gastrointestinais.

Depois do avanço no campo da terapia antitumoral, objetivou-se a busca de novos compostos que mantivessem a atividade antitumoral da cisplatina com redução dos seus efeitos colaterais (HARRAP, 1985). Após a cisplatina, foi desenvolvido nos EUA, em Nova Jersey, a molécula de carboplatina (cis-diaminociclobutano-1,1- decarboxilato platino II), um platino de 2ª geração, originado da molécula de cisplatina e também tem o mesmo mecanismo de impedir a duplicação do DNA (LANORE; DELPRAT, 2004). Apresenta atividade similar e os efeitos colaterais renais e gastrointestinais são reduzidos pelo seu anel ciclobutano que produz redução na toxicidade da carboplatina. O seu efeito colateral mais importante é a leucopenia e até anemia. Pode haver mielossupressão grave e trombocitopenia como fator dose-limitante (KELLAND, 2007). Ela já foi bastante usada na década de 80 e é eficaz no tratamento do câncer de mama, ovário e pulmão (LEBWOHL; CANETTA, 1998). Os problemas com os compostos cisplatina e carboplatina se somaram ao mecanismo de resistência tumoral, que pode ser da sensibilidade reduzida do tumor ao quimioterápico usado, ou da adaptação da célula tumoral à droga durante o tratamento (CHU, 2004; FOLTINOVÁ *et al.*, 2008).

1.3 Oxaliplatina

Com o intuito de aumentar a atividade antitumoral e reduzir os efeitos tóxicos das drogas usadas, foi desenvolvida no Japão em 1970, a molécula de oxaliplatina, trans – I – diaminociclohexano- 2- OH (LEVI *et al.*, 2000), um composto de 3ª geração. Seu uso na clínica só teve início após mais de 10 anos de testes clínicos que revelaram a excelente atividade antineoplásica (MARSHALL, 2004). Esse composto, oxaliplatina (OXL) provocou grande euforia na época, porque não apresenta reação cruzada com a cisplatina e a carboplatina. Apesar de ser um composto de 3ª geração, a oxaliplatina tem potente atividade antitumoral em células humanas e a toxicidade diferente dos anteriores (KELLAND 2007; ARGYRIOU *et al.*, 2008).

Nos dias de hoje, utiliza-se a oxaliplatina em associação com o 5-fluorouracil (5-FU) e o leucovorin (LV) em um esquema denominado FOLFOX ou FOX, e constitui um dos esquemas de 1ª linha para o tratamento do câncer colorretal metastático (DE GRAMONT *et al.*, 2000), aprovado nos Estados Unidos em 2004, além de ser quimioterapia adjuvante de primeira linha (ANDRÉ *et al.*, 2004). A incorporação da oxaliplatina ou do Irinotecano à clássica associação de 5-FU + LV tem aumentado a expectativa de vida de pacientes portadores de câncer colorretal, conforme a **figura 2**, e mostrou atividade também no câncer de ovário avançado pré-tratado e não tratado, assim como na neoplasia de mama e pulmão (MACHOVER *et al.*, 1996; PETIT *et al.*, 2006). Os tumores de estômagos e do pâncreas, refratários à cisplatina, tiveram bons resultados com a oxaliplatina, conforme trabalhos recentes (LOUVET *et al.*, 2002).

A atividade antitumoral da OXL aumenta com o seu uso em combinação com outros agentes antineoplásicos (CHU, 2004). Assim sendo vimos que a principal utilização da oxaliplatina é na quimioterapia do câncer colorretal, de importância na estatística mundial do número de mortes por câncer, já que representa um dos cânceres mais agressivos. Com a introdução da oxaliplatina, a expectativa de vida aumentou de aproximadamente 6 meses para 20,3 meses, segundo a **figura 2** abaixo.

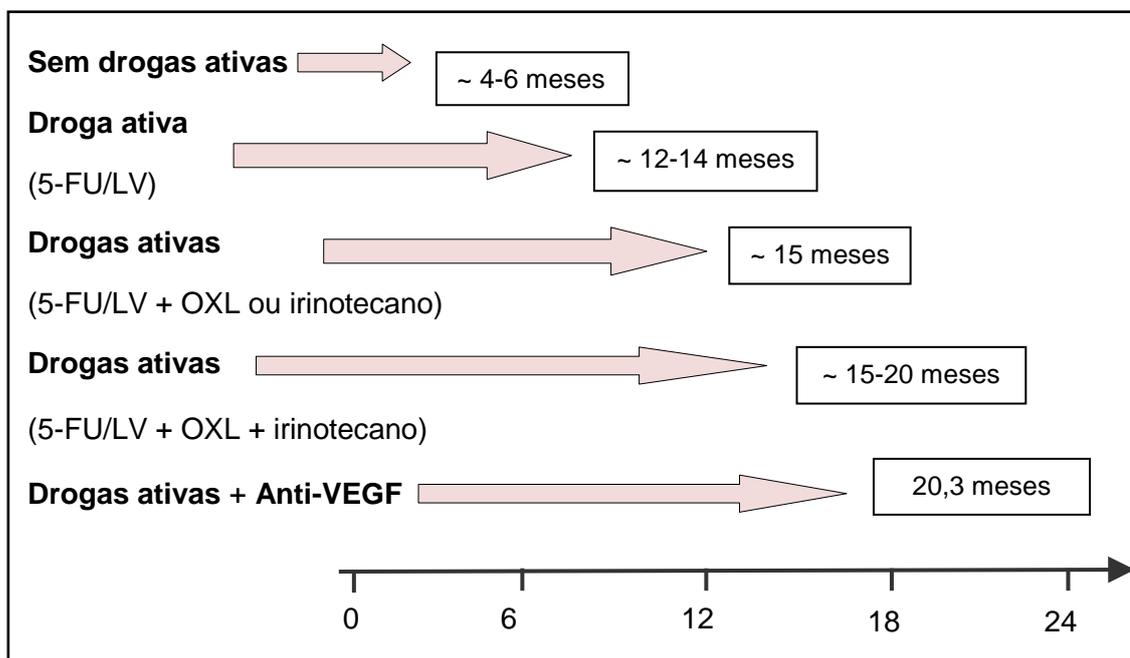


Figura 2. Expectativa de vida do câncer colorretal metastático. Fonte: CUTSEM; VERSLYPE; DEMEDTS, 2002; GOLDBERG *et al.*, 2003; HURWITZ, 2003. Legenda: FU - Fluorouracil, LV - Leucovorin, OXL - Oxaliplatina, VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular.

1.3.1 Mecanismo de ação na quimioterapia

O alvo da oxaliplatina é o DNA, onde há bloqueio da sua duplicação e sua atividade consiste em formar aductos do DNA, levando a apoptose celular. Como vemos na **figura 3**, quando a oxaliplatina atinge o vaso sanguíneo, ocorre o desacoplamento do grupamento oxalato da oxaliplatina, havendo a formação de intermediários não estáveis que são hidrolisados a espécies platinas, tais como o 1,2 dicloro (1,2-dach)platino ($Pt(dach)Cl_2$) e o monocloro(1,2-dach)platino ($Pt(dach)Cl$), os quais reagem instantaneamente com o DNA celular, proteínas e outras macromoléculas, resultando em apoptose celular (CHU, 2004; FOLTINOVÁ *et al.*, 2008). Os complexos de pt-DNA formados são capazes de interferir no metabolismo e organização celular (STILLMAN; CATA, 2006), e são mais tóxicos que os metabólitos da cisplatina/carboplatina (PARK *et al.*, 2008).

A presença do 1,2-Dach (diaminociclohexano) retido no DNA não permite que ocorra nova replicação pelo mecanismo de resistência presente na cisplatina (CVITKOVIC; BEKRADDA, 1999).

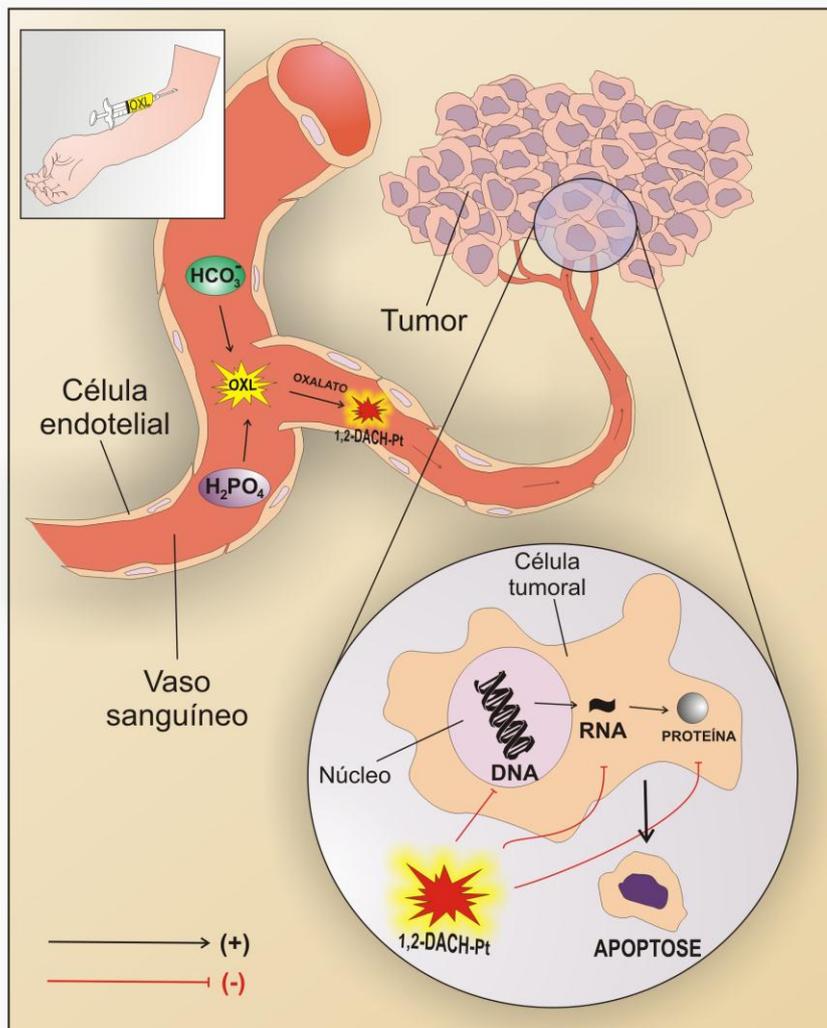


Figura 3. Mecanismo de ação da oxaliplatina
Fonte: Arcanjo, JL Dissertação de mestrado em farmacologia 2011.

1.3.2 Farmacocinética da Oxaliplatina

A oxaliplatina tem uma meia vida curta devida sua rápida captação pelos tecidos. Ela é largamente distribuída para a maioria dos tecidos, e tem um volume de distribuição mais elevado do que a cisplatina. Após 2-5 horas de infusão de oxaliplatina, 40% do platino se liga às hemácias formando produtos não tóxicos, 30

% do platino se liga às proteínas do plasma e os 30% restantes que correspondem ao platino ultrafiltrado, possuem a droga ativa, a oxaliplatina intacta, representando o componente citotóxico (CHU, 2004; JERREMALM, WALLIN, EHRSSON, 2009). Em relação ao metabolismo, os complexos formados na presença de cloreto e água (Pt(dach)Cl, Pt(dach)Cl₂, DOC (complexo de oxaliplatina desidratada), são mais citotóxicos do que a oxaliplatina, dentro da célula (JERREMALM, WALLIN, EHRSSON, 2009). A maior parte da droga é excretada pelos rins, com mais de 50% pela urina (CHU, 2004).

1.3.3 Efeitos colaterais da Oxaliplatina

A toxicidade da oxaliplatina difere de outros compostos platinos, Cisplatina e das drogas de segunda geração como a Carboplatina. (AUTHIER *et al.*, 2009), no entanto a oxaliplatina é o composto pt com efeitos colaterais menos severos. Dentre os efeitos adversos reportados tem sido descrito toxicidade hematológica mediana, toxicidade gastrointestinal (náusea, vômitos, diarreia), efeito nefrotóxico e ototóxico insignificantes, febre medicamentosa, reações de hipersensibilidade, fadiga e fibrose pulmonar. Contudo, a toxicidade mais importante relacionada à oxaliplatina, sem dúvida é a neurológica, a qual possui características próprias e passou a ser o fator dose limitante da quimioterapia com oxaliplatina (ARGYRIOU *et al.*, 2008).

1.3.4 Efeito neurotóxico

O efeito neurotóxico da oxaliplatina normalmente se tornou a causa mais comum dos pacientes interromperem o tratamento quimioterápico (McWHINNEY, GOLDBERG, MCLEOD, 2009), e é evidenciada como uma neuropatia sensitiva periférica (NSP), que acomete mais de 70% dos pacientes em tratamento com oxaliplatina. Seus efeitos tardios prejudicam a qualidade de vida dos pacientes (PARK *et at.*, 2009). A NSP pode ser de dois tipos: a primeira aguda e transitória, sendo uma neuropatia de incidência mais comum e que aparece geralmente nas primeiras horas ou dias após a infusão da oxaliplatina, em 85 a 95 % dos pacientes, o que difere totalmente da ação neurotóxica dos outros compostos platinos. A

segunda, uma NSP cumulativa (ARGYRIOU *et al.*, 2008) depende da dose e duração da terapia, promovendo em muitos casos, a limitação do tratamento, e que se parece mais com a neuropatia dos outros compostos platinos. Doses cumulativas maiores que 750 a 850 mg/m² de oxaliplatina podem induzir neuropatia crônica em 20% dos pacientes. Na tabela 2, podemos ver a distinção entre a NSP aguda e a NSP crônica, induzida pela oxaliplatina.

Tabela 2. Características clínicas da neuropatia induzida por oxaliplatina

	Oxaliplatina	
	Agudo	Crônico
Incidência	85-95%	Graus 3/4 em 16%
Dose limite de toxicidade	Não	Sim
Sintomas	Parestesia, disestesia	Parestesia, disestesia, ataxia sensorial
Localização	Extremidades, perioral	Extremidades
Ativação	Exposição ao frio	Nada sugerido
Sintomas motores	Espasmos musculares raros	Nenhum
Início	Agudo	Demorado
Recuperação	Rápida, completa	Devagar, mas completa
Dependência de modulação	Sim	Provavelmente não
Outros	Disestesias faringolaríngea	Nenhuma

Fonte: GROTHEY, 2003.

A síndrome aguda tem como sintomas, parestesias distais e peri-orais exacerbadas pelo frio e são descritas pelos pacientes como sensações de formigamento nas mãos, pés, boca e garganta. Podem ocorrer ainda sintomas como câimbras, espasmos tetânicos, miotonias, disestesias faringolaríngea com dificuldade de respiração e deglutição por apertamento mandibular, em 1-2 % dos pacientes (SCHIFF; WEN; VAN DEN BENT, 2009). Esses sintomas agudos provavelmente estão associados à toxicidade sensitiva da oxaliplatina, que causa a hiperexcitabilidade nervosa (MARSHALL, 2004).

Na quimioterapia onde os pacientes recebem doses maiores que 750 a 850 mg/m², costuma ocorrer a neuropatia crônica por oxaliplatina em 10 – 20% dos casos (GROTEY, 2003; PARK *et al.*, 2009). Ela é cumulativa, predomina com pronunciada disestesia e parestesia distais (sintomas sensitivos), principalmente nas mãos e pés, de duração gradual e prolongada que geralmente persiste entre os ciclos de tratamento e aumento de intensidade com os ciclos de quimioterapia. Ela progride com ataxia sensitiva, alteração proprioceptiva e déficit funcional, afetando severamente atividades cotidianas simples como escrever, abotoar camisas, segurar objetos e diminuir bastante a qualidade de vida de quem faz uso desse tratamento quimioterápico

Diferente da neuropatia aguda, os sintomas da neuropatia crônica não são exacerbados pelo frio (GROTEY, 2005; SAIF, REARDON, 2005), e podem ser parcialmente reversíveis em 80% dos pacientes, e completamente reversíveis em 40% deles, em até 6 – 8 meses após a descontinuação do tratamento com oxaliplatina (ARGYRIOU *et al.*, 2008). Essas evidências contestam a prática clínica, onde oncologistas afirmam que essa neuropatia nem sempre é reversível, podendo se prolongar por um tempo superior a 8 meses.

Ataxia sensorial pode se desenvolver, o que não deve ser confundido com o envolvimento de neurônios motores, pois a neuropatia por oxaliplatina é naturalmente sensitiva. Tem sido hipotetizada, como uma consequência da diminuição do metabolismo celular e transporte axonal, resultado do acúmulo de compostos de platina sobre as células da raiz dorsal da medula espinal (GROLLEAU *et al.*, 2001)

O exame histológico da neuropatia induzida por oxaliplatina, em modelos animais, revela perda axonal com atrofia de uma subpopulação específica de células do gânglio da raiz dorsal da medula espinal (GRD), os nociceptores IB4⁺ (JOSEPH *et al.*, 2008), sugerindo assim que a neuropatia deve ser melhor descrita como uma neuropatia sensitiva periférica (ARGYRIOU *et al.*, 2008). Ela é responsável pelo aparecimento de alterações morfológicas e estruturais nas células neuronais, tais como lesões nos corpos celulares (CAVALETTI *et al.*, 2001), alterações do núcleo e do nucléolo (CAVALETTI *et al.*, 2001; McKEAGE *et al.*, 2001), atrofia dos neurônios do GRD (JAMIESON *et al.*, 2005) e morte celular (TA *et al.*, 2006).

Existem dois critérios usados para avaliar a evolução da neuropatia causada pela oxaliplatina: a escala de neurotoxicidade específica da oxaliplatina e o critério de toxicidade comum do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (National Cancer Institute – NCI), que é o mais usado, como veremos a seguir (PARK *et al*, 2009):

Escala de neurotoxicidade específica da oxaliplatina

Grau 1: Disestesia ou parestesia que regredem completamente antes do próximo ciclo de terapia

Grau 2: Disestesia ou parestesia persistindo entre os ciclos de terapia

Grau 3: Disestesia ou parestesia causando comprometimento funcional

Critério de toxicidade comum do NCI - EUA

Grau 1: Assintomática – perda de reflexos do tendão profundo ou parestesia (incluindo formigamento) mas não interferindo na função

Grau 2: Alteração sensitiva ou parestesia (incluindo formigamento), interferindo na função, mas sem interferir nas atividades diárias

Grau 3: Alteração sensitiva ou parestesia interferindo nas atividades cotidianas

Durante algum tempo acreditava-se que a neuropatia sensorial dolorosa da oxaliplatina era um fenômeno reversível e trabalhos utilizando escalas gradativas baseadas em sintomas clínicos sugeriram isso (LAND *et al.*, 2007). Entretanto, mais recentemente, Pietrangeli, *et al* (2006) demonstraram em um estudo clínico que na verdade a neuropatia cumulativa da oxaliplatina é de longa duração e o dano neuronal não se reverte totalmente. Os déficits neurofisiológicos e clínicos persistem na maioria dos pacientes acompanhados até 2,5 anos após o término do tratamento (PARK *et al* 2011b). Nesse pensamento, e dado ao fato de que cada vez mais está se prescrevendo oxaliplatina para o tratamento do câncer colorretal, é crítica a importância de se identificar estratégias neuroprotetoras de significância comprovada através de estudos desenhados apropriadamente.

1.3.5. Avaliação clínica da dor em pacientes com neuropatia periférica induzida por oxaliplatina e estudos de tratamento

A avaliação das neuropatias causadas por quimioterápicos normalmente se limitam ao exame clínico convencional, já que a maioria dos testes neurofisiológicos são geralmente insensíveis para a detecção das neuropatias nos estágios iniciais (BINDER *et al.*, 2007). Ao longo dos anos em que se observou o surgimento de neuropatias decorrentes do tratamento oncológico, se observou também a falta de medidas objetivas para quantificar o grau de neurotoxicidade dos pacientes envolvidos. A maioria dos trabalhos mais antigos utilizava medidas subjetivas para avaliar o surgimento e o desenvolvimento das neuropatias.

Recentemente, a necessidade de se estudar o efeito de drogas neuroprotetoras, aliado ao fato de que testes subjetivos e sem recursos neurofisiológicos não chegavam a conclusões significativas, os estudos passaram a incorporar métodos mais objetivos. Foi constatado que neuroproteção é um conceito que envolve a proteção e recuperação dos componentes do sistema nervoso incluindo células, vias funcionais e suas estruturas. Para demonstrar uma neuroproteção efetiva de uma substância, devem-se realizar testes que avaliem a estrutura e função dos nervos ao invés de avaliações puramente sintomáticas (PARK *et al.*, 2011). Durante os últimos anos um crescente número de estudos vem utilizando e avaliando a versão clínica do Escore Total de Neuropatia (CAVALETTI *et al.*, 2007), como uma medida mais objetiva de se avaliar as neuropatias por quimioterápicos

Entendendo a importância da objetividade na avaliação dos pacientes expostos à toxicidade dos quimioterápicos, em 2007 Binder *et al.* propuseram um método de avaliação dos fenômenos de alodínia, hiperalgesia, disestesias e hipoestesias nos pacientes submetidos ao tratamento com oxaliplatina. Os pacientes envolvidos no estudo deveriam ser examinados o mais cedo possível após a quimioterapia e eram divididos em grupo com dor e grupo sem dor. Era então aplicado o teste sensorial quantitativo (QST) no dorso da mão direita. O TSN é um teste descrito pela Rede de Pesquisa Alemã em Dor Neuropática (DFNS) descrito

por Rolke *et al.* (2006). De forma resumida, o QST é um teste padronizado com 13 parâmetros não invasivos. Consiste da aplicação de estímulos para avaliar a detecção do limiar mecânico e vibratório (avaliação de fibras de grosso calibre – A beta) e limiar de detecção de frio, limiar de dor ao frio, detecção de calor, dor ao calor, limiar de dor mecânica e limiar de dor à pressão (avaliação das fibras de fino calibre – C e A delta). Além disso, avalia-se sintomas paradoxais, ratio de “wind up” e sensibilidade a alfinetada e a alodínia a estímulos táteis leves. Binder *et al* (2007) além do QST, também aplicaram questionários de avaliação de qualidade e intensidade de dor (Mc Gill Pain questionnaire).

A avaliação mostrou que a neuropatia aguda da oxaliplatina, causando sintomatologia dolorosa, é caracterizada por um perfil somatossensorial específico onde se encontra a hiperalgesia térmica ao frio e hiperalgesia mecânica além de hiperalgesia ao calor e hipoestesia a estímulos mornos. O trabalho sugere o uso de anticonvulsivantes e antidepressivos e supõe que o mecanismo envolva canais iônicos. Entretanto esse trabalho avaliou somente as alterações agudas.

Park *et al.* (2011) pontuam que o período de avaliação de neurotoxicidade da oxaliplatina deve ser padronizado para se evitar confusões com relação a fase aguda e crônica da neuropatia. Nessa publicação é feita uma dura crítica aos métodos utilizados por Grothey *et al.*, (2011) na avaliação do efeito neuroprotetor da infusão de cálcio/magnésio sobre a neurotoxicidade da oxaliplatina. Grothey *et al.* não levaram em consideração métodos objetivos e testes neurofisiológicos e também não padronizou um período de avaliação adequado. Segundo Park *et al* (2011), para diferenciar as fases (aguda / cumulativa), a fase cumulativa deve ser avaliada somente depois de 4 a 8 semanas após a última infusão, pois os sintomas neuropáticos costumam piorar depois do término do tratamento.

O tratamento da neuropatia induzida pela oxaliplatina é difícil e muitas vezes ineficaz. Em uma revisão recente Weickhardt, Wells e Messersmith (2011) discutem que pouco é conhecido sobre a melhor maneira de tratar a neurotoxicidade estabelecida, que é permanente em alguns pacientes, embora a venlafaxina tem se mostrado promissora em pequenos ensaios clínicos. Foram analisado os fatores de causa, a dimensão e o risco de neuropatia, e os potenciais tratamentos preventivos e terapêuticos para a oxaliplatina induzida por neuropatia. A **tabela 3** retirada e

adaptada desse artigo mostra os diversos estudos clínicos de prevenção e tratamento dessa condição.

Tabela 3. Estudos clínicos de prevenção e tratamento da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina

Estudos de prevenção da neuropatia induzida por Oxaliplatina		
Ref. do estudo	Intervenção	Resultados
OPTIMOX1 (Tournigand <i>et al.</i> , 2006)	FOLFOX-4 contínuo versus FOLFOX-7 intermitente	Nenhuma redução significativa na neuropatia grau 3 no braço intermitente
CONcePT (Hochster <i>et al.</i> , 2007)	Oxaliplatin continua versus oxaliplatina intermitente Ca/Mg versus placebo	Reduzida neuropatia grau 3 no braço intermitente Nenhuma redução na neuropatia grau 3 / 4 no grupo Ca / Mg
Gamelin <i>et al.</i> 2004	Ca / Mg versus controle histórico	Reduzida neuropatia grau 3 no grupo Ca / Mg
CAIRO2 trial (Knijn <i>et al.</i> , 2011)	Ca/Mg versus nenhum tratamento preventivo	Nenhuma redução na neuropatia grau 3 / 4 no grupo Ca / Mg
N04C7 trial (Grothey <i>et al.</i> , 2011)	Ca/Mg versus placebo	Reduzida neuropatia grau 2 ou pior no grupo Ca / Mg
Neuroxa trial (Gamelin <i>et al.</i> , 2008)	Ca/Mg versus nenhum tratamento preventivo	Reduzida neuropatia grau 3 no grupo Ca / Mg
Cascinu <i>et al.</i> 2002 Lin <i>et al.</i> 2006	Glutathione versus placebo N-acetylcysteine versus placebo	Reduzida neuropatia grau 3 com a glutathione Graus 04/02 de neuropatia reduzidos com N-acetilcisteína
Wang <i>et al.</i> 2007	Glutamine versus nenhum tratamento	Reduzida neuropatia grau 3 com glutamina
Lu <i>et al.</i> 2008	Amifostina versus glutamina	Graus reduzidos 1-2 e 3-4 no grupo amifostina
Guo <i>et al.</i> 2011	Ácido lipoico oral versus placebo	Não houve diferença estatística nos grupos de tratamento
Von Delius <i>et al.</i> 2007	Carbamazepina versus nenhum tratamento preventivo	Não houve diferença estatística nos grupos de tratamento
Argyriou <i>et al.</i> 2006	Oxcarbazepina versus nenhum tratamento preventivo	Redução da incidência de neuropatia no grupo oxcarbazepina
Mitchell <i>et al.</i> 2006	Gabapentina versus nenhum tratamento preventivo	Nenhuma redução na neuropatia
Durand <i>et al.</i> 2003 Cassidy <i>et al.</i> 2008	Venlafaxina versus placebo Xaliproden versus placebo	Reduzida neuropatia grau 3 Grau 3 reduzido durante o tratamento, mas nenhuma diferença depois de terminar o tratamento
Estudos de tratamento da neuropatia induzida por Oxaliplatina		
Ref. do estudo	Intervenção	Resultados
Durand <i>et al.</i> 2003	Venlafaxina versus placebo	Reduzida neuropatia grau 3
Rao <i>et al.</i> 2008	Lamotrigina versus placebo	Nenhuma redução na neuropatia

Fonte: Weickhardt ; Wells; Messersmith, 2011

1.3.6 Estresse oxidativo e a neurotoxicidade da oxaliplatina

O estresse oxidativo tem sido implicado em uma variedade de patologias do sistema nervoso central e periférico. A doença de Parkinson e a doença de Alzheimer são as que mais representam o dano oxidativo da célula nervosa (HALLIWELL,1992), assim como as neuropatias dolorosas agudas causadas pela quimioterapia com os compostos platinos como a oxaliplatina. A causa do estresse oxidativo é o dano provocado pela geração de radicais livres (elétrons desacoplados) que são conhecidos como espécies reativas ao oxigênio (ROS) e espécies reativas ao nitrogênio (RNS). Quando a formação dessas espécies reativas excede a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, ocorre a situação de estresse oxidativo. Os eventos em geral são precoces após a injúria, que podem afetar os lipídios das membranas celulares cerebrais, levando a mudança na integridade e fluidez dessas membranas (ANSARI *et al.*, 2010), sensíveis à peroxidação lipídica, que é o componente chave e é induzida pelo peroxinitrito (BAINS e HALL, 2011) que danifica irreversivelmente a membrana lipídica neuronal e através de sua interação com as proteínas, provoca mudança na função e estrutura protéica (ALVAREZ e RADÍ, 2003).

A toxicidade oxidativa é o principal caminho para a perda neuronal nessas doenças neurodegenerativas. Nos nociceptores periféricos, as ROS modulam atividade dos canais de sódio (GAMELIN *et al.*,2002; LAI *et al.*,2005), os quais foi sugerido,serem a causa da atividade aumentada nos nociceptores, como na dor neuropática aguda induzida pela oxaliplatina (KRISHNAN *et al.*, 2005).

Na clínica as substancias antioxidantes vem sendo estudadas na prevenção da neuropatia induzida por oxaliplatina. Em uma revisão de literatura recente Weickhardt, Wells e Messersmith (2011) discutem os diversos tratamentos utilizados na terapêutica e prevenção do problema. Glutathione, N-acetilcisteína, glutamina mostraram resultados promissores. A amifostina também apresentou resultados bons, sendo mais eficaz do que a glutamina quando administrada antes do inicio da quimioterapia por via subcutânea.

Recentemente, um estudo de Joseph *et al.* (2008), demonstrou que a oxaliplatina danifica nociceptores onde é sugerido que o mecanismo inicial de dano neural seria diretamente por estresse oxidativo. Foi visto que uma injeção endovenosa de

oxaliplatina promove uma hiperalgesia térmica e mecânica aguda, reduz limiares e aumenta respostas das fibras C nociceptivas à estimulação mecânica, confirmando local de ação periférico. Essa hiperalgesia não é inibida por substâncias que agem indiretamente como os inibidores de segundo mensageiros, mas sim por substâncias antioxidantes como vitamina C e L-carnitina, indicando que oxaliplatina age por um mecanismo direto envolvendo seletivamente um tipo específico de nociceptor (JOSEPH *et al.*, 2008). Contudo os estudos realizados pelo referido autor são com doses únicas de oxaliplatina e não mimetizam o dano cumulativo crônico, mas servem de pista e podem ser um promissor caminho no sentido de buscarmos novas e eficazes terapias do problema.

1.3.7 Substâncias antioxidantes e efeito protetor sobre neurônios

Antioxidantes são compostos que previnem substâncias químicas e biológicas dos danos oxidativos produzidos pelas substâncias reativas ao oxigênio (ROS), como hidroxil ($\text{HO}\cdot$), ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e óxido nítrico (NO). Nas situações em que essas substâncias são produzidas em excesso como tabagismo, radiação UV, dieta rica em gorduras, inflamação, isquemia, o organismo lança mão do sistema antioxidante endógeno ou ainda do exógeno. O endógeno inclui defesas enzimáticas como superóxido dismutase (SOD), catalases, glutathione peroxidase. Existem ainda as defesas não enzimáticas como as proteínas (ferritina) que se ligam ao ferro, os uratos e os tióis protéicos do plasma, que muito contribuem para apreensão dos radicais livres (PIETTA, 2000). Existem ainda os antioxidantes reparadores como as enzimas reparadoras do DNA (WARMA *et al.*, 1995). Por incapacidade do nosso sistema de defesa endógeno, a dieta antioxidante é necessária para diminuir o efeito cumulativo do dano oxidativo ao longo da vida (WAYNER *et al.*, HALLIWELL, 1994). As vitaminas C, E e A e os carotenóides são antioxidantes reconhecidos (SIES, 1997).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada por sua estrutura, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons, como vemos na **figura 4**, abaixo:

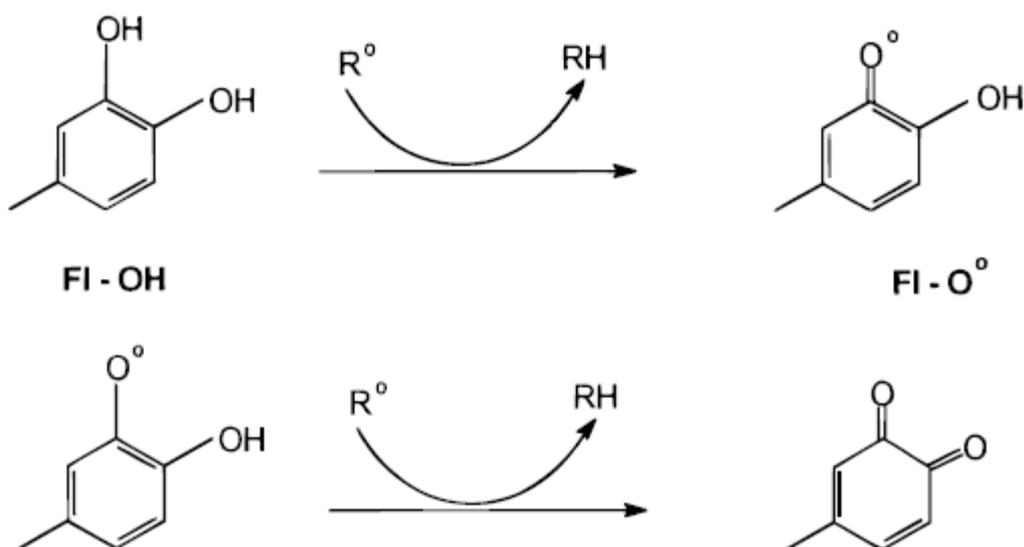


Figura 4. Retirada de radicais livres pelo flavonóide
Pietta PG, J. Nat. Prod. 2000, 63, 1035-1042

Ao longo da última década acumulou-se evidência que os polifenóis protegem as células nervosas da injúria oxidativa pela sua capacidade de varrer radicais livres, protegendo assim do stress oxidativo que em última análise causa morte neuronal (ISHIGE *et al*, 2000). Os flavonóides, não todos, protegem da toxicidade do glutamato assim como de outras injúrias oxidativas, através de três mecanismos distintos que incluem aumento intracelular de GSH, redução direta dos níveis de ROS e prevenção do influxo de Ca²⁺ apesar dos altos níveis de ROS (ISHIGE *et al.*, 2000).

1.4 Dor nociceptiva

A resposta a um estímulo doloroso agudo é um mecanismo adaptativo importante para proteção do organismo de lesões. Sinais de dor decorrentes de estímulos nociceptivos (ferimentos, agressões térmicas ou inflamatórias) são convertidos em impulsos elétricos no nociceptores teciduais. Os sinais de dor nociceptiva e neuropática utilizam as mesmas vias de dor, entretanto, nessa ultima, a condução encontra-se alterada por injúria da via neural (GALUZZI, 2007). Na dor existe um componente somático discriminativo, a sensação de dor, e um

componente afetivo, o sentimento de dor, além da estimulação da via nociceptiva, através de nociceptores que transmitem os estímulos nocivos ao córtex sensorial no SNC (LOESER e TREEDE, 2008). É importante na dor nociceptiva a integridade das vias nervosas sensitivas, o que não ocorre na dor neuropática.

Os nociceptores são terminações nervosas livres com alto limiar de excitabilidade que são ativados por estímulos de alta intensidade ou por estímulos simples quando estão sensibilizados após injúrias teciduais ou processos inflamatórios, que são então ativados por mediadores químicos (OLIVEIRA e SILVA, 2009). Para que o estímulo nociceptivo gerado na periferia e detectado pelo nociceptor chegue ao SNC, é preciso haver um processo de transdução, em seguida a ativação do nociceptor e a condução à medula espinhal (corno posterior) através das fibras A delta e C (CAVALCANTI e MADALENA, 2003). As fibras A beta detectam estímulos de baixa intensidade (reconhecidas como fibras do tato) e podem estar associadas de forma patológica às dores neuropáticas (FERREIRA *et al.*, 2009).

Os nociceptores podem ser ativados por estímulos mecânicos térmicos e químicos. Foram identificados canais iônicos relacionados à transdução de estímulos que promovem a excitação de neurônios sensitivos periféricos. Alguns desses canais podem ser ativados pelo pH baixo (ASIC). Outros transdutores do tipo canal iônico sensíveis ao calor, são membros da família dos receptores de potenciais transitórios (TRP) e são denominados vaniloides. Assim esses receptores estão localizados nas fibras A delta e C são sensíveis ao calor moderado, calor intenso e alguns à capsaicina (substância ativa da pimenta). Os receptores TRPV1 (ou VR1) são sensíveis aos prótons H⁺, comum nas reações inflamatórias e também ao calor nocivo moderado (acima de 43°C). TRPV2 responde ao calor de maior intensidade (maior que 50°C) e não é ativado pela capsaicina. TRPM8 e o TRPA1, também da mesma família são transdutores que respondem ao frio. O TRPM8 responde ao frio não nocivo (8 a 28°C) e ao agente químico mentol. O canal TRPA1 responde ao frio nocivo (abaixo de 17°C) além de contribuir para a detecção de substâncias inflamatórias e outros estímulos nociceptivos (TEIXEIRA, 2009). Recentemente foi publicado um estudo envolvendo esse tipo de transdutor com a neurotoxicidade aguda da oxaliplatina cujas reações são evocadas pelo frio (NASSINI *et al.*, 2011). Os canais do tipo ASIC (ASIC1, ASIC2, ASIC3 ou DRASIC)

atuam como canais ativados por estímulo mecânico ou por prótons. O canal de sódio do tipo degenerina mamífera (MDEG) são transdutores que respondem a estímulos mecânicos e também são conhecidos como canal de sódio cerebral (BNC1) (WOOD, 2004). TREK-1 é o canal de potássio relacionado ao TWIK e detecta diversos estímulos principalmente os estímulos mecânicos de distensão.

Após a transdução do estímulo por esses canais iônicos, gera-se o potencial receptor e, em seguida, um potencial de ação, pela abertura dos canais de sódio voltagem dependentes (GUYTON e HALL, 2006). No fenômeno de sensibilização periférica que leva à hiperalgesia primária, participam um tipo especial de canal de sódio denominado tetrodotoxina resistente (TTxR ou NAV 1.8) que tem sua produção estritamente relacionado as fibras de pequeno calibre (nociceptivas). Foi visto que prostaglandinas, provenientes do processo inflamatório ativam essas canais principalmente através da ativação das proteínas quinases (PKC e PKA) que os fosforilam. Há também o aumento da expressão desses canais durante o processo de dor inflamatória crônica. Existem dois principais subconjuntos de nociceptores: os peptidérgicos/NGF-dependentes /isolectina B4 (IB4) negativo e os não-peptidérgicos/GDNF-dependentes/IB4 positivos. Esses dois subconjuntos expressam quantidades diferentes de isoformas de canais de sódio voltagem dependentes específicos (NAV 1.8 e 1.9).

Com a ativação dos canais de sódio voltagem dependentes, o potencial de ação caminha até a outra extremidade do aferente periférico, cujo corpo celular encontra-se no gânglio da raiz dorsal, onde promove a entrada de cálcio e a liberação de neurotransmissores (FERREIRA *et al*, 2009).

Durante a reação inflamatória o terminal nociceptivo periférico é modulado pelas substâncias algogênicas liberadas após a lesão celular (prostaglandinas, citocinas, substância P, histamina, bradicinina entre outras). Esses mediadores levarão à inflamação no local e sensibilização dos nociceptores, caracterizando a sensibilização periférica. Com a persistência dos estímulos e em virtude da sensibilização periférica, existe a produção de hiperalgesia primária, que é uma resposta exagerada aos estímulos dolorosos no local da lesão. Ocorre também hiperalgesia secundária ou inflamação neurogênica, com aumento da resposta dos neurônios da medula espinhal, ocorrendo sensibilização central (GALUZZI, 2007).

Como resultado dessas alterações, substâncias oxidantes e enzimas são produzidos e irão formar espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), que por sua vez induzem fatores de transcrição (NF- κ B, dímero fos-jun e AP-1), causam dano ao DNA e rompimento de mitocôndrias (CAVALCANTI e MADALENA, 2003)

Todos os neurônios nociceptivos primários (aférentes periféricos) convergem e efetuam sinapses excitatórias com neurônios de transmissão ou de segunda ordem situados no corno dorsal da medula espinhal ou então no núcleo espinhal trigeminal (no caso do segmento cefálico). No corno dorsal acontece a primeira sinapse. Glutamato é um dos principais neurotransmissores envolvidos na transmissão nociceptiva. Liberado pelas terminações pré-sinápticas ele ativa receptores inotrópicos AMPA e NMDA, promovendo a abertura para passagem de cátions como o Ca^{2+} e o Na^{+} e assim promovendo a despolarização que ativa o neurônio de projeção (ou secundário). Além do glutamato, neuropeptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e também o óxido nítrico participam como neurotransmissores e/ou neuromoduladores do processo nociceptivo. As sinapses que acontecem no corno dorsal localizam-se principalmente nas lâminas I, II e V. Nesses locais podem ser encontrados pelo menos 2 tipos de neurônios os neurônios nociceptivos específicos (NE) e os neurônios de ampla faixa dinâmica (WDR – “Wide Dynamic Range”). Devido à presença de diversos tipos de neurônios, interneurônios e das projeções rostrocaudais de centros encefálicos, o corno dorsal da medula espinhal torna-se um local não só de coleta das informações vindas da periferia, mas também uma estação de modulação (inibição e facilitação) da sensibilidade nociva (MILLAN, 1999; OLIVEIRA e SILVA, 2009). A **figura 5** mostra ilustra o caminho do estímulo nociceptivo dando destaque aos processos que ocorrem no corno dorsal da medula espinhal.

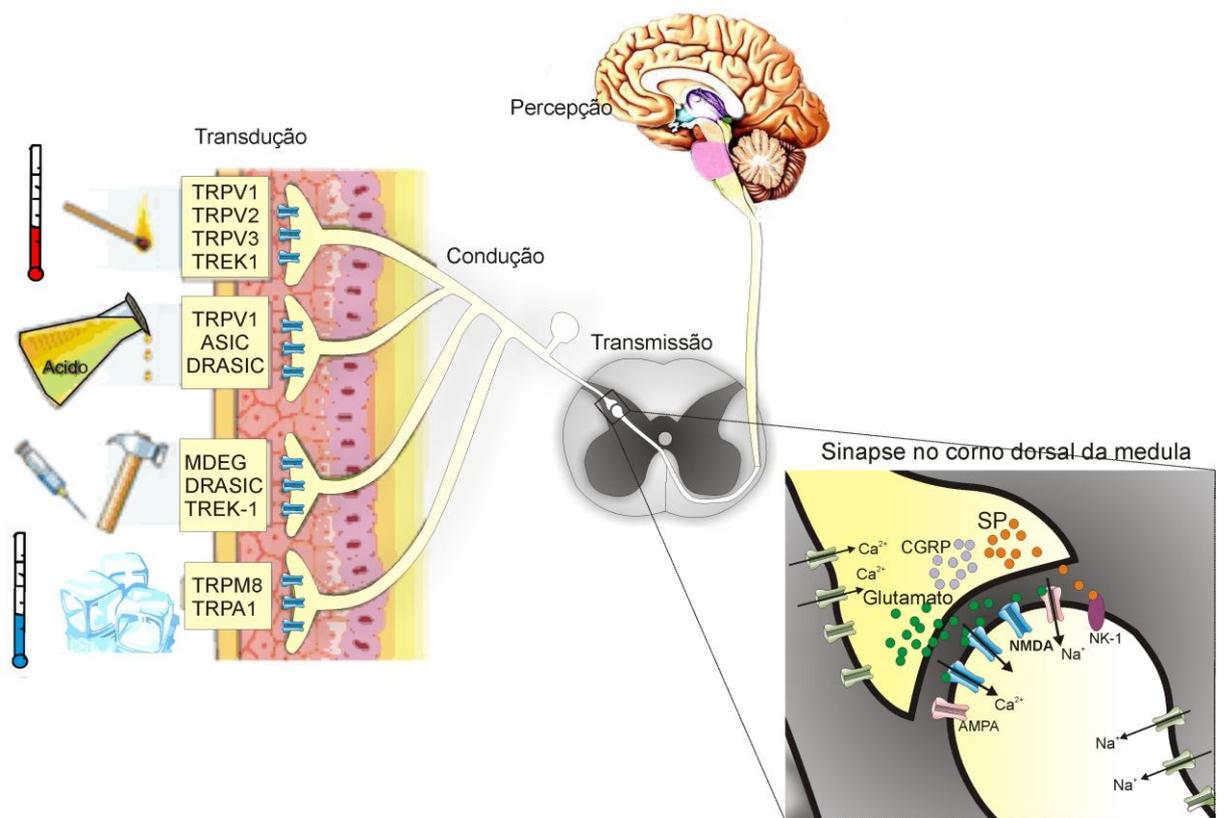


Figura 5. Organização da via nociceptiva. Transdução: ativação dos canais iônicos periféricos por diversos estímulos; geração de potenciais bioelétricos. Condução: informação do nociceptor através das fibras periféricas até o corno dorsal da medula espinal onde acontece a transmissão. Transmissão: 1ª sinapse com liberação de neurotransmissores (glutamato, CGRP e SP) e ativação de receptores NMDA, AMPA e NK-1 a nível medular. Percepção: ativação de centros supra-espinhais (ex: tálamo, córtex somestésico).

Do corno dorsal da medula espinal as informações nociceptivas são conduzidas pelos neurônios de projeção (NE e WDR) até regiões supra-espinhais pelas vias caudorostrais nociceptivas também conhecida por trato espinotalâmico. Através do trato espinotalâmico a informação chega ao tálamo e também a outras estruturas como a formação reticular, substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraqueal e hipotálamo. Nos núcleos talâmicos partem neurônios terciários em direção ao córtex somestésico e também para estruturas límbicas. No córtex somestésico acontece processo de percepção da dor como um todo. As informações chegam via projeções talamocorticais proveniente dos núcleos talâmicos lateral e medial. O conjunto de núcleos laterais promove a chegada de informações sensitivo-

discriminativas relacionadas à localização, modalidade e gradações de intensidade do estímulo nociceptivo. A área SI do córtex somestésico envia informações juntamente com a área SII para o córtex parietal posterior que enfim integra informações de outras modalidades sensitivas como a visual, olfatória, auditiva e táteis para dar um contexto geral e uma interpretação ao estímulo doloroso. O conjunto de núcleos mediais do tálamo envia aferências para outras estruturas corticais incluindo o córtex insular e área anterior do cíngulo, associadas ao sistema límbico ativando os aspectos afetivo-motivacionais da dor (MILLAN, 1999; OLIVEIRA e SILVA, 2009)

1.5 Dor neuropática

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor neuropática como “iniciada ou causada por uma lesão ou disfunção primária do sistema nervoso” e que se deve a lesões de nervos periféricos ou centrais (IASP TAXONOMY, 1994); essas lesões podem ser devido a compressão, transecção, infiltração, isquemia ou lesão metabólica neuronal ou ainda uma combinação de mecanismos. Ela é classificada como de causa periférica e central (DWORKIN, 2002). As periféricas incluem neuropatia periférica diabética, neuralgia pós-herpética, neuropatia sensitiva por antineoplásico ou por HIV, neuropatia por infiltração tumoral, dor do membro fantasma, dor pós-mastectomia, síndromes de dor complexa regional (distrofia simpático-reflexa) e neuralgia do trigêmeo. As síndromes de causa central ou por desaferentação, incluem esclerose múltipla, traumatismo raquimedular, dor central pós-AVC e doença de Parkinson. Bennett (1997) forneceu estimativas de incidência de tipos comuns de dor neuropática e concluiu que, se a lombalgia neuropática foi incluída no total, aproximadamente 3,8 milhões de indivíduos nos EUA sofreriam desse distúrbio.

A dor neuropática diferente da dor nociceptiva não sinaliza perigo iminente, ela é uma resposta tardia não mais aguda, mas se expressa através da sensação dolorosa (**tabela 4**). Neurônios sensitivos lesados por trauma ou medicamentos produzem descargas espontâneas que levam a níveis excitabilidade sustentada, provocando sensibilização periférica com ampliação dos impulsos dolorosos e

levando a maior liberação de neurotransmissores causando aumento de resposta dos neurônios da medula espinhal (sensibilização central). É um processo conhecido como “windup”. Desenvolvem-se alterações neuroplásticas e redução ou perda do controle inibitório (ALVES NETO *et al.*, 2009). Daí a sensibilização central pode ser resultado de ativação do receptor NMDA, aumento do glutamato, aspartato e cálcio (Ca^{2+}) intracelular; ocorre ativação de receptores AMPA e receptores metabotrópicos de glutamato (KAWAMATA; OMOTE 1996), ativação dos canais de cálcio voltagem-dependente, óxido nítrico (NO), inibição dos canais de K^{+} (voltagem ou Ca^{2+} dependentes) e liberação de ácido araquidônico, que são mecanismos celulares múltiplos causadores do “windup”, que é a amplificação e aumento da duração da resposta a estímulos (DICKENSON, 1995).

Tabela 4. Sintomas e sinais sensitivos na dor neuropática

Sintoma ou sinal	Descrição
Hiperalgisia	Aumento da sensibilidade a estímulos dolorosos
Alodínia	Dor causada por estímulo não doloroso. Pode ser mecânica, dinâmica, térmica.
Anestesia	Perda de sensibilidade normal da região afetada
Disestesia	Sensação desagradável anormal espontânea ou provocada
Hiperpatia	Resposta exagerada e tardia a um estímulo nocivo na região afetada
Hipoestesia	Redução de sensibilidade normal da região afetada.
Parestesias	Sensações anormais espontâneas não dolorosas

Fonte: Galuzzi, 2007

O tratamento da dor neuropática ainda é insatisfatório do ponto de vista farmacológico. Não existe cura para neuropatia; entretanto os pilares do tratamento continuam a ser a prevenção da progressão. Envolvem algumas estratégias como educação sobre a exposição ao frio, modificações nos horários dos medicamentos, uso de drogas preventivas e estratégias para os pacientes em uso de quimioterápicos platinos que provocam a neuropatia sensitiva, como a oxaliplatina. As drogas preventivas visam reduzir os sintomas neuropáticos nesses pacientes em

risco de apresentarem neuropatia e incluem vitamina E, glutamina, infusão de Ca^{++} e Mg^{++} , glutatona e N-acetilcisteína. Essas substâncias em princípio não devem interferir na ação antineoplásica do quimioterápico (KALEY; DE ANGELIS, 2009; PAICE, 2009). O tratamento farmacológico inclui anticonvulsivantes, bloqueadores de canais de Na^+ , como a carbamazepina, fenitoína e lamotrigina (DWORKIN *et al.*, 2007), já que os canais alvo para esse efeito são os de Na^+ e Ca^{++} (ALVES NETO *et al.*, 2009). A gabapentina que é o fármaco de 1ª linha, está relacionada com o GABA, um neurotransmissor modulador da dor. Ela atravessa a barreira hematoencefálica, e demonstrou eficácia igual aos antidepressivos tricíclicos, também de 1ª linha de escolha. O fato de a gabapentina só ter efeito em dose alta (BACKONJA *et al.*, 1998) limitou o seu uso. Recentemente foi aprovado pelo FDA, o uso da pregabalina da família dos gabapentinóide, que tem uma ligação mais alta com o canal de cálcio voltagem-dependente (CHONG e BRANDNER, 2006). Os bloqueadores de receptores NMDA como a cetamina, tem sido estudados quanto a sua eficácia na dor crônica. A administração de canabinóides tem mostrado redução da alodínia ou da hiperalgesia em vários modelos animais, mas não foi aprovada ainda pelo FDA. Pela sua complexidade, a dor neuropática pode ser tratada ainda associando abordagens físicas, psicológicas e alternativas.

1.5.1 Modelos experimentais de dor neuropática

A maioria dos modelos experimentais descritos na literatura foi em ratos e se desenvolveu a partir de lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou tóxicas (KRAYCHETE *et al.*, 2008). Em relação a lesões traumáticas, existem hoje três modelos de dor neuropática em ratos que estão em uso generalizado:

- Lesão constrictiva crônica (CCI), idealizado por Bennet e Xie (1988). Inclui a colocação de quatro ligaduras apertadas com fio cromado no nervo isquiático. Produziu-se alodínia, hiperalgesia e possivelmente dor espontânea (ou disestesia). Houve avanços no entendimento dos mecanismos da dor neuropática em humanos.
- Ligadura isquiática parcial (PSL), idealizado por Seltzer *et al.* (1990). Parte do nervo isquiático é apertada por um laço. Produziu-se hiperalgesia mecânica e

térmica e serviu como modelo para síndrome de qualidade causalgiforme e dor de manutenção simpática.

- Ligadura do nervo espinhal (SNL) idealizado por Kim e Chung, 1992. Um ou mais nervos espinhais que vão para a pata são apertados por laço e cortados. Produziu-se uma hiperalgesia duradoura ao calor nocivo, pelo menos por 5 semanas.

A presença de alodínia geralmente indica lesão neuropática, portanto um sintoma importante para definir um diagnóstico de comprometimento do tecido nervoso (FERREIRA, 2003). A hiperalgesia é definida como resposta exacerbada a um estímulo que em geral é doloroso (MERSKEY; BOGDUK, 1986). Nos testes se deveria usar o termo hipernocicepção para quantificar o aumento da sensibilidade do neurônio nociceptivo primário, abolindo os termos hiperalgesia e alodínia, pois são utilizados apenas para referir sintomas humanos, com os quais os testes experimentais em animais não teriam nenhuma relação (FERREIRA, 2003).

Outros métodos incluem a injeção intraperitoneal de estreptozocina para mimetizar neuropatia diabética, ou de paclitaxel e vincristina ou oxaliplatina para neuropatia induzida por quimioterápico. Essas são conhecidas pelo principal efeito adverso que é a ocorrência de neuropatia sensitiva periférica. Nesse sentido diversos autores vem demonstrando esses efeitos através de modelos experimentais animais no intuito de estudar o mecanismo pelo qual esses efeitos aparecem. A respeito da neuropatia por vincristina e por paclitaxel, já está bem documentada na literatura em modelos desenvolvidos para seu estudo (PELTIER e RUSSEL, 2002). No entanto a neuropatia induzida por oxaliplatina ainda é pouco estudada a nível experimental, existindo poucos modelos animais para seu estudo. O primeiro modelo foi desenvolvido por LING *et al.*, 2007a, em ratos, onde eles administraram oxaliplatina nas doses de 1,2 ou 4 mg/kg i.p., duas vezes por semana durante quatro e meia semanas consecutivas e avaliaram com testes comportamentais o efeito de drogas usadas para o tratamento da neuropatia, como carbamazepina, gabapentina, anestésicos locais, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio.

Os modelos para dor central usam a contusão (trauma utilizando a força do impacto com deslocamento tissular), ou lesões isquêmicas por compressão lenta por

meio de pinçamento ou da insuflação com balonetes. Métodos citotóxicos empregam a injeção de análogos de glutamato (cainato) ou de substâncias que permitem a lesão de locais específicos da substância cinzenta. As técnicas descritas visam provocar hiperalgesia mecânica e térmica (GARCIA LARREA e MAGNIN, 2008; CAMPBELL e MEYER, 2006).

1.6 Flavonóides Rutina e Quercetina

Flavonóides são polifenóis sintetizados a partir dos fenilpropanóide e do acetato, precursores de aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (MANN, 1987). Participam de vários processos orgânicos e pela sua importante ação no combate aos radicais livres estão sendo vistos com mais interesse. São pouco usados na medicina ocidental (MIDDLETON *et al.*, 2000) embora funcionem como antioxidante na função protetora das doenças degenerativas mediadas pelo estresse oxidativo (LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006).

Os flavonóides Rutina e Quercetina são polifenóis de baixo peso molecular, encontrados em vegetais (fitoquímicos) plantas, ervas, folhas e sementes (HARBONE *et al.*, 1986; HAVSTEEN *et al.*, 1993) assim como em bebidas como vinho tinto, chá, café, cerveja e várias plantas medicinais. A rutina é descrita por alguns autores como quercetina-3 rutinose, solúvel em água, e é convertido em quercetina quando entra na corrente sanguínea (MORAND *et al.*, 2000). É um tipo de flavonóide glicosídeo conhecido com vitamina P e tem propriedades antivirais, anti-hipertensivas e antiplaquetárias (devem ser usados com critério em pacientes sob uso de anti-agregantes plaquetários), assim como tonifica os capilares sanguíneos, devido a sua alta atividade de eliminar radicais livres e capacidade antioxidante (GUO *et al.*, 2007). Várias pesquisas estão sendo feitas para evidenciar as funções farmacológicas destes flavonóides, como atividade antiinflamatória (AGARWAL, 1982; LOGGIA *et al.*, 1986; FERRANDIZ e ALCARAZ, 1991), analgésica (EMIM *et al.*, 1984), e antioxidante (CARLO *et al.*, 1999). São formados nas plantas através dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e do malonato (HARBONE, 1986). A estrutura básica do flavonóide é o núcleo flavan, que

consiste de 15 carbonos, arranjados em 3 anéis (C6-C3-C6) nomeados A,B,C , como mostra a figura 6 abaixo

Estrutura básica dos flavonóides – núcleo “flavan”

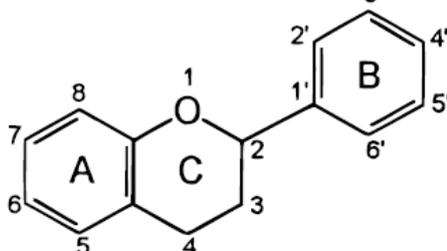


Figura 6. Estrutura básica do flavonóide
Fonte: Pietta PG, J. Nat. Prod. 2000,63 1035-1042.

Entre as várias classes de flavonóides, é de particular interesse para este trabalho, os flavonóis, a cujo grupo pertence à rutina e a quercetina. Foi evidenciado que a média de ingestão de flavonóides é 23mg/dia, com a quercetina contribuindo em quase 70% (HOLLMAN *et al.*,1996; WACH *et al.*,2007). Eles são considerados em geral como não absorvíveis devido serem ligados a açúcares como betaglicosídeos. A degradação (hidrólise) causando sua absorção pode ocorrer somente no cólon por microorganismos (HOLLMAN *et al.*,1996).

1.6.1 Ação antioxidante e antiinflamatória de rutina e quercetina

Apesar dos benefícios fisiológicos dos flavonóides serem largamente atribuídos as suas propriedades no plasma, eles também podem proteger as células de vários danos, como por exemplo, as flavonas que podem modular a resposta imune e a reação inflamatória por controlar a produção de óxido nítrico (KRÓL *et al.*,1995). A atividade antioxidante dos polifenóis é reconhecida e pode ser responsável por vários benefícios à saúde. As catequinas, por exemplo, agem nas cardiopatias, perda de memória e câncer, pela conversão dos compostos gerados pelos radicais livres em compostos inativos de baixa energia (BROWNSON *et al.*, 2002). O resveratrol, presente em altas concentrações no vinho tinto, amendoim e casa da

uva, previne o câncer por inibir o crescimento tumoral, a angiogênese e a invasão celular (DE LEDINGHEN *et al.*, 2001).

Diversas atividades da rutina (**figura 7**) foram apontadas em vários trabalhos: alguns autores descrevem que ela apresenta excelente atividade antioxidante (MOREL *et al.*,1993; VENO *et al.*, 1993) e que pode suprimir vários processos mediados por radicais livres, bem como a peroxidação lipídica *in vitro* (AFANAS'EV *et al.*, 1989; KOSLOV *et al.*, 1994), a superprodução de radicais livres (AFANAS'EV *et al.*,1995), a superprodução de radicais livres do oxigênio na anemia de Fanconi, beta-talassemia (KORKINA *et al.*, 2003).

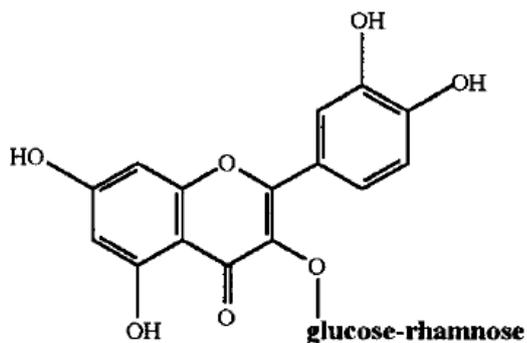


Figura 7. Estrutura química da rutina

Fonte: Pietta PG, J. Nat. Prod. 2000,63 1035-1042.

A quercetina (**figura 8**) representa um dos mais proeminentes antioxidantes dietéticos. Ela vem sendo estudada como um excelente antioxidante *in vitro* sendo um poderoso varredor de espécies reativas do oxigênio (ROS) principalmente de O_2^- (HANASAKIETAL, 1994; CUSHNIE and LAMB, 2005) e espécies reativas do nitrogênio como o NO e $ONOO^-$ (VAN ACKERETAL, 1995; HAENENAND, 1997; HEIJNEN *et al.*, 2001). Além disso, a quercetina potencializa a capacidade antioxidante endógena e chega a ser 624 vezes mais elevado do que o antioxidantes de referência que é o trolox, e a vitamina C (RICE EVANS *et al.*, 1995).

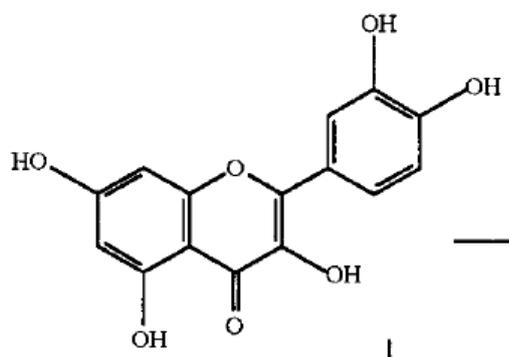


Figura 8. Estrutura química da quercetina
Fonte. Pietta PG, J. Nat. Prod. 2000,63 1035-1042.

Estresse oxidativo e superóxido desempenham um papel crítico no desenvolvimento de complicações neurovasculares da diabetes. Nesse sentido está documentado na literatura o efeito da rutina e quercetina, através de uma ação antioxidante, sobre as complicações da diabetes. A associação vitamina C com rutina demonstrou um efeito protetor sobre parâmetros de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e oxidação de proteínas) em nervo ciático assim como na lesão pulmonar de ratos diabéticos (JE *et al.*, 2002). Outros autores demonstraram o efeito da quercetina na alodínia ao frio e hiperalgesia térmica (teste da imersão da cauda e placa quente) de ratos diabéticos (modelo da estreptozocina). O tratamento crônico com quercetina (10mg/kg) por 4 semanas inibiu os parâmetros nociceptivos. Os autores discutem os resultados baseado nas propriedades antioxidantes da quercetina (ANJANEYULU; CHOPRA, 2004).

Além de sua atividade antioxidante clássica de doação de hidrogênio, nos últimos 5-10 anos, algumas evidências surgiram a partir de estudos com cultura de células, sugerindo que os flavonóides podem influenciar a sobrevivência celular através de outros mecanismos de ação: modulação enzimática, interação com diversos receptores e modulação da sinalização de cascatas intracelulares de controle da sobrevivência celular, morte, diferenciação e expressão gênica (DAJAS *et al.*, 2005;. RICE-EVANS, 2001; SCHROETER *et al.*, 2002;. MANDEL *et al.*, 2008). Esta capacidade de modificar vários alvos celulares é provavelmente a base do

potencial terapêutico dos flavonóides e também seus dos seus efeitos tóxicos (ECHEVERRY *et al.*, 2010)

Recentemente Echeverry *et al.* (2010) publicaram um estudo que avaliou a capacidade de proteção de 13 flavonas, estruturalmente relacionados com a quercetina, de resgatar neurônios granulares primários do cerebelo da morte induzida por um tratamento com peróxido de hidrogênio. É discutido que poucos estudos têm focado os requisitos estruturais para a neuroproteção dos flavonóides e que a estrutura química ao ser modificada também modifica o modo pelo qual os flavonóides exercem citoproteção. O modelo utilizado no referido estudo utiliza flavonas, que são adicionadas a células em cultura 24 h antes de serem submetidos à agressão oxidativa. Desse modo, a molécula de flavonóide interage com alvos intracelulares antes da agressão oxidativa ser aplicada o que provavelmente permite a indução de expressão de moléculas de sinalização celular (ECHEVERRY *et al.*, 2010).

A quercetina foi capaz de atenuar o desenvolvimento de pancreatite induzida por ceruleína em camundongos através de mecanismos antiinflamatórios e antioxidantes (CARVALHO *et al.*, 2010). Isso foi demonstrado através do histopatológico, da dosagem de citocinas, atividade de mieloperoxidase e do ensaio de malondialdeído (peroxidação lipídica).

Está bem demonstrado que os flavonóides possuem propriedades anti-inflamatórias *in vivo*. Alguns relatórios sugeriram que eles tiveram boa atividade sem os efeitos colaterais ulcerogênicos de outras drogas antiinflamatórias. Além disso, foram descritos flavonóides portadores de efeitos anti-ulcerogênicos (MOTA *et al.*, 2009).

Além da explícita atividade antioxidante a quercetina também demonstra alta atividade antiinflamatória (READ,1995; ORSOLICETAL, 2004) que alguns autores dizem estar relacionada com a ação antioxidante. Dados da literatura mostram que a quercetina diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS, *in vitro* em macrófagos e células pulmonares (MANJEET e GHOSH, 1999; GERAETS *et al.*,2007). Suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias têm sido associadas

com a prevenção e terapia das doenças cardiovasculares e câncer (RUSSO *et al.*, 2011).

Em relação à toxicidade e segurança da quercetina, estudos em ratos mostraram toxicidade renal em doses de 2g/kg. Em humanos estudos clínicos mostraram toxicidade renal sem sinais de nefrite, em doses de 3,5 g/70kg (RUSSO *et al.*, 2011).

1.7 Justificativa

A oxaliplatina é a terceira geração de agentes platinos tendo demonstrado um amplo espectro de atividade antitumoral e toxicidade diferente da cisplatina e das drogas de segunda geração como carboplatina. Atualmente é a primeira linha de tratamento do câncer colorretal metastático e faz parte de diversos esquemas de quimioterapia. Seu efeito adverso de mais difícil manejo é o neurotóxico, que é cumulativo e limita as doses e a duração do tratamento com oxaliplatina. O mecanismo exato ainda não foi elucidado, bem como um tratamento eficaz ainda não foi descoberto. Apesar de alguns trabalhos sugerirem que a oxaliplatina possa causar modificações em canais iônicos como os de sódio e cálcio, sendo a causa de sua neurotoxicidade, evidências crescentes apontam o dano oxidativo como o fator desencadeante. Também foi demonstrado que substâncias antioxidantes como L-carnitina e vitamina C previnem o desenvolvimento da fase aguda da neuropatia por oxaliplatina. Sabendo-se da comprovada ação antioxidante, além das propriedades analgésicas e antiinflamatórias dos compostos flavonóides como a rutina e quercetina, achamos que seria válido investigar a possibilidade de esses mesmos flavonóides demonstrarem um efeito neuroprotetor preventivo sobre a neuropatia induzida por oxaliplatina. Além disso, até a presente data, não identificamos nenhum estudo avaliando o efeito dos flavonóides rutina e quercetina sobre essa condição, seja em modelos experimentais ou em humanos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito dos compostos flavonóides Rutina e Quercetina sobre a neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos e mecanismo envolvido.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do tratamento com Rutina e Quercetina na hipernocicepção plantar induzida pelo tratamento crônico com oxaliplatina;
- Investigar o efeito do pré-tratamento com Rutina e Quercetina na alodinia térmica pelo frio induzida pelo tratamento crônico com oxaliplatina;
- Avaliar o efeito do tratamento com rutina e quercetina nos aspectos histopatológicos da medula espinhal e das patas de camundongos submetidos à neuropatia periférica por oxaliplatina;
- Estudar o efeito da Rutina e Quercetina sobre a expressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à neuropatia periférica por oxaliplatina;
- Estudar o efeito da rutina e quercetina sobre marcadores do estresse oxidativo (MDA e NP-SH) na medula espinhal relacionando à neurotoxicidade da oxaliplatina;
- Estudar o efeito da rutina e Quercetina sobre a expressão da enzima NOSi e marcação de nitrotirosina em tecido de medula espinhal de camundongos submetidos à neuropatia periférica por oxaliplatina.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados durante os experimentos, camundongos Swiss machos pesando (25 a 30 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Aspectos éticos

Os animais envolvidos no estudo foram acondicionados em número de 24 por gaiola (gaiola em polipropileno, autoclavável nas medidas de 30x20x13cm com tampas em arame de ferro com tratamento de zincagem nas medidas aproximadas de 49 x36 cm) mantidos em salas com o horário controlado 12/12 ciclo claro/escuro a 25 ° C, e com alimentos (ração) e água *ad libitum*. Os animais ficaram em uma sala climatizada com exaustão de gases.

Em todos os experimentos foram observados os princípios éticos da experimentação animal normatizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC para uso de animais experimentais (processo nº 036/11). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

3.3 Protocolo experimental e desenho do estudo

Antes da realização do experimento da indução da neuropatia por oxaliplatina, havia sido feito no LAFICA, um experimento piloto, de uma curva dose-resposta com administração de oxaliplatina nas doses de 1,2 e 4 mg/kg para verificar a dose mais eficaz que induz a neuropatia sensitiva periférica (PONTES, 2009). Essas doses foram baseadas inicialmente o trabalho de Ling *et al.* (2007a). A dose de 1mg/kg foi encontrada através dos resultados de Pontes (2009) e Lino (2010).

Os animais receberam uma injeção intravenosa de oxaliplatina, duas vezes por semana por 4,5 semanas, dissolvida em uma solução de glicose estéril a 5%, numa concentração de 2mg/ml de acordo com o peso do animal, para assegurar que as injeções i.v. na veia lateral da cauda do animal sejam menos que 0,5 ml. Os testes nociceptivos foram realizados concomitantemente às injeções de oxaliplatina, uma vez por semana por 56 dias. Para avaliar o efeito das drogas rutina e quercetina, foi administrado aos camundongos via intraperitoneal, injeções de rutina (25, 50 e 100mg/kg) ou quercetina (25, 50 e 100mg/kg) 30 minutos antes de cada injeção de oxaliplatina (1mg/kg). O histopatológico e a imunohistoquímica foram realizados em tecido coletado de ratos submetidos a neuropatia induzida por 1mg/kg de oxaliplatina e tratados concomitantemente com rutina (50mg/kg) e quercetina (50mg/kg), após 14 dias de tratamento (**figura 9**).

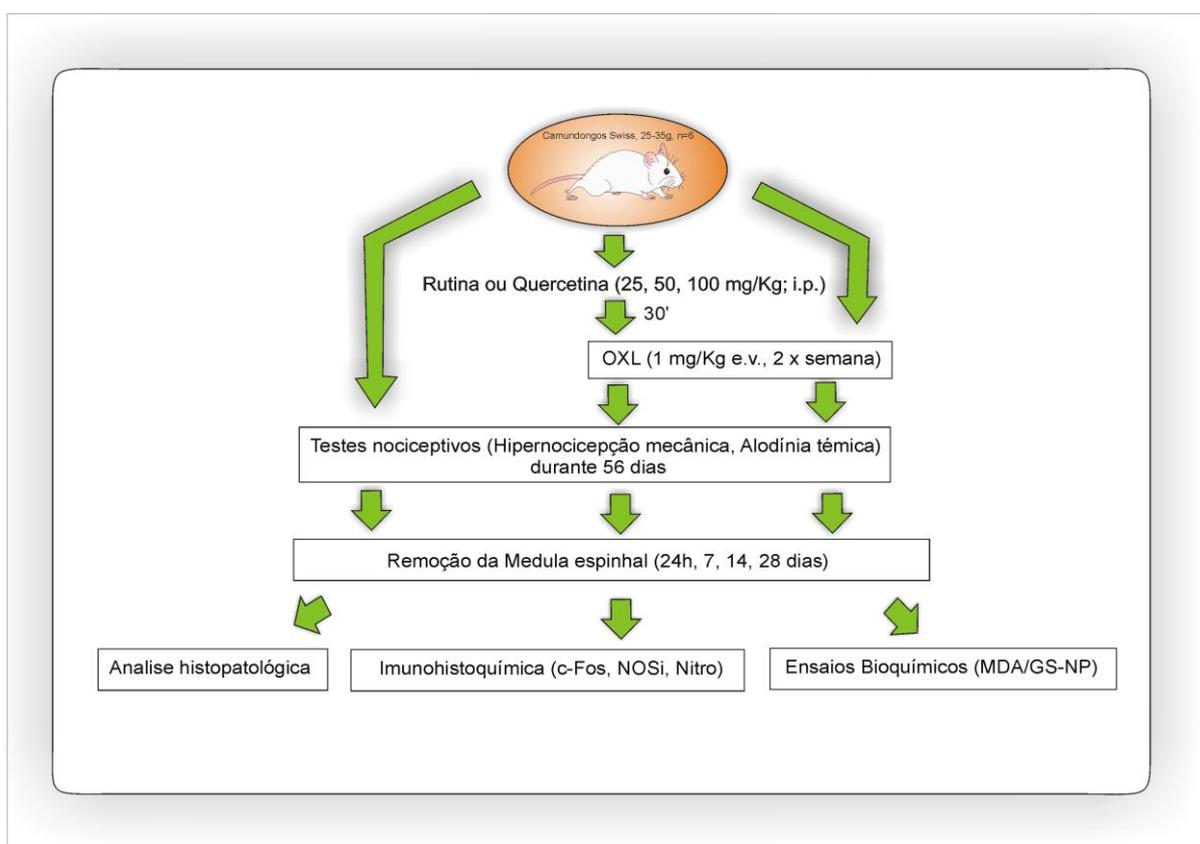


Figura 9. Desenho esquemático do protocolo experimental. OXL (oxaliplatina); NOSi (Óxido nítrico sintase induzida); Nitro (nitrotirosina); MDA (malondialdeído); GS-NP (Grupos sulfidrilicos não protéicos)

3.4 Indução da neuropatia sensitiva periférica por oxaliplatina

3.4.1 Diluição e Injeção da oxaliplatina

Oxaliplatina foi diluída em uma solução de glicose estéril a 5%, numa concentração de 2mg/ml, e foi injetada i.v.(0,5ml) na veia lateral da cauda do animal, nas doses de 1, 2 e 4 mg/kg, 2 vezes por semana, durante 4,5 semanas num total de 9 injeções.

3.4.2 Testes Nociceptivos

Hipernocicepção mecânica plantar

Hipernocicepção mecânica foi avaliada pela estimulação das patas traseiras do camundongo, com um aparelho que registra a pressão consistindo de um transdutor acoplado a uma ponta de 0,5 mm² de polipropileno (Analgesímetro *Von Frey* eletrônico digital (Insight Instruments Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12x20x17) com no assoalho com malha de ferro em formato quadrado, 15-30 min antes de começarem os testes. Um espelho inclinado é colocado debaixo da grade de ferro do assoalho, para que se tenha um vista clara das patas traseiras do camundongo (Figura 10A). O investigador foi treinado para aplicar a ponta do aparelho perpendicular à área central da pata traseira, com um aumento gradual de pressão. No momento de retirada da pata o estímulo foi automaticamente descontinuado e sua intensidade registrada. A reação de retirada é caracterizada pela remoção da pata seguido de um movimento de “flinch” ou sacudida. Os animais foram testados antes e depois dos tratamentos. A estimulação da pata foi repetida até que o animal apresentasse dois valores de medida parecidos. Se os resultados fossem inconsistentes (grande diferença entre o valor de base comparado aos outros animais do experimento), o animal seria retirado do estudo. (CUNHA *et al.*, 2004).

Teste de imersão da cauda (temperatura fria não nociva)

A hipernocicepção térmica foi avaliada usando o teste da imersão da cauda em uma temperatura não nociva (10°C) (NECKER e HELLON, 1978; AUTHIER et al., 2003). A cauda do camundongo foi imersa em água e mantida até que a cauda fosse retirada pelo próprio animal (Figura 10B). A duração da imersão da cauda foi registrada em segundos. Os camundongos foram habituados aos testes e ao manejo pelo investigador durante uma semana antes do experimento.

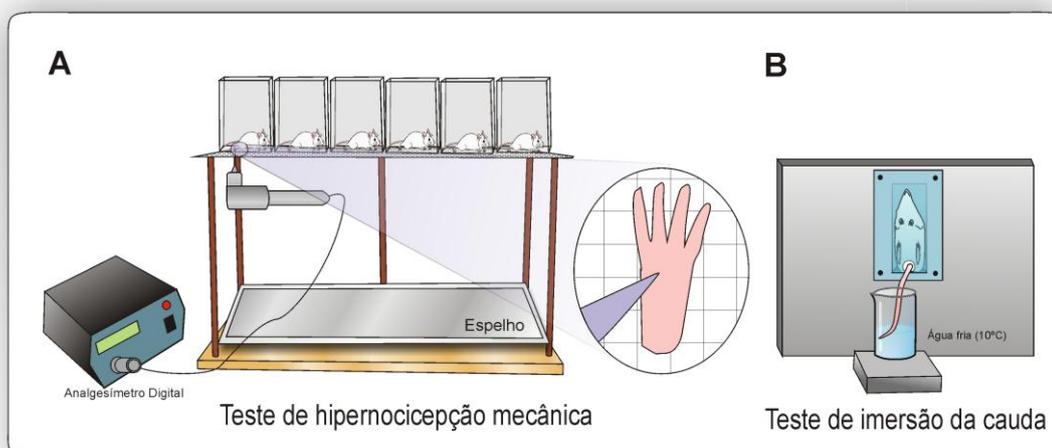


Figura 10. Desenho esquemático representando os testes nociceptivos. A: Teste de hipernocicepção mecânica plantar; B: teste de imersão da cauda em água fria (10°C). Adaptado de Lino *et al.*, 2011.

3.5 Análise histopatológica

Os animais foram profundamente anestesiados com cetamina e xilasina (100mg/kg / 10mg/kg de peso respectivamente, i.p.), feito perfusão intracardíaca por solução preparada no mesmo dia, de paraformaldeído a 4% em 0,1M salina buffer fosfato (PBS) (pH 7.4). Depois da perfusão, os segmentos L4-5 da medula espinal lombar dos camundongos foi retirada, assim como a pele das patas traseiras, pós-fixadas no mesmo fixador (PFA) por 1 hora a 4°C e então colocadas em etanol a 70% (LING *et al.*, 2007a). Cortes transversais da medula espinal foram embebidos

em parafina, seccionados em série, em uma espessura de 10µm com um micrótomo e montadas em slides. Para a análise histopatológica, os cortes foram desparafinizados e hidratados para então proceder a coloração com hematoxilina-eosina.

3.6 Análise Imunohistoquímica

Para a análise de imunohistoquímica, os cortes foram desparafinizados e hidratados e etanol e depois água. Nos cortes hidratados foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato 10mM (pH 6.1) por 15 min a 95°C em forno microondas seguido pelo resfriamento por 20 min á temperatura ambiente. Os cortes foram lavados por 5 min em tampão fosfato (PBS). Depois disso, os cortes foram circulados com uma caneta hidrofóbica (Dako pen). Os cortes foram incubados por 15 min em solução de peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena e lavados por 5 min em PBS. Os cortes foram então incubados com anticorpo policlonal primário anti-c-Fos, anti-NOSi ou anti-nitrotirosina feitos em coelho ou cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), a 4°C por toda a noite. No dia seguinte os cortes foram então lavados em PBS por 5 min e incubados por 30min na temperatura ambiente com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho ou cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Depois de mais uma lavagem com PBS, os cortes de tecido foram incubados com um reagente enzimático AB (streptavidina (reagente A – Avidina e reagente B – peroxidase horseradish biotilado, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 30 min. Depois de uma lavagem final em PBS, os cortes de tecido foram cobertos com uma solução contendo cromógeno diaminobenzidina (DAB liquido + Sistema Chromogen Substrato, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) por dois minutos e então enxaguado em água destilada por 2 vezes durante 5 min cada. Os cortes foram desidratados e montados em meio de montagem rápida (Entellan, Merck, Germany) e examinados com um microscópio Leica (Leica, Wetzlar, Germany). Depois de focar as lâminas, nós fotografamos os cornos dorsais das medulas no aumento de 400x.

A análise imunohistoquímica, para amostras de 5 animais, considerou um escala de escores de 0 – 3, baseado nos seguintes parâmetros: 0 (zero) – ausência de expressão; 1(um) – expressão leve; 2(dois) – expressão moderada e 3(três) – expressão intensa. A análise foi realizada por um investigador que era cego ao tratamento (GONDIM et al., 2011).

3.7 Ensaios bioquímicos em tecido medular

3.7.1 Grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH)

Esses grupos, entre os quais a glutathiona, promove citoproteção prevenindo os vários tecidos dos danos oxidativos pelos radicais livres.

Os camundongos submetidos a neuropatia induzida pela oxaliplatina, e tratados com rutina e quercetina, foram sacrificados por altas doses de anestésico e o segmento L4-L5 da medula espinhal foi removido. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a -80°C, até serem usados. Para o experimento, as amostras foram descongeladas. O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) na medula espinhal, como sulfidrilas não protéicas, foi estimado de acordo ao método descrito por SEDLAK e LINDSAY, 1968. Os segmentos de medula espinhal, foram homogeneizadas no gelo, em 1mL de solução 0,02M de EDTA/100mg de tecido. Então alíquotas de 400µl de tecido homogeneizado foram misturados com 320 µl de água destilada e 80 µl de ácido tricloroacético em tubos de vidro e centrifugados a 3000g por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes (400 µl) foram misturados com 800 µl de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9), e 20 µl DTNB 0,01 M (ácido 2- nitrobenzoico) foi adicionado. A absorbância foi lida a 412 nm em 5 min de adição de DTNB contra um reagente branco sem nenhum homogeneizado. A concentração dos níveis de NP-SH foi registrado com µg/mg de tecido.

3.7.2 Malondialdeído (MDA)

Os camundongos submetidos a neuropatia induzida pela oxaliplatina e tratados com rutina e quercetina, foram sacrificados por altas doses de anestésicos e o segmentos L4-5 da medula espinhal foram removidos. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocado a -80°C até serem usados. A peroxidação lipídica foi determinada pela mensuração do malondialdeído produzido, usando o teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; MIHARA e UCHIYAMA, 1978). Em suma, 250 μl de tecido homogeneizado mais 1,5 ml de H_3PO_4 10% e 0,5 ml de ácido tiobarbitúrico 0,6%, misturada e aquecida em banho-maria de água fervente por 45 min. Depois de resfriar, 2 mL de n-butanol foi adicionado, misturado e a camada de butanol foi coletada após centrifugação. A densidade ótica da camada de n-butanol foi determinada a 535 e 520 nm e a diferença da densidade ótica entre ambos os resultados determinados foi calculada e considerada com o valor do ácido tiobarbitúrico. As concentrações de MDA foram expressas como nanomoles/g de tecido.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste Student Newman-Keuls

Para os dados não-paramétricos, os resultados foram expressos como mediana (mínimo - máximo) e analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunns.

O número de animais (n) por grupo experimental foi no mínimo de 6. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da rutina e quercetina na hipernocicepção mecânica em camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina.

A hipernocicepção mecânica foi avaliada nas patas traseiras dos camundongos injetados com oxaliplatina (1mg/kg) via endovenosa, num período de 56 dias. Ambos rutina e quercetina aumentaram o limiar mecânico da oxaliplatina. Rutina em todas as doses foi capaz de prevenir a baixa do limiar mecânico a partir do 28th dia mostrando um efeito melhor na dose de 100mg/kg até 25,5% ($p < 0,05$) no 42º dia de tratamento (**Fig.110A**). A quercetina também inibiu o efeito da oxaliplatina em todas as doses, aumentando o limiar mecânico a partir do 21th dia, mostrando um melhor efeito na dose de 50 mg/kg com até 91% de efeito máximo no 56º dia de tratamento (**Fig.11B**).

4.2. Efeito da rutina e quercetina na alodínia térmica ao frio em camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina.

A alodínia ao frio (10°) foi avaliada pelo teste da imersão em água fria, da cauda de camundongos injetados por via i.v. oxaliplatina (1mg/kg) durante um período de 56 dias. Nossos resultados mostraram que a oxaliplatina reduz o limiar de retirada da cauda e que ambos os tratamentos com rutina e quercetina, foram capazes de prevenir este efeito. A rutina somente na dose de 50 e 100 mg/kg alcançou um efeito inibitório significativo na alodínia ao frio induzida pela oxaliplatina, alcançando o máximo efeito com a dose de 50 mg/kg no 42º dia aumentando o limiar em 555% ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle (**Fig.12A**). O tratamento com quercetina em todas as doses, foi capaz de prevenir a alodínia ao frio a partir do 7º dia, aumentando o limiar em 466% ($p < 0,001$), máximo efeito na dose de 50 mg/kg no 49º dia, quando comparado ao grupo controle (**Fig.12B**).

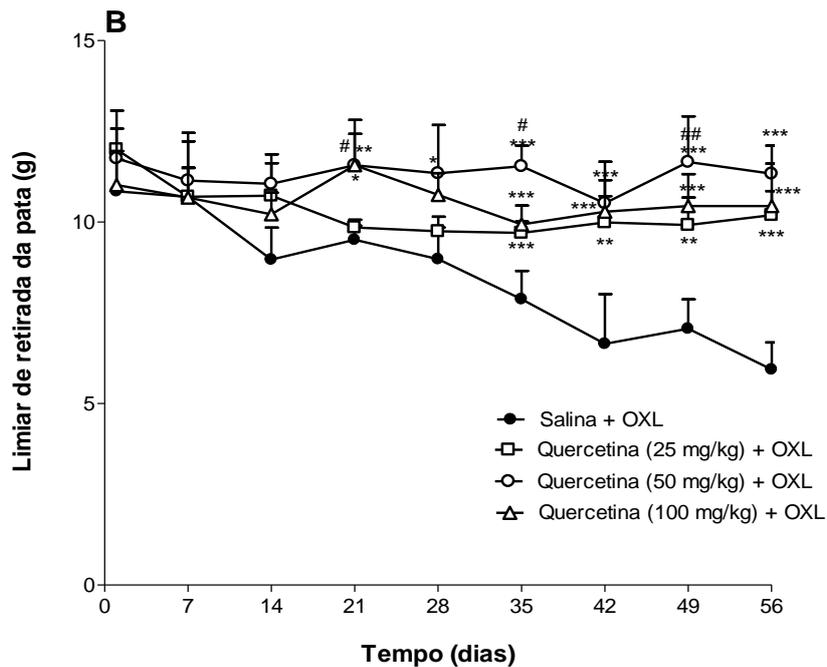
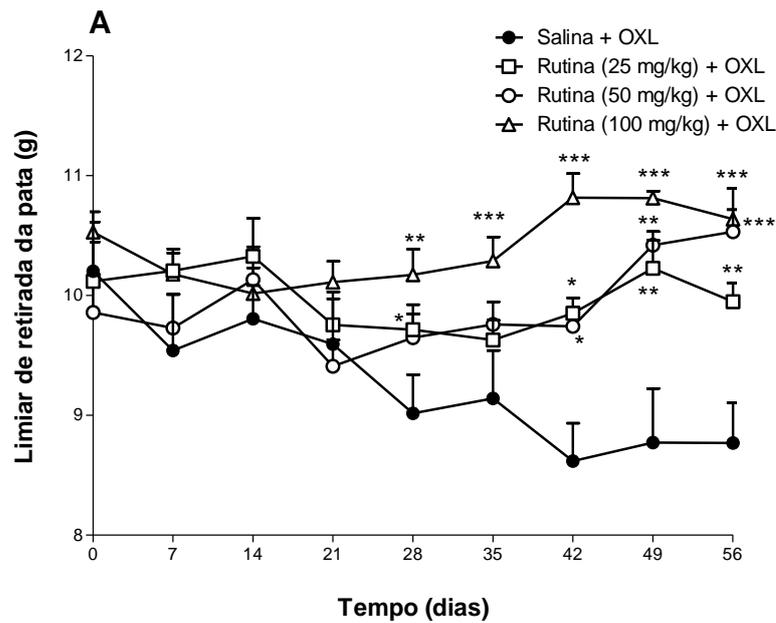


Figura 11. Efeito inibitório da rutina e quercetina na hipernocicepção mecânica plantar induzida pela oxaliplatina em camundongos. Os camundongos foram tratados com 2 injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante quatro semanas e meia, no total de 9 injeções de OXL. Rutina (painel A) ou quercetina (painel B) foi injetado via i.p. 30 min antes da administração de OXL. No grupo controle foi administrado salina em vez de rutina ou quercetina. O teste da hipernocicepção mecânica foi feito antes e a cada 7 dias depois de começar cada tratamento. Os pontos representam a média \pm E.P.M. (seis animais) do limiar de retirada da pata em gramas (g). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA seguido pelo Student Newman-Keul.

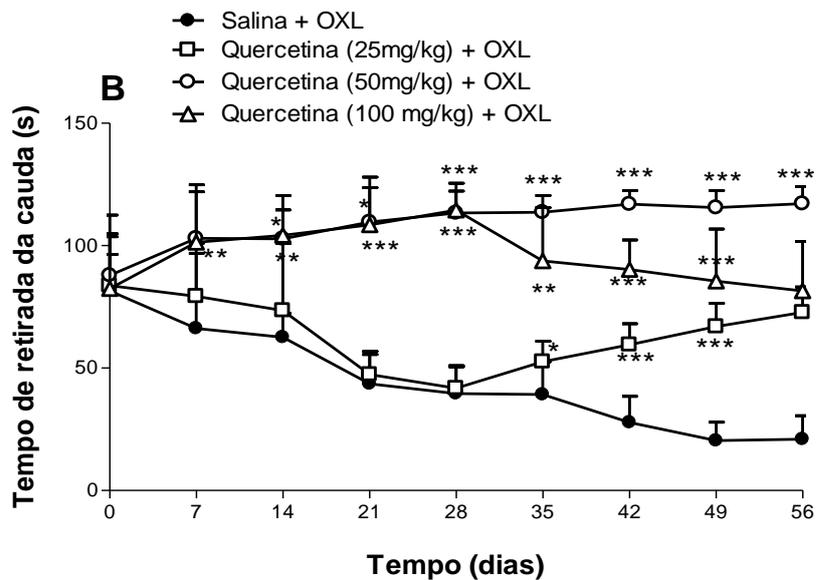
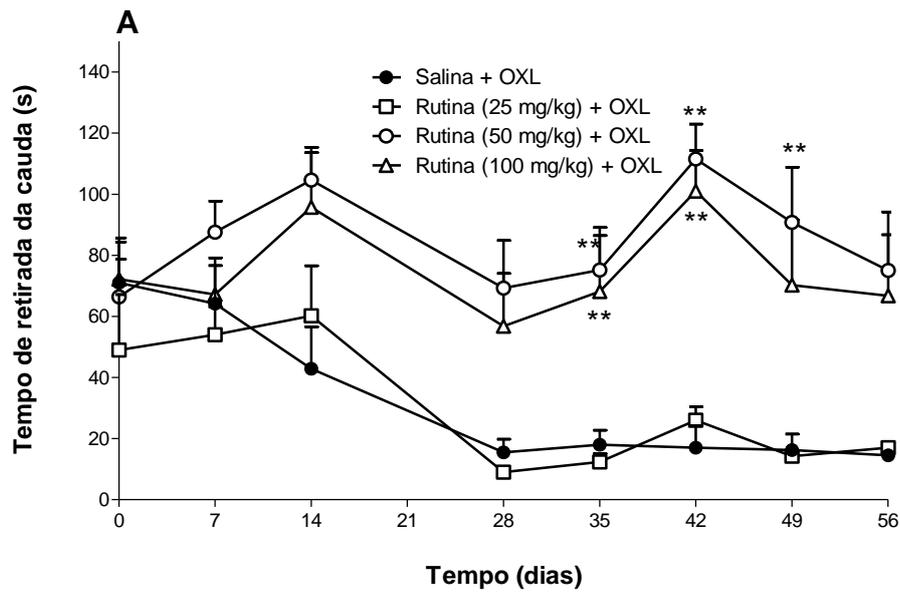


Figura 12. Efeito da rutina e quercetina sobre a alodínia ao frio (10°) em camundongos tratados com OXL. Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante quatro semanas e meia, no total de 9 injeções de OXL. Rutina (Painel A) ou quercetina (Painel B) foi injetado via i.p. 30 min antes da administração de OXL. O grupo controle foi administrado com salina em vez de rutina ou quercetina. O teste térmico (teste da imersão da cauda) foi feito antes e a cada 7 dias depois de começar cada tratamento. Os pontos representam a média \pm E.P.M. (seis animais) do tempo de reação em segundos, depois da imersão da cauda em água fria. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA seguido de Student Newman-Keul.

4.3. Análise histopatológica do corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina e tratados com rutina e quercetina.

A análise histopatológica mostrou diferenças entre os camundongos normais e os tratados com oxaliplatina. Vinte e quatro horas depois de injeção de oxaliplatina, foi observado a presença de espaços lacunares entre as células neuronais, sugerindo edema do tecido nervoso. Nós também observamos uma diminuição progressiva no tamanho dos neurônios, a partir do dia 14, sugerindo uma atrofia de neurônios e aumento do número de células da glia. Ambos rutina e quercetina previnem estas mudanças mantendo o tecido com um aspecto similar ao grupo normal (**Fig.13**).

4.4. Análise histopatológica da pele recolhida das patas dos camundongos submetidos neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina e tratados com rutina e quercetina.

Na análise histopatológica da pele da pata do camundongo injetado com oxaliplatina, mostra a presença de espaços lacunares entre as fibras do colágeno, sugerindo um discreto edema do tecido conjuntivo, sem qualquer outro sinal de processo inflamatório. Este edema parece ser mais evidente na primeira semana de tratamento com oxaliplatina. Ambos rutina e quercetina previnem o desenvolvimento destes eventos (**Fig 14**).

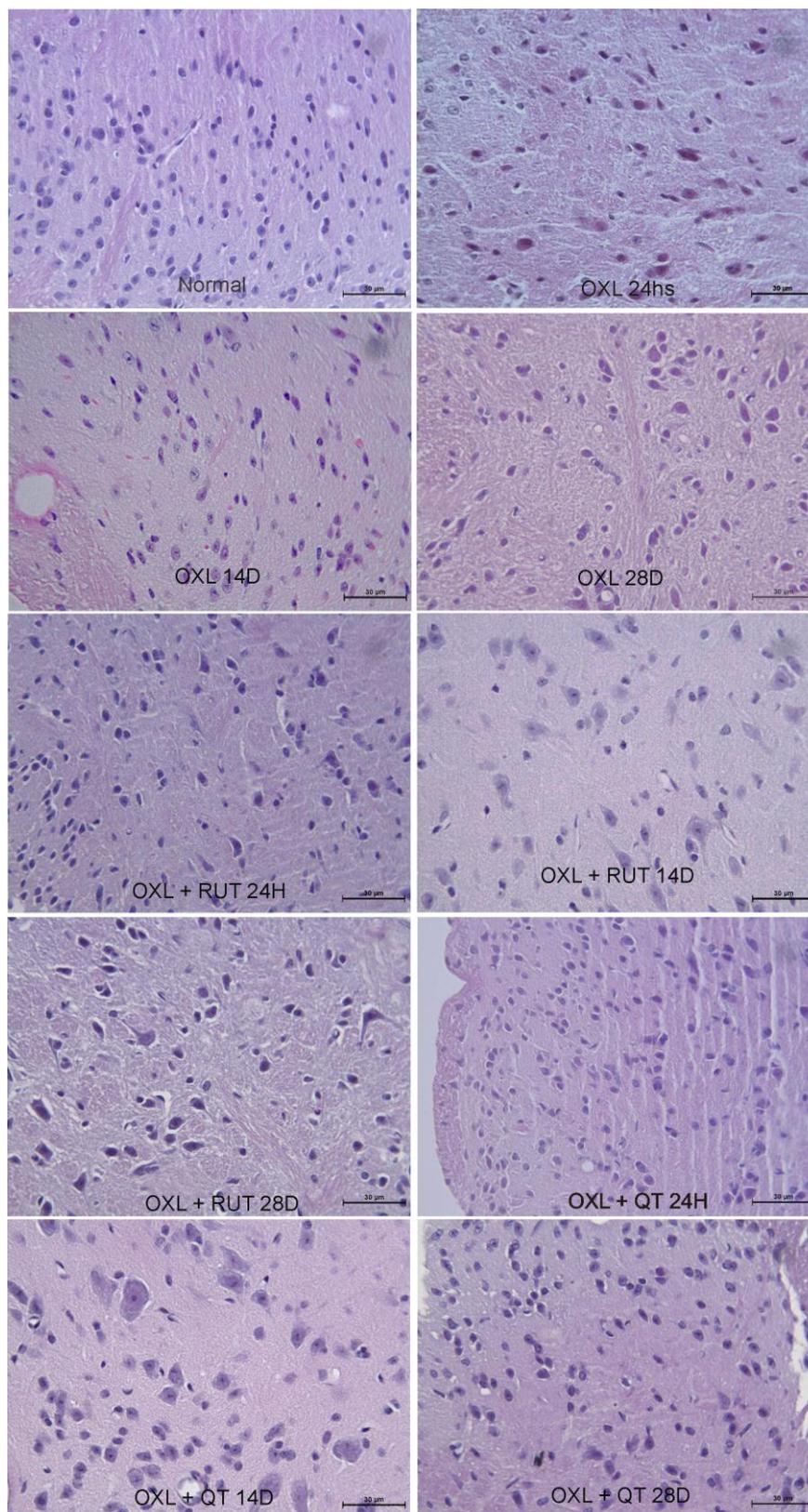


Figura 13. Fotomicrografias do corno dorsal da medula espinal de camundongos submetidos neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT). Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante 4,5 semanas. RUT ou QT (50mg/kg) foi injetada via i.p. 30 min antes da administração de OXL. O grupo controle foi administrado com salina em vez de RUT ou QT Hematoxilina & Eosina 400x.

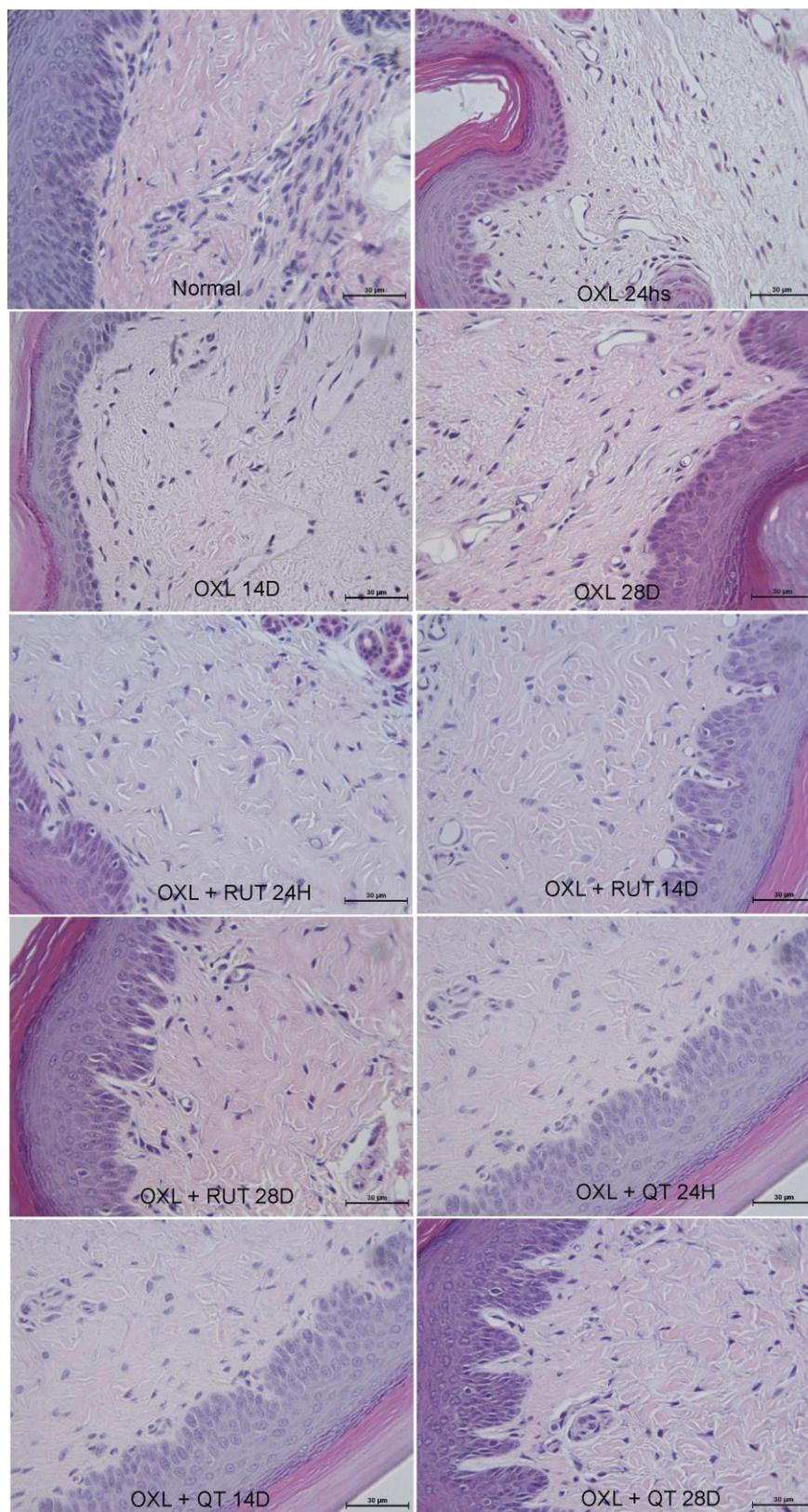


Figura 14. Fotomicrografias da pele retirada das patas de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT). Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante 4,5 semanas. RUT ou QT (50mg/kg) foi injetado via i.p. 30 min antes da administração de OXL. O grupo controle foi administrado salina em vez de RUT ou QT. Hematoxilina & Eosina – 400x.

4.5. Efeito da rutina e quercetina na peroxidação lipídica induzida pela oxaliplatina, nos níveis de malonyaldeido (MDA) e grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH).

Aos 14 dias de tratamento com oxaliplatina, foi evidenciado um aumento da peroxidação lipídica, avaliada pelo experimento do MDA. A **figura 15A** mostra que a oxaliplatina induziu uma significativa ($p < 0,05$) peroxidação lipídica aumentando em torno de 110,1% os níveis de MDA nas amostras de medula espinhal, quando comparado aos camundongos *naïve*. Este efeito foi prevenido ($p < 0,05$) por ambos tratamentos com rutina (65,1%) e quercetina (52,7%). Em relação ao nível de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH), a oxaliplatina promoveu uma redução, sem diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. O tratamento com rutina e quercetina não modificou este efeito (**Fig.15B**)

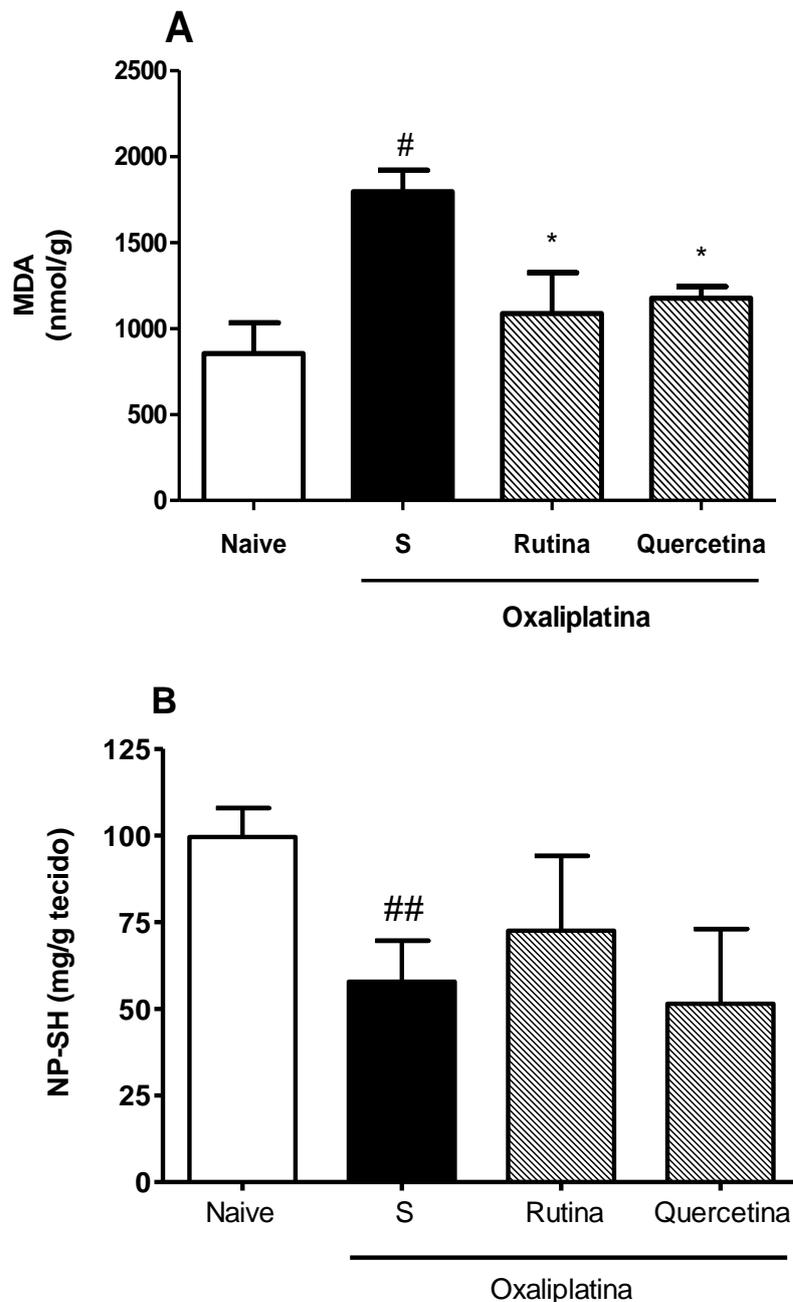


Figura 15. Efeito da rutina e quercetina nos níveis de malondialdeído (MDA) e grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) na medula espinhal. Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de salina, oxaliplatina (1mg/kg) i.v., total de 9 injeções) sozinha ou em combinação com rutina (50mg/kg i.p.) ou quercetina (50mg/kg,i.p.) 30 min antes da administração de oxaliplatina e foram sacrificados no 14^o dia depois da 1^adose. Uma porção da medula espinhal foi coletada e processada para a mensuração do MDA (Painel A) ou níveis de NP-SH (Painel B). Os resultados estão apresentados como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo salina, # $p < 0,05$ vs grupo *naïve*. ANOVA seguido de Student Newman-Keul. ## $p < 0,01$ vs grupo *naïve* (Teste t-student).

4.6. Análise imunohistoquímica do corno posterior da medula espinhal de camundongos submetidos e neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina e tratados com rutina e quercetina.

A análise imunohistoquímica mostrou um aumento na imunoexpressão de c-fos, nitrotirosina e iNOS, a qual foi caracterizada pelas células com coloração marrom no corno dorsal da medula espinhal em camundongos submetidos a neuropatia dolorosa induzida pela oxaliplatina (**Tabela 5** **Fig.16,17,18**). A análise imunohistoquímica da c-fos mostrou uma intensa e significativa expressão ($p < 0,01$; **Tabela 5**) das células neuronais especialmente na região do núcleo (**Fig.16B**) e quando comparado aos animais normais (**Fig.16A**). Ambas rutina (**Fig.16C**) e quercetina (**Fig.16D**) inibiram significativamente este efeito ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente; **Tabela 5**). A análise imunohistoquímica da nitrotirosina mostrou uma intensa e significativa expressão ($p < 0,01$; **Tabela 5**) das células neuronais especialmente a nível citoplasmático (**Fig.17B**) quando comparado ao grupo normal (**Fig.17A**). A quercetina (**Fig.17D**) mas não a rutina (**Fig.17C**) inibiu significativamente este efeito ($p < 0,05$; **Tabela 5**). A análise imunohistoquímica da iNOS mostrou uma intensa e significativa expressão ($p < 0,01$; **Tabela 5**) das células neuronais especialmente a nível de citoplasma (**Fig.18B**) quando comparado ao grupo normal (**Fig.18A**). A quercetina (**Fig.18D**) mas não a rutina (**Fig.18C**) inibiu significativamente este efeito ($p < 0,01$; **Tabela 5**).

Tabela 5: Efeito da Rutina e Quercetina na imunoexpressão da c-FOS, iNOS e Nitrotirosina no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos neuropatia dolorosa induzida pela oxaliplatina.

	C-Fos	Nitrotirosina	NOSi
Naïve	1 (0-2)	1 (1-2)	0,5 (0-1)
OXL+ Salina	3 (2-3)**	3 (2-3)**	2 (2-3)**
OXL + RUT	1 (0-1)###	2 (1-3)	1 (0-2)
OXL + QT	1 (0-1)##	1 (1-2)#	1 (0-1)##

Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante quatro semanas e meia, no total de 9 injeções de OXL. Rutina (RUT) ou quercetina (QT), 50mg/kg foi injetado via i.p. 30 min antes da administração de OXL. O grupo controle foi administrado com salina (OXL+salina) em vez de rutina ou quercetina. *Naïve* são animais não tratados. Os dados são registrados como mediana dos escores e variação dos escores para no mínimo 5 camundongos por grupo. **p<0,01 comparado com grupo *naïve*; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 comparado com grupo OXL+Salina (teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's).

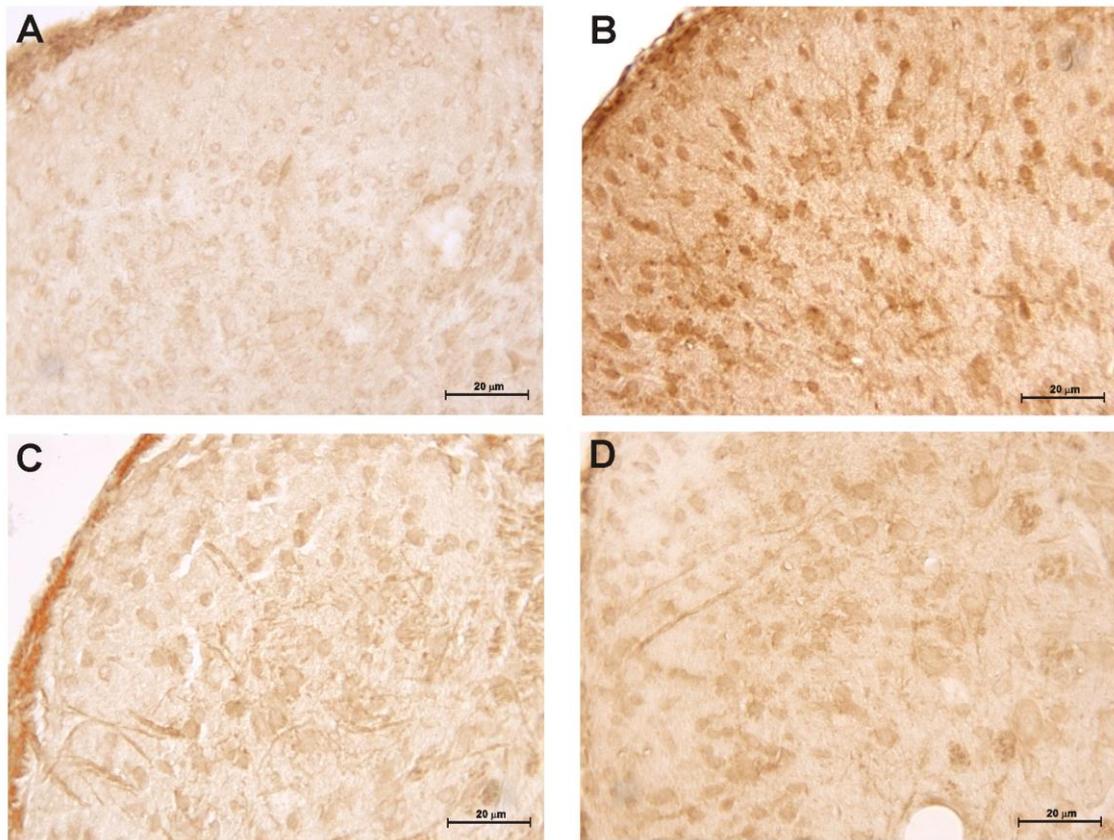


Figura 16. Fotomicrografias da imunoexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT). Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante quatro semanas e meia, no total de 9 injeções de OXL. Rutina ou quercetina (50mg/kg) foi injetado via i.p. 30 min antes da administração de OXL. O grupo controle foi administrado com salina em vez de rutina ou quercetina. A: Animais *naïve*; B: Oxaliplatina mais salina; C: Oxaliplatina mais rutina (50mg/kg) e D: Oxaliplatina mais quercetina (50mg/kg). 400x.

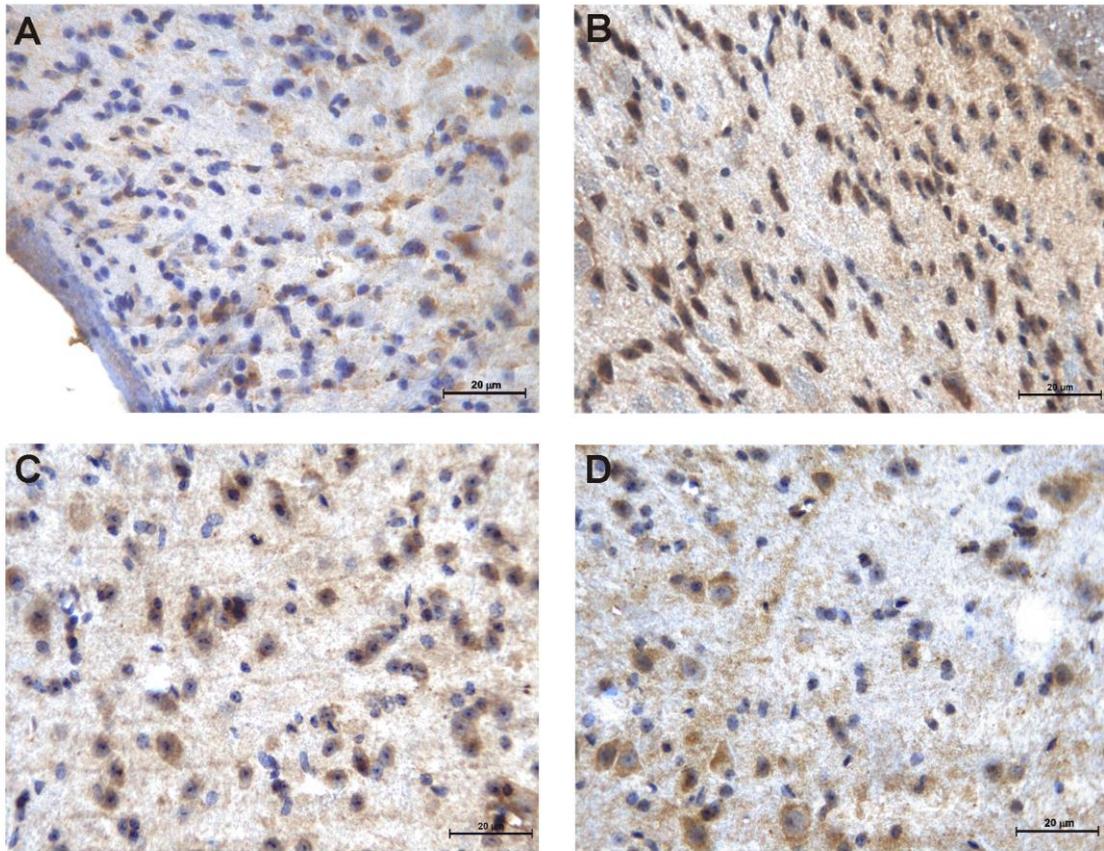


Figura 17. Fotomicrografias da imunoexpressão para nitrotirosina no corno posterior da medula espinhal de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT). Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante quatro semanas e meia, no total de 9 injeções de OXL. Rutina ou quercetina (50mg/kg) foi injetado i.p. 30 min antes da administração de OXL. O grupo controle foi administrado com salina em vez de rutina ou quercetina. A: Animais *naïve*; B: Oxaliplatina mais salina; C: Oxaliplatina mais rutina (50mg/kg) e D: Oxaliplatina mais quercetina (50mg/kg). 400x.

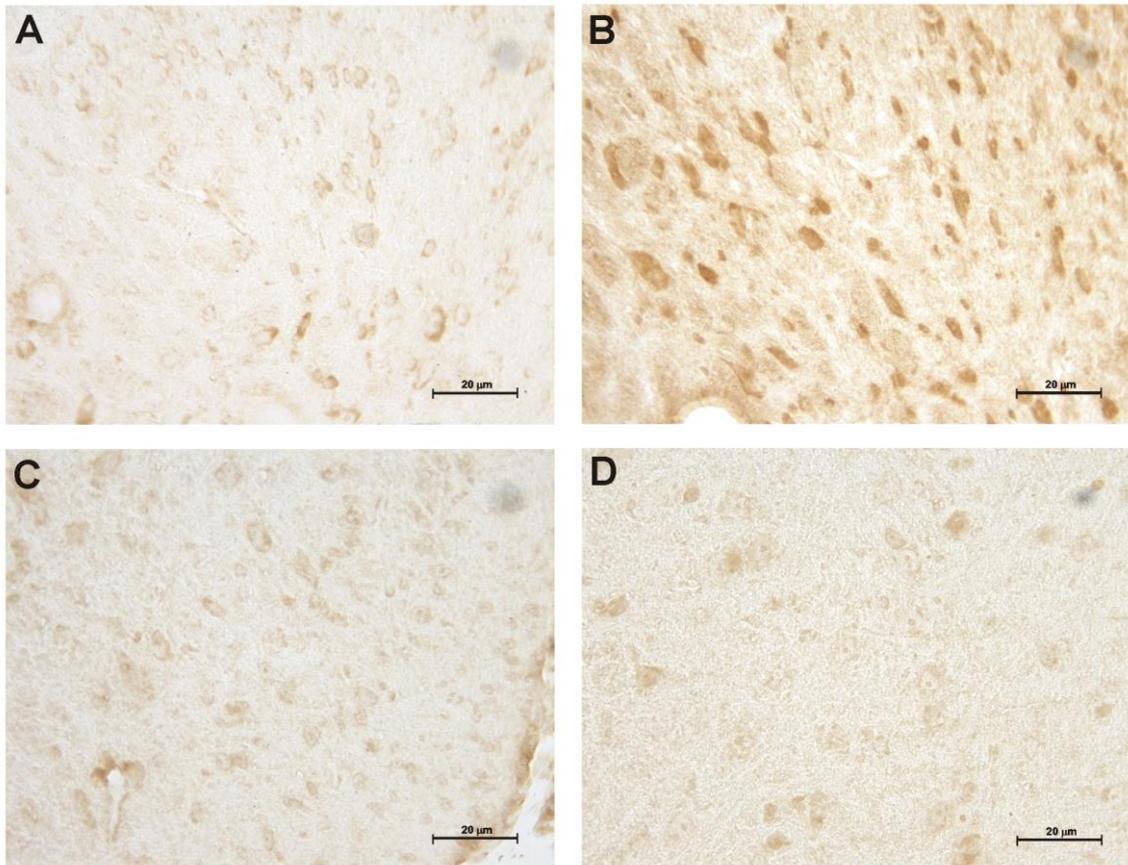


Figura 18. Fotomicrografias da imunoposição para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a neurotoxicidade da oxaliplatina (OXL) e tratados com rutina (RUT) ou quercetina (QT). Camundongos foram tratados com duas injeções por semana de OXL i.v. (1mg/kg) durante quatro semanas e meia, no total de 9 injeções de OXL. Rutina ou quercetina (50mg/kg) foi injetado via i.p. 30 min antes da administração de OXL. O grupo controle foi administrado com salina em vez de rutina ou quercetina. A: Animais *naïve*; B: Oxaliplatina mais salina; C: Oxaliplatina mais rutina (50mg/kg) e D: Oxaliplatina mais quercetina (50mg/kg). 400x.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A neuropatia periférica dolorosa, que parece ser causada por todos os compostos platinos usados na quimioterapia do câncer, permanece um desafio na prática clínica. Entre estes compostos, a oxaliplatina uma droga de 3ª geração desta classe, que é a primeira linha de tratamento do câncer colorretal, desenvolve uma neuropatia aguda e crônica que é dolorosa e de difícil tratamento. A fase aguda afeta quase todos os pacientes recebendo a droga, e a crônica é dose cumulativa e seu efeito limita o tratamento. Este efeito colateral da oxaliplatina tem sido estudado durante estes últimos anos, mas o mecanismo completo é ainda inconclusivo e o tratamento eficaz ainda não existe.

Visto que a neurotoxicidade, funciona como uma idéia chave para o estudo da toxicidade dose-limitante, tem havido esforços consideráveis para desenvolver abordagens de neuroproteção para prevenir ou pelo menos aliviar a neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina. Segundo PARK *et al* (2011) a neuroproteção envolve a recuperação dos componentes do sistema nervoso, incluindo células, redes funcionais e estruturas (VAJDA,2002). Alguns estudos clínicos vêm sendo desenvolvidos no sentido de avaliar a eficácia de agentes neuroprotetores e recentemente metodologias mais objetivas que avaliam também os aspectos neurofisiológicos vem sendo aplicadas.

Segundo PARK *et al* (2011) faltam conhecimentos claros sobre os mecanismos fisiopatológicos que contribuem para a neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina, ficando assim improvável que estratégias neuroprotetivas sejam desenvolvidas principalmente a curto prazo.

Segundo Peltier e Russel (2002), a neuropatia causada por outros quimioterápicos como paclitaxel e vincristina, já estão bem documentadas na literatura, com modelos desenvolvidos para seu estudo. Porém a neuropatia induzida pela oxaliplatina ainda é pouco estudada, existindo poucos modelos animais para a sua investigação. Neste trabalho nós propomos um efeito preventivo e terapêutico para os flavonóides rutina e quercetina no modelo de neuropatia periférica dolorosa induzida pela oxaliplatina em camundongos.

Um estudo anterior realizado em ratos, Ling *et al* (2007a) mostrou que o tratamento com oxaliplatina desenvolve uma dolorosa e duradoura neuropatia demonstrada por testes mecânicos e térmicos. Eles usaram as doses de 1, 2 e 4 mg/kg de oxaliplatina em repetidas administrações por via endovenosa.

Outro trabalho utilizou o mesmo protocolo de Ling *et al* (2007a) em camundongos onde o modelo foi reproduzido e modificado (Pontes 2009). Nesse estudo foram realizados os testes de hipernocicepção mecânica e testes térmicos (teste da imersão da cauda) em temperatura fria (10°C) ou quente (42°C) não nociva (para verificar o desenvolvimento de alodínia térmica) e em temperatura fria (4°C) ou quente (46°C) nociva (para verificar o desenvolvimento de hiperalgesia térmica) utilizando-se as doses de 1, 2, e 4mg/kg. Do resultado de todos os testes, foi concluído que a dose de 1 mg/kg foi a mais eficaz dentre as outras (dados não mostrados). Baseado nessas evidências, nós escolhemos esta dose para investigar o efeito dos flavonóides e seu mecanismo de ação.

Nos experimentos comportamentais, nós mostramos que ambos rutina e quercetina são capazes de inibir a hipernocicepção mecânica nas patas traseiras dos camundongos submetidos a esta neuropatia. Também o efeito foi observado na alodínia ao frio pelo teste da imersão da cauda. Nós observamos que nestes experimentos a quercetina demonstrou um melhor efeito que a rutina. Supomos que o efeito neurotóxico da oxaliplatina seja realmente sobre o sistema sensitivo. Não fizemos testes para investigar o envolvimento do sistema nervoso motor, mas anteriormente Ling *et al.*, (2007^a) realizou a avaliação da toxicidade geral em ratos tratados com oxaliplatina incluindo a atividade motora que foi monitorizada durante 7 dias e também um teste para avaliar a força motora “Grip Strength test”. Além disso, Pontes (2008) realizou o teste de “rota-rod” em camundongos para avaliação de equilíbrio e coordenação motora para descartar esse tipo de comprometimento.

A imunoexpressão de c-Fos nos neurônios do corno posterior da medula espinhal corrobora a idéia que existe uma ativação de uma via nociceptiva pela oxaliplatina, já que os neurônios do corno posterior demonstraram uma maior expressão para c-Fos no grupo tratado com oxaliplatina. Rutina e quercetina inibiram a expressão para c-Fos sugerindo um efeito antinociceptivo destes flavonóides, além dos resultados dos experimentos comportamentais.

Diversos estudos da literatura utilizam a expressão de c-Fos como uma ferramenta para demonstrar a presença de neurônios nocirresponsivos especialmente na medula espinhal (BULLITT E. *et al.*, 1992; CINTRA; MOLANDER; FUXE, 1993; HERDEGEN *et al.*, 1994; MORGAN; GOGAS; BASBAUM, 1994; BULLITT, 1989). GOGAS *et al.* (1991) comenta que a imunohistoquímica da proteína Fos pode ser utilizada como um meio de monitorar a atividade de grandes populações neuronais, em resposta a estímulos nocivos persistentes e Presley *et al.* (1990) mostrou que há forte correlação entre o comportamento gerado pela dor e o número de células que expressam a proteína Fos. O assunto foi discutido, na revisão apresentada por Harris em 1998. Além disso, a proteína Fos parece não ser produzida por células gliais, ependimais ou endoteliais (MUGNAINI *et al.*, 1989). De nosso conhecimento, até a presente data, não encontramos trabalhos na literatura associando a hiperalgesia e alodinia da oxaliplatina à expressão de c-fos na medula espinhal de modo semi-quantitativo e nem a inibição por rutina e quercetina dessa expressão.

Com relação aos aspectos morfológicos da medula espinhal foi observado que os animais tratados com oxaliplatina apresentaram mudanças evidenciadas na análise histopatológica como diminuição do corpo celular neuronal, aumento do número de células gliais e o aparecimento de espaços lacunares no entre as células neuronais. Esses aspectos foram avaliados na área do corno dorsal da substância cinzenta da medula que é reconhecido como sendo o local de sinapse e onde se encontram os corpos celulares dos neurônios de projeção que fazem parte da via antero-lateral do sistema somestésico. Outros autores mostraram que outro composto platino, cisplatina, causa dano ao DNA nuclear neuronal assim como vacuolização mitocondrial (EASTMAN 1987, WINDEBANK; GRISOLD, 2008; PODRATZ *et al.*, 2011). Outro trabalho mostrou que em 144 horas de tratamento com cisplatina, mudanças morfológicas foram observadas, como a diminuição no tamanho dos neurônios, assim como a vacuolização mitocondrial extensiva em todo o corpo celular, enquanto a membrana nuclear permaneceu intacta (PODRATZ *et al.*, 2011). Recentemente Xiao, Zheng e Bennett (2011) publicaram um estudo comparando a neuropatia periférica induzida por oxaliplatina com a induzida por paclitaxel. Nesse artigo eles discutem o efeito da oxaliplatina sobre as mitocôndrias de neurônios periféricos. A injúria mitocondrial induzida por quimioterapia

possivelmente é o evento que leva à hipernocicepção térmica e mecânica. A disfunção mitocondrial deve causar um aumento na liberação de elétrons livres do sistema transportador de elétrons e subseqüentemente a geração de estresse oxidativo (DOYLE *et al.*, 2011, XIAO; ZHENG; BENNETT , 2011).

As mudanças histopatológicas na área do corno dorsal da medula foram também prevenidas pela rutina e quercetina, com um efeito mais eficaz da quercetina. Nós observamos que os flavonóides preveniram o encolhimento de neurônios depois de 14 dias assim como a formação de leve edema que ocorreu a partir de 24 horas. Um edema também ocorreu no tecido conjuntivo das patas traseiras que foi também prevenido pelos flavonóides.

Joseph e colegas mostraram que a neuropatia periférica aguda dolorosa induzida pela oxaliplatina parece ser mediada por um mecanismo estresse-oxidativo dependente nos nociceptores IB-4 positivos (JOSEPH *et al.*, 2008). Estes autores investigaram este efeito da oxaliplatina a nível periférico e sugerem que o dano periférico gerado por estresse oxidativo é responsável pela neurotoxicidade aguda. Talvez o edema periférico das patas traseiras, encontrado em nossos experimentos, poderia ser explicado por este trabalho. Eles também demonstraram que substâncias antioxidantes previnem este efeito (JOSEPH *et al.*, 2008). Neste aspecto, nos propusemos investigar o efeito de compostos com propriedades antioxidantes bem conhecidas, neste efeito da oxaliplatina. Nós acreditamos que os eventos agudos levam a neuropatia crônica e que o estresse oxidativo está envolvido neste mecanismo.

Ainda sobre a neuropatia aguda, um estudo bem recente (NASSINI *et al.*, 2011) investigou a alodínia mecânica e térmica provocada pela oxaliplatina via TRPA1 (receptor potencial transitório Ankyrin 1), um canal catiônico que ativado pelo estresse oxidativo e pelo frio, contribuiu para a hipernocicepção mecânica e ao frio, causada pela oxaliplatina e pela cisplatina. Uma única dose de oxaliplatina produz hipernocicepção mecânica e térmica ao frio em ratos, um efeito diminuído seletivamente pelo antagonista do TRPA1, o HC030031. A administração da oxaliplatina causou também os mesmos sintomas em camundongos. Ambas as respostas ficaram ausentes nos camundongos deficientes de TRPA1. Supõe-se então que o TRPA1 é requerido para a hipernocicepção mecânica e térmica (frio)

evocada pela oxaliplatina, contribuindo para o fenótipo neuropático existente. No entanto, o mecanismo preciso desse presumível e diferente envolvimento, necessita ainda ser identificado. Os achados desse estudo, sugerem que tendo em vista esse novo mecanismo, os antagonistas do TRPA1, podem proteger pacientes e efeitos neuropáticos sem afetar o potencial anti-neoplásico dos compostos platinos.

Vem sendo avaliado em ensaios clínicos a eficácia de substâncias antioxidantes como a glutatona, acetilcisteína, glutamina e amifostina (revisado por WEICKHARDT, WELLS E MESSERSMITH, 2011). Além dos agentes antioxidantes estudos clínicos avaliaram a eficácia da infusão de cálcio/magnésio para a prevenção dos efeitos neurotóxicos, mas ainda inconclusivos, pois alguns estudos mostram que tem eficácia e outros não (HOCHSTER *et al.*, 2007; GAMELIN *et al.*, 2004; KNIJN *et al.*, 2011; GROTHEY *et al.*, 2011 GAMELIN *et al.*, 2008). Em adição existem estudos com drogas anticonvulsivantes e antidepressivos, além da estratégia "stop and go" todos com o intuito de avaliar a prevenção (WEICKHARDT, WELLS E MESSERSMITH, 2011).

Os flavonóides que são compostos com propriedades antioxidantes juntamente com seu efeitos anti-inflamatórios (AGARAWAL *et al.*, 1998; LOGGIA *et al.*, 1986; FERRANDIZ *et al.*, 1991) e antinociceptivos (TALL; RAJA, 2004; RICE-EVANS *et al.*, 1995), demonstraram que flavonóides com cianidina e quercetina tem potenciais antioxidantes quatro vezes mais que o Trolox, o análogo da vitamina E. A quercetina, através do bloqueio da produção das ROS, também protege as células hipocampais do camundongo, da toxicidade oxidativa e da peroxidação lipídica induzida pelo glutamato. Ela tem também um efeito inibitório sobre a neurotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo, como foi demonstrado em três distintos mecanismos. Afeta diretamente o metabolismo do GSH, agindo como antioxidantes, e mantendo baixos os níveis de cálcio mesmo com altos níveis de ROS. No estudo de Ansari *et al* (2009), a quercetina e rutina são apresentadas como tendo no mínimo duas destas propriedades: metabolismo do GSH e propriedade de varrer os radicais livres (ROS) (ANSARI *et al.*, 2009). O anel insaturado C da quercetina confere uma característica adicional para este flavonóide a respeito de seu efeito neuroprotetor (ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001).

Outros autores demonstraram que a quercetina diminui a peroxidação lipídica com a reversão na diminuição do GSH e suas enzimas dependentes assim como a reversão na diminuição nos níveis de catalases e SOD. Esta propriedade antioxidante foi associada com a habilidade da quercetina de reverter significativamente os déficits de retenção induzidos pelo uso crônico de etanol e também os relacionados com a idade, no desempenho cognitivo dos camundongos (SANDERS; RAUSCHER; WATKINS, 2001; SINGH; NAIDU; KULKARNI, 2003).

Em nosso estudo, a oxaliplatina induziu estresse oxidativo principalmente por um mecanismo de peroxidação lipídica e peroxidação de proteínas. O aumento do malonaldeído assim como a imunomarcagem para nitrotirosina foi observado nas medulas retiradas de camundongos tratados com oxaliplatina, mas que não receberam rutina e quercetina. O efeito nos grupos sulfidrílicos não protéicos revelou uma tendência a diminuição, mas a análise estatística não mostrou resultados significantes. Ambos rutina e quercetina mostraram efeito antioxidante como foi mostrado pela inibição do processo de peroxidação lipídica assim como a diminuição da imunexpressão de nitrotirosina no corno posterior da medula espinhal.

O peroxinitrito é um poderoso oxidante formado pela reação do óxido nítrico (NO) com o superóxido e é mais reativo que seus precursores. As reações do peroxinitrito levam a formação de dióxido de nitrogênio e radicais hidroxil, assim como a formação dele mesmo, reagindo diretamente com moléculas alvo que a maioria das vezes são proteínas ou lipídios. Isto pode ser identificado nos tecidos pela formação de nitrotirosina e a peroxidação lipídica (ALVAREZ; RADI, 2003). Em uma publicação recente, Kumar *et al.*, (2010), mostrou que o peroxinitrito e as ROS, gerados por excesso de glutamato, são responsáveis pela morte das células neuronais no córtex cerebral de ratos (KUMAR; SINGH; BABU, 2010). Além disso, estes autores demonstraram que um bolus de glutamato também aumentou RNAm da NOSi e NOSn. No estágio inicial da neurotoxicidade há um rápido aumento do Ca^{+2} intracelular, com geração de ROS e diminuição de GSH. Este evento então leva a alterações dos níveis de RNAm de NOSn e NOSi, com a geração de NO e o peroxinitrito tóxico (ONOO-), o qual passa por reações químicas com vários substratos como nitração de tirosina e peroxidação lipídica (KUMAR; SINGH; BABU, 2010).

Nossos dados mostram que rutina e quercetina inibem a expressão da NOSi na região do corno dorsal da medula espinhal e é possível que o efeito protetor desses flavonoides na neurotoxicidade da oxaliplatina é, pelo menos em parte, devido a esta ação. Os dados da literatura também registraram que as flavonas inibem a produção de óxido nítrico (KRÓL *et al.*, 1995) e que quercetina e rutina inibem a expressão de NOSi, induzida pelo LPS, em cultura de macrófagos por análise com western blot, (CHEN *et al.*, 2001). Além disso, a quercetina, através do seu potente efeito antioxidante, é capaz de prevenir a citotoxicidade induzida pela cisplatina em células LLC-PK1, *in vitro*, e a injúria tubular induzida pela isquemia renal aguda, *in vivo*, assim como também inibir a produção de NO induzida por LPS (KUHLMANN *et al.*, 1998; MIDDLETON, 1998).

Dados da literatura também discutem o uso de substâncias antioxidantes na clínica. Substâncias como glutathiona, glutamina, acetilcisteína e amifostina já foram testados em ensaios clínicos e todas apresentaram resultados promissores. Dentre esses a amifostina merece destaque pela sua alta capacidade de varredor de radicais livres, tendo apresentado um desempenho superior a glutathiona quando dada de modo profilático (WEICKHARDT; WELLS; MESSERSMITH, 2011). A amifostina (Ethyol®), que é um agente protetor de amplo espectro, foi desenvolvido na década de 1950 com o intuito de desenvolver uma droga capaz de proteger os americanos contra os efeitos da radiação de uma bomba nuclear. Hoje é utilizada na clínica na tentativa de proteger órgãos e tecidos de diversos tipos contra os danos causados pela radioterapia e quimioterapia do câncer.

A amifostina também foi estudada em modelo experimental de neuropatia induzida por oxaliplatina no LAFICA. Lino (2010) demonstrou o excelente efeito da amifostina em diminuir a neuropatia induzida por oxaliplatina em camundongos com aumento da imunexpressão para NOSi já a partir de 24 horas. Apesar das evidências experimentais nesse estudo sugerirem que o efeito neuroprotetor da amifostina seja por meio de uma atividade antioxidante, a autora não fez testes específicos para avaliar o potencial de estresse oxidativo gerado pela oxaliplatina em nenhum tipo de tecido. Apesar de ter demonstrado de forma inédita o potencial neuroprotetor da amifostina os dados de mecanismo ainda são inconclusivos.

Neste modelo, de Ling (2007a) modificado por Pontes (2009), Lino observou um aumento da imunexpressão para NOSi já a partir de 24 horas no grupo tratado com OXL, sendo mais acentuado no 21º e 28º dias de tratamento. O pré-tratamento com amifostina, no entanto não foi capaz de modificar tal efeito. Igualmente na avaliação de NOSn observou-se um aumento da sua imunomarcção no grupo tratado com OXL, e também não foi modificado pelo pré-tratamento com amifostina. Foi observado a participação da NOSi nos estgios iniciais da neuropatia por OXL, enquanto que a NOSn se expressa nos estgios mais tardios da neuropatia, sugerindo assim a expresso inicial da NOSi como reguladora da expresso tardia de NOSn.

Em nosso experimento, houve aumento expressivo da imunexpresso para NOSi no corno posterior da medula, porem o efeito foi inibido significativamente pela quercetina, mas no significativamente pela rutina.

O nosso estudo tentou aprofundar mais o assunto envolvendo a neurotoxicidade da oxaliplatina correlacionando o real potencial indutor dessa droga de estresse oxidativo. Os testes bioquímicos associados ao estudo imunohistoquímico nos forneceram subsídios para sugerir que oxaliplatina induz estresse oxidativo a nível medular com aumento da expresso da NOSi, provavelmente a geraço aumentada de NO e peroxinitrito, o que levaria a peroxidaço de lípedes e proteínas. Provavelmente esses eventos levariam ao dano neuronal com encolhimento dos corpos celulares de neurônios, aumento do numero de células gliais e também os espaços lacunares que aparecem na malha de neuróplios da substancia cinzenta do corno dorsal da medula.

Substâncias, com reconhecida atividade anti-oxidante como os flavonóides rutina e quercetina, inibem todos esses efeitos e diminuem a sintomatologia dolorosa associada ao fenômeno, nos permitindo inferir que os eventos estão correlacionados. Um trabalho recente de Carvalho et al. (2010), mostrou que a quercetina atenua o desenvolvimento da pancreatite aguda induzida pela ceruleina, em camundongos, através de mecanismos anti-inflamatório e antioxidante, reduzindo a infiltraço de neutrófilos, a geraço de citocinas inflamatórias e aumentando as citocinas anti-inflamatórias.

Nosso trabalho não nos permite, contudo, concluir se o estresse oxidativo também acontece na periferia, como demonstrou Joseph et al. (2008), e nem se as alterações centrais são dependentes das alterações periféricas e vice-versa. Para isso, teríamos que ter avaliado os gânglios das raízes dorsais e as terminações nervosas dos tecidos periféricos como os tecidos das patas. O único parâmetro, que talvez contribua para uma especulação a esse nível, é o aspecto histopatológico do tecido retirado da planta das patas traseiras que revelou um discreto edema no grupo injetado com a oxaliplatina e a redução desse efeito, nos grupos tratados com rutina e quercetina, porém os resultados necessitam de mais investigação futura, na busca de agentes neuroprotetores que possam tratar e principalmente prevenir a neurotoxicidade aguda e crônica que limita o tratamento com a oxaliplatina e é motivo de grande sofrimento para os pacientes oncológicos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados no nosso trabalho, concluímos que a rutina e a quercetina previnem o desenvolvimento da hipernocicepção mecânica e alodínia térmica induzidas pela oxaliplatina em camundongos. O efeito protetor da quercetina, na maioria dos parâmetros avaliados, foi superior ao da rutina. O mecanismo neuroprotetor parece ser, ao menos em parte, devido a prevenção do dano causado pelo estresse oxidativo nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, como a peroxidação lipídica e nitrosilação de proteínas. Visto que a quercetina diminui a expressão da NOSi, provavelmente o mecanismo protetor envolveria a diminuição da produção de NO e da geração de peroxinitrito e consequentemente do estresse oxidativo.

Os dados aqui presentes podem levar a uma melhor compreensão da patogênese da neuropatia induzida pela oxaliplatina e assim ao desenvolvimento de novas abordagens, como a prevenção do dano oxidativo, para tratar esta condição.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBADIE, C.; BESSON, J-M; CALVINO, B. c-fos expression in the spinal cord and pain related symptoms induced by chronic arthritis in the rat are prevented by pretreatment with Freund's adjuvant. **J. Neurosci.**, v.14, p.5865-5871, 1994.
- AGARWAL, O. P. The anti-inflammatory action of nepitrin, a flavonoid. **Agents Actions**, v.12 (3), p.298-302, 1982.
- ALVAREZ, B.; RADU, R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 295-311, 2003.
- ALVES NETO. **Dor: princípios e prática**, São Paulo: Artmed, 2009.
- ANDRÉ, T.; BONI, C.; MOUNEDJI-BOUDIAF, L.; NAVARRO, M.; TABERNERO, J.; HICKISH, T.; TOPHAM, C.; ZANINELLI, M.; CLINGAN, P.; BRIDGEWATER, J.; TABAH-FISCH, I.; DE GRAMONT, A. Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 2343-2351, 2004.
- ANJANEYULU, M.; CHOPRA K. Quercetin attenuates thermal hyperalgesia and cold allodynia in STZ-induced diabetic rats. 2004 **Indian J Exp Biol.** v. 42(8), p. 766-769, 2004.
- ANSARI, M. A.; ABDUL, H. M.; JOSHI, G.; OPII, W. O.; BUTTERFIELD, D. A. Protective effect of Quercetin in primary neurons against Abeta (1-42): relevance to Alzheimer's disease. **J. Nutr. Biochem.**, 2009 v. 20(4), p. 269-275, 2009.
- ARGYRIOU, A. A.; CHRONI, E.; POLYCHRONOPOULOS, P.; ICONOMOU, G.; KOUTRAS, A.; MAKATSORIS, T.; GEROLYMOS, M. K., GOURZIS, P., ASSIMAKOPOULOS, K.; KALOFONOS, H. P. Efficacy of oxcarbazepine for prophylaxis against cumulative oxaliplatin-induced neuropathy. **Neurology**, v.67(12), p. 2253-2255, 2006.

- ARGYRIOU, A. A.; Polychronopoulos, P.; Iconomou, G.; Chroni, E.; Kalofonos, H. P. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. **Cancer. Treat. Rev.**, v. 34(4), p. 368-377, 2008.
- AUTHIER, N.; GILLET, J.P.; FIALIP, J.; ESCHALIER, A.; COUDORE, F. A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. **Neuro Toxicology**, v.24, p.797-805, 2003.
- AUTHIER, N., BALAYSSAC, D.; MARCHAND, F.; LING, B.; ZANGARELLI, A.; DESCOEUR, J.; COUDORE, F.; BOURINET, E.; ESCHALIER, A. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. **Neurotherapeutics**, v. 6(4), p.620 – 629, 2009.
- BACKONJA, M.; BEYDOUN, A.; EDWARDS, K. R.; SCWARTZ, S. L.; FONSECA, V.; HES, M.; LaMOREAUX, L.; GAROFALO, E. Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 280 (21), p. 1831-1836, 1998.
- BENNET, G. J. Neuropathic pain: an overview. In: Borsook D, ed **Molecular Neurobiology of Pain**. Seattle, Wash, IASP Press; 1997.
- BENNET, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v.33, p. 87-107, 1988.
- BINDER, A.; STENGEL, M.; MAAG, R.; WASNER, G.; SCHOCH, R.; MOOSIG, F.; SCHOMMER, B.; BARON, R. Pain in oxaliplatin-induced neuropathy--sensitisation in the peripheral and central nociceptive system. **Eur. J. Cancer**, v.43(18), p. 2658 – 2663, 2007.
- BULLITT, E.; LEE, C. L.; LIGHT, A. R.; WILLCOCKSON, H. The effect of stimulus duration on noxiousstimulus induced c-fos expression in the rodent spinal cord. **Brain Res.**, v. 580, p. 172 - 179, 1992.
- BULLITT, E.; Induction of c-fos-like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. **Brain Res.**, v. 493, p. 391-397, 1989.

CAMPBELL , J. N.; MEYER, R. A.; Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron.**, v. 52, p. 77 - 92, 2006.

CARVALHO, K. M.; MORAIS, T. .; DE MELO, T. S.; DE CASTRO BRITO, G. A.; DE ANDRADE, G. M.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Biol Pharm Bull.**,v. 33(9),p. 1534 – 1539, 2010.

CASCINU, S.; CATALANO, V.; CORDELLA, L.; LABIANCA, R.; GIORDANI, P.; BALDELLI, AM.; BERETTA, G. D.; UBIALI, E.; CATALANO, G. Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J. Clin. Oncol.**, v.20 (16), p.3478 - 3483, 2002.

CASSIDY, J.; CLARKE, S.; DÍAZ-RUBIO, E.; SCHEITHAUER, W.; FIGER, A.; WONG, R.; KOSKI, S.; LICHINITSER ,M.; YANG, T.; S.; RIVERA, F.; COUTURE, F.; SIRZÉN, F.; SALTZ, L. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, 26(12):2006-12, 2008.

CAVALCANTE, I. L.; MADALENA, M. **DOR**, Rio de Janeiro: Editores autores SAERJ, 2003.

CAVALETTI, G.; FRIGENI, B.; LANZANI, F.; PIATTI, M.; ROTA, S.; BRIANI, C.; ZARA, G.; PLASMATI, R.; PASTORELLI, F.; CARACENI, A.; PACE, A.; MANICONE, M., LISSONI, A.; COLOMBO, N.; BIANCHI, G.; ZANNA, C.; ITALIAN NETOX GROUP. The total neuropathy score as na assessment tool for grading the course of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: comparison with the National Cancer Institute Common Toxicity Scale. **J. Peripher. New Sys.**, v. 12, p. 210 - 215, 2007.

Chen, Y. C.; Shen, S. C.; Lee, W. R.; Hou, W. C.; Yang, L. L; Lee , T. J. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin

- pentaacetate in RAW 264.7 macrophages., **J. Cell. Biochem.**, v. 82, p. 537 - 548, 2001.
- CHONG, M. S.; BRANDNER, B. Neuropathic agents and pain. New strategies. **Biomed. Pharmacother.**, v 60, p. 318-322, 2006.
- CHU, E. Oxaliplatin: The new member of the class. In: MARSHALL, J. **The Clinical Use of Oxaliplatin**: case studies and roundtable discussion. 1st edition, New York: Oncology, 2004.
- CINTRA, A.; MOLANDER, C; FUXE, K. Colocalization of Fos and glucocorticoid receptor-immunoreactivities is present only in a very restricted population of dorsal horn neurons of the rat spinal cord after nociceptive stimulation. **Brain Res.**, v. 632, p. 334 - 338, 1993.
- COTRAN, S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBINS. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a edição, Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2000.
- CUNHA , T. M.; VERRI, W. A . JR.; VIVANCOS, G. G., MOREIRA, I. F.; REIS ,S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An eletronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v. 37(3), p. 401 - 407, 2004.
- CVITKOVIC, E; BEKRADA, M. Oxaliplatin: a new therapeutic option in colorectal câncer. **Semin Oncol**, v. 26, p. 647 - 662, 1999.
- DAJAS, F.; ARREDONDO, F.; ECHEVERRY, C.; FERREIRA, M.; MORQUIO, A.; RIVERA, F. Flavonoids and the brain: evidences and putative mechanisms for a protective capacity Curr. **Neuropharmacol.**,v. 3, p. 193– 206, 2005.
- DE GRAMONT, A.; FIGER, A.; SEYMOUR, M.; HOMERIN, M.; HMISSI, A.; CASSIDY, J.; BONI, C.; CORTES-FUNES, H.; CERVANTES, A.; FREYER, G.; PAPAMICHAEL, D.; LE BAIL, N.; LOUVET, C.; HENDLER, D, DE BRAND, F.; WILSON, C.; MORVAN, F.; BONETTI, A.. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 2938 - 2947, 2000.

- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci**, v. 65(4), p. 337 - 353, 1999.
- DICKENSEN, A H. Central acute pain mechanisms. **Ann. Med.**, v. 27, p. 223 - 227, 1995.
- DOYLE, T.; CHEN, Z.; SALVEMINI, D. Peroxynitrite decomposition catalyst blocks paclitaxel-induced neuropathic pain: microarray analysis of spinal cord gene expression. **J. Pain**, v. 12 (2), p. 37, 2011.
- DURAND, J. P.; BREZAULT, C.; GOLDWASSER, F. Protection against oxaliplatin acute neurosensory toxicity by venlafaxine. **Anticancer Drugs**, v. 14(6), p. 423 - 425, 2003.
- DWORKIN, R. H. An overview of neuropathic pain: syndroms, symptoms, signs and several mechanisms. **Clin J Pain**, v. 18, p. 343 - 349, 2002.
- DWORKIN, R. H.; O'CONNOR, A. B.; BACKONJA, M.; FARRAR, J. T.; FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S.; KALSO, E. A.; LOESER, J. D.; MIASKOWSKI, C.; NURMIKKO, T. J.; PORTENOY, R. K.; RICE, A. S.; STACEY, B. R.; TREEDE, R. D.; TURK, D. C.; WALLACE, M. S.; Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132 (3), p. 237 - 251, 2007.
- EASTMAN, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. **Pharmacol. Ther.**, v. 34, p.155 – 166, 1987.
- ECHEVERRY, C.; ARREDONDO, F.; ABIN-CARRIQUIR, J. A.; MIDIWO, J. O., OCHIENG, C.; KERUBO, L.; DAJAS, F. Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 58 (4), p. 2111-2115, 2010.
- EMIM, J. A. S.; OLIVEIRA, A. B.; LAPA, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. **J. Pharm.**, v. 46, p. 118 – 122, 1994.

- FERRANDINA, G.; ALMADORI, G.; MAGGIANO, N.; LANZA, P.; FERLINI, C.; CATTANI, P.; PIANTELLI, M.; SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F. O.; Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors. **Int. J. Cancer**, v.77 (5), p. 747-54, 1998.
- FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. Anti-inflammatory activity and inhibition arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v. 32, p. 283 - 288, 1991.
- FERREIRA, S. H. **Entre a compreensão e a confusão: alodínia e hiperalgesia.** Editorial 31(3), 2003. Disponível em :<http://www.dol.inf.br>. Acesso em: 10/06/2007.
- FERREIRA, S. H. et al. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, O. et al. **Dor: princípios e prática.** São Paulo: Artmed, 2009.
- GALUZZI, K. E. **Conduta na dor neuropática, JAOA**, v. 107 (11), 2007.
- GAMELIN, E.; GAMELIN, L.; BOSSI, L.; QUASTHOFF, S. Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. **Semin. Oncol.** v.29, p.21-33, 2002.
- GAMELIN, L.; BOISDRON-CELLE, M.; DELVA, R.; GUÉRIN-MEYER, V.; IFRAH, N.; MOREL, A.; GAMELIN, E. Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. **Clin Cancer Res.**, v.10, p. 4055 - 4061, 2004.
- GAMELIN, L.; BOISDRON-CELLE, M.; MOREL, A.; POIRIER, A. L.; BERGER, V.; GAMELIN, E.; Tournigand, C.; de Gramont, A. Oxaliplatin-related neurotoxicity: interest of calcium-magnesium infusion and no impact on its efficacy. **J. Clin.**, v. 26 (7), p. 1189 – 1190, 2008.
- GARCIA-LARREA, L; MAGNIN, M. Physiopathologie de la douleur neuropathique: revue des modeles expérimentaux et des mécanismes proposés. **Press. Med.**, v. 37, p. 315-340, 2008.

- GOGAS, K. R.; PRESLEY, R. W.; LEVINE, J. D.; BASBAUM, A. I. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behaviour and c-fos expression. **Neuroscience**, v. 42, p. 617 - 628, 1991.
- GOLDBERG, R. M.; SARGENT, D. J.; MORTON, R. F.; FUCHS, C. S.; RAMANATHAN, R. K.; WILLIAMSON, S. K.; FINDLAY, B. P.; PITOT, H. C.; ALBERTS, S. R. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, p. 23 - 30, 2003.
- GONDIM, D. V.; COSTA, J. L.; ROCHA, S. S.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 2011 (in press).
- GROLLEAU, F.; GAMELIN, L.; BOISDRON-CELLE, M.; LAPIED, B.; PELHATE, M.; GAMELIN, E. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. **J. Neurophysiol.**, v. 85 (5), p. 2293 – 2297, 2001.
- GROTHEY, A.; NIKCEVICH, D. A.; SLOAN, J. A.; KUGLER, J. W.; ALBERTS, S. R.; LOPRINZI, CL. Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. **J. Clin. Oncol.**, v. 29(4), p. 421 - 427, 2011.
- GUO R, WEI P, LIU W. Combined antioxidant effects of rutin and vitamin C in Triton X-100 micelles. **J Pharm Biomed Anal.**, v 43(4), p.1580-6, 2007.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000 – a historical look to the future. **Ann. N.Y. Acad. sci.**, v. 899, p. 136-147, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 11ª Ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2009.

HARBONE, J. B. Nature distribution and function of plant flavonoids. **Prog. Clin. Biol.**, v.213, p. 15-24, 1986.

HARRAP, K. R. **Rev. Cancer Treatment.**, p. 21-33, 1985.

GONDIM, D. V.; COSTA, J. L.; ROCHA, S. S.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 2011 (in press).

HARRIS , J. A. Using c-fos as a neural marker of pain. **Brain. Res. Bull.**, v. 45, p. 1 - 8, 1998.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, v. 32, p. 1141 - 1148, 1983.

HERDEGEN, T.; RÜDIGER, S.; MAYER, B.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M. Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. **Mol. Brain.**, v. 22, p. 245-258, 1994.

HOCHSTER, H. S.; GROTHEY, A.; CHILDS, B. H. Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. **J. Clin. Oncol.** ,v. 25(25), p. 4028 - 4029, 2007.

HURWITZ, H. I. New agents in colon cancer. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.** v.7, p. 404 – 405, 2003.

INCA. **ESTIMATIVA 2012** : incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em: 27 de dezembro de 2011.

ISHIBASHI, K.; OKADA, N.; MIYAZAKI, T.; SANO, M.; ISHIDA, H. Effect of calcium and magnesium on neurotoxicity and blood platinum concentrations in patients receiving mFOLFOX6 therapy: a prospective randomized study. **Int. J. Clin. Oncol.**, v. 15 (1), p. 82-87, 2010.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidativ stress by three distinc mechanisms. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30(4), p. 433 - 446, 2001.

IWAO, K.; TSUKAMOTO, I. Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21WAF1CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy . **Biochim Biophys Acta**, v. 1427(1), p. 112 – 120, 1999.

JAMIESON, S. M.; LIU , J.; CONNOR, B.; MCKEAGE, M. J. Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss. **Cancer Chemother. Pharmacol .**, v. 56(4), p. 391-399, 2005.

Combination of vitamin C and rutin on neuropathy and lung damage of diabetes mellitus rats.

JE, H, D.; SHIN, C. Y.; PARK, S. Y.; YIM , S. H.; KUM, C.; HUH, I. H.; KIM, J. H.; SOHN, U. D. Combination of vitamin C and rutin on neuropathy and lung damage of diabetes mellitus rats. **Arch Pharm Res.**, v. 25(2),p.184-190, 2002.

JOSEPH, E. K.; CHEN, X.; BOGEN, O.; LEVINE ,J. D.; Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. **J. Pain.**, v. 9(5), p. 463 - 472, 2008.

KALEY, T. J.; DEANGELIS, L. M. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Br .J. Haematol.**, v. 145, p. 3 - 14, 2009.

KAWAMATA, M; OMOTE, K. Involvement of increased excitatory aminoacids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. **Pain**, v. 68(1), p. 85 - 96, 1996.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews**, v. 7, p. 573 - 584, 2007.

KIM, S H; CHUNG, J M: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50(3), p. 355 - 363, 1992.

KNIJN, N.; TOL, J.; KOOPMAN, M.; WERTER, M. J.; IMHOLZ, A. L.; VALSTER, F. A.; MOL, L.; VINCENT, A. D.; TEERENSTRA, S.; PUNT, C. J. The effect of prophylactic calcium and magnesium infusions on the incidence of neurotoxicity and clinical outcome of oxaliplatin-based systemic treatment in advanced colorectal cancer patients. **Eur. J. Cancer.**, v. 47(3),p. 369 - 374, 2011.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L.; KRAYCHETE, A. C. Artigo de revisão sobre dor neuropática. **Rev. Bras. Anest.**, v. 8(5), 2000.

KRISHNAN, A. V.; GOLDSTEIN, D.; FRIEDLANDER, M.; KIERNAN, M. C. Oxaliplatin – induced neurotoxicity and the development of neuropathy. **Muscle Nerve**, v. 32, p. 51 – 60, 2005.

KRÓL , W.; CZUBA ,Z. P.; THREADGILL , M. D.; CUNNINGHAM, B. D.; PIETSZ,G. Inhibition of nitric oxide (NO.) production in murine macrophages by flavones. **Biochem. Pharmacol.**,v. 50 (7), p.1031 - 1035, 1995.

KUHLMANN, M. K.; HORSCH, E.; BURKHARDT, G.; WAGNER, M.; KÖHLER , H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. **Arch Toxicol**, v. 72, p.536 - 540, 1998.

KUMAR, A.; SINGH, R. L.; BABU, G. N. Cell death mechanisms in the early stages of acute glutamate neurotoxicity. **Neurosci. Res.**, V. 66 (3), p. 271 - 278, 2010.

LAI, B.; ZHANG, L.; DONG, L. Y.; ZHU, Y. H.; SUN, F.Y.; ZHENG, P. Inhibition of Qi site of mitochondrial complex III with antimycin A decreases persistent and

transient sodium currents via reactive oxygen species and protein kinase C in rat hippocampal CA1 cells. **Exp. Neurol.** v.194, p. 484-494, 2005.

LAND, S. R.; KOPEC, J. A.; CECCHINI, R. S.; GANZ, P. A.; WIEAND, H. S.; COLANGELO, L. H.; MURPHY, K.; KUEBLER, J. P.; SEAY, T. E.; NEEDLES, B. M.; BEARDEN, J. D.; COLMAN, L. K.; LANIER, K. S.; PAJON, E. R. J. R.; CELLA, D.; SMITH, R. E.; O'CONNELL, M. J.; COSTANTINO, J. P.; WOLMARK, N. Neurotoxicity from oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: NSABP C-07. **J Clin Oncol.**, v. 25(16), p. 2205 - 2211, 2007.

LANORE, D; DELPRAT, C. Quimioterapia anticancerígena. **Roca**, cap.4, p. 53-78, 2004.

LAROCCA, L. M., RANELLETTI, F. O.; MAGGIANO, N.; RUTELLA, S.; LA BARBERA, E. O.; RUMI, C.; SERRA, F.; VOSO, M. T.; PIANTELLI, M., TEOFILI, L.; LEONE, G. Differential sensitivity of leukemic and normal hematopoietic progenitors to the killing effect of hyperthermia and quercetin used in combination: role of heat-shock protein-70. **Int J Cancer.** v. 73(1), p.75-83, 1997.

LEBWOLHL, D.; CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. **European Journal of Cancer**, v. 34 (10), p. 1522-1534, 1998.

LEVI, F; METZGER, G; MASSARI, C; MILANO, G. Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. **Clin. Pharmacok.**, v. 38(1), p. 1-21, 2000.

LIN, P. C.; LEE, M. Y.; WANG, W. S.; YEN, C. C.; CHAO, T. C.; HSIAO, L. T.; YANG, M. H.; CHEN, P. M.; LIN, K. P.; CHIOU, T. J. N-acetylcysteine has neuroprotective effects against oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: preliminary data. **Support Care Cancer.**, v.14(5), p. 484 – 487, 2006.

LING, B.; AUTHIER, N.; BALAYSSAC, D. A.; COUDORE, F. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. **Pain** v. 128(3), p. 225 - 234, 2007a.

- LING B, COUDORÉ-CIVIALE MA, BALAYSSAC D, ESCHALIER A, COUDORÉ F, AUTHIER N. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. **Toxicology** v.234(3):176- 184, 2007b.
- LINO, J. A.; C. A. V. G. LEITE.; R. B. PONTES.; F. E. ROLIM.; G. A. C. BRITO.; CUNHA, T. M.; VALE, M. L.; RIBEIRO, R. A. Neuroprotective effect of amifostine upon oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice. **Inflamm. Res.** v. 60 (Suppl 1), S 206, 2011.
- LOGGIA, D. R.; TUBARO, A.; ORI ,P.; ZILLI , C.; NEGRO, D. P. Plant flavonoids in biology and medicine. **Prog. in Clin. and Biol. Res.**, v. 213, p. 481-489, 1986.
- LU, P.; FAN, Q. X.; WANG, L. X.; WANG, X.; ZONG, H.; WANG, R. L. Prophylactic effect of amifostine on oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with digestive tract tumors. **Ai Zheng.** v. 27 (10), p. 1117-1120, 2008.
- MACHOVER , D.; DIAZ-RUBIO , E.; DE GRAMONT, A.; SCHILF, A.; GASTIABURU, J. J.; BRIENZA, S.; ITZHAKI, M.; METZGER, G.; N'DAW, D.; VIGNOUD, J.; ABAD, A.; FRANCOIS, E.; GAMELIN , E.; MARTY, M.; SASTRE, J.; SEITZ, J. F.; YCHOU , M. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. **Ann. Oncol.**, v. 7(1), p. 95 – 98, 1996.
- MANDEL, S. A.; AMIT, T.; KALFON, L.; REZNICHENKO, L.; YODIM, M. B. Targeting multiple neurodegenerative diseases etiologies with multimodal-acting green tea catechins. **J. Nutr.**, v. 138, p. 1578 – 1583, 2008.
- MARSHALL, J. **The clinical use of oxaliplatin:** case studies and roundtable discussion. New York: Oncology, 2004.
- MCWHINNEY, S. R.; GOLDBERG, R. M.; MCLEOD, H. L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Mol. Cancer Ther.**, v.8 (1), p.10-16, 2009.

- MERSKEY, H; BOGDUK, N. IASP taxonomy – Part III of classification of chronic pain. **IASP Force on Taxonomy**, 2nd edition, Seattle, IASP Press, 1994.
- MIDDLETON, E. JR. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv. Exp .Med. Biol.**, v. 439, p.175-182, 1998.
- MIHARA ,M.; UCHIYAMA ,M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.**, v. 86: 27S278, 1978.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: in integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57(1), p. 1-164, 1999.
- MITCHELL, P. L.; GOLDSTEIN, D.; MICHAEL, M.; BEALE, P.; FRIEDLANDER, M.; ZALCBERG, J.; WHITE, S.; THOMSON, J. A.; CLARKE S. Addition of gabapentin to a modified FOLFOX regimen does not reduce oxaliplatin-induced neurotoxicity. **Clin. Colorectal Cancer**, v.6 (2), p. 146 - 151, 2006.
- MORAND, C.; MANACH ,C.; CRESPIY , V.; REMESY, C. Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat mode. **Biofactors**, v. 12, p.169-174, 2000.
- MORGAN, M. M.; GOGAS K. R.; BASBAUM, A. I. Diffuse noxious inhibitory controls reduce the expression of noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the superficial and deep laminae of the rat spinal cord. **Pain**, v. 56, p. 347-352, 1994.
- MOTA, K.S.; DIAS, G. E.; PINTO, M. E.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A. R.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v.14(3), p. 979-1012, 2009.
- MUGNAINI, E.; BERREBI, A. S.; MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Fos-Like Immunoreactivity Induced by Seizure in Mice Is Specifically Associated With Euchromatin in Neurons. **Eur J Neurosci**. v.1(1), p. 46-52, 1989.
- NASSINI, R.; GEES, M.; HARRISON, S.; DE SIENA, G.; MATERAZZI, S.; MORETTO, N.; FAILLI, P.; PRETI, D.; MARCHETTI, N.; CAVAZZINI, A.; MANCINI, F.; PEDRETTI, P.; NILIUS, B.; PATACCHINI, R.; GEPPETTI, P.

- Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. **Pain**, v.152 (7), p. 1621-1631, 2011.
- NECKER, R.; HELLON, R. F. Noxious thermal input from the rat tail: modulation by descending inhibitory influences. **Pain**, v. 4, p. 231-242, 1978.
- OLIVEIRA, L. M.; SILVA, L. F. S. Mecanismos neurais e a modulação da dor. In: ALVES NETO, O. et al. **Dor: Princípios e Prática**. São Paulo, Artmed, 2009.
- PAICE, J. A. Clinical challenges: chemotherapy - induced peripheral neuropathy. **Seminars in Oncol. Nurs.**, v. 25(2), p. 8-19, 2009.
- PARK, S. B.; GOLDSTEIN, D.; LIN, C. S-Y.; KRISHNAN, A. V.; FRIEDLANDER, M. L.; KIERNAN, M. C. Neuroprotection for Oxaliplatin-induced neurotoxicity: What happened to Objective Assessment ?. **JCO**, v. 29(18), p. 553-554, 2011.
- PARK, S. B.; GOLDSTEIN, D.; LIN, C. S.; KRISHNAN, A. V.; FRIEDLANDER, M. L.; KIERNAN, M. C. Acute abnormalities of sensory nerve function associated with oxaliplatin-induced neurotoxicity. **J Clin Oncol**, v. 27(8), p. 1243 – 1249, 2009.
- PARK, S. B.; LIN, C. S.; KRISHNAN, A. V. Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility. **Oncologist**, 2011b.
- PELTIER, A. C.; RUSSEL, J. W. Recent advances in drug-induced neuropathies. **Curr Opin Neurol**, v. 15(5), p. 633 - 638, 2002.
- PETIT, T.; BENIDER, A.; YOVINE, A.; BOUGNOUX, P.; SPAETH, D.; MAINDRAULT-GOEBEL, F.; SERIN, D.; TIGAUD, J. D.; EYMARD, J. C.; SIMON, H.; BERTAUX, B.; BRIENZA, S.; CVITKOVIC, E. Phase II study of na oxaliplatin vinorelbine combination in patients with anthracycline-and taxane-pré-treated metastatic breast cancer. **Anticancer Drugs**, v. 17(3), p. 337-343, 2006.
- PIETRANGELI, A.; LEANDRI, M.; TERZOLI, E.; JANDOLO, B.; GARUFI, C. Persistence of high-dose oxaliplatin-induced neuropathy at long-term follow-up. **Eur Neurol**, v. 56 (1), p.13-16, 2006.

- PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **J Nat Prod**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PODRATZ, J. L.; KNIGHT, A. M.; TA, L. E.; STAFF, N. P.; GASS, J. M.; GENELIN, K.; SCHLATTAU, A.; LATHROUM, L.; WINDEBANK, A. J. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. **Neurobiol. Dis.**, v. 41, p. 661 - 668, 2011.
- PONTES, R. B. **Desenvolvimento de modelo experimental de neuropatia sensitiva periférica induzida pelo agente antineoplásico oxaliplatina em camundongos.** 2009.139 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2009.
- PRESLEY, R. W.; MENÉTREY, D.; LEVINE, J. D.; BASBAUM, A. I. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. **J. Neurosci.** v. 10(1), p. 322-335, 1990.
- RAO, R. D.; FLYNN, P. J.; SLOAN, J. A.; WONG, G. Y.; NOVOTNY, P.; JOHNSON, D. B.; GROSS, H. M.; RENNO, S. I.; NASHAWATY, M.; LOPRINZI, C. L. Efficacy of lamotrigine in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial, N01C3. **Cancer.**, v. 112 (12), p. 2802 - 2808, 2008.
- RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 797– 807, 2001.
- RICE-EVANS, C. A, MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free. Radic. Res.**, v. 22 (4), p. 375-383, 1995.
- ROLKE, R.; BARON, R.; MAIER, C.; TÖLLE, T. R.; TREEDE, R. D.; BEYER, A.; BINDER, A.; BIRBAUMER, N.; BIRKLEIN, F.; BÖTEFÜR, I. C.; BRAUNE, S.; FLOR, H.; HUGE, V.; KLUG, R.; LANDWEHRMEYER, G. B.; MAGERL, W.; MAIHÖFNER, C.; ROLKO, C.; SCHAUB, C.; SCHERENS, A.; SPRENGER, T.; VALET, M.; WASSERKA, B. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. **Pain**, v. 123 (3), p. 231 -43, 2006.

- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in Escherichia Coli by electrolysis products from platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 689 - 698, 1965.
- RUSSO, M.; SPAGNUOLO, C.; TEDESCO, I.; BILOTTO, S.; RUSSO, G.L. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. **Biochem. Pharmacol.**, v.83(1), p. 6-15, 2011.
- SANDERS, R. A.; RAUSCHER, F. M.; WATKINS III, J. B.; Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozocin-induced diabetic rats. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 15 (3), p. 143-149, 2001.
- SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P.; WILLIAMS, R. J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p. 861– 880, 2002.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem**, v. 25, p. 192-195, 1968.
- SELTZER, Z; DUBNER, R; SHIR, Y. A novel behavioral modelo of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43(2), p. 205-218, 1990.
- SINGH, A.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S. K. Reersal of aging and chronic ethanol-induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. **Free Radic. Res.** v. 37 (11), p. 1245-1252, 2003.
- SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C.; WILLIAMS, R. J. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. **J Biol Chem.**, v. 278(37), p. 34783 – 34793, 2003.
- STILLMAN, M.; CATA, J. P. Management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Curr. Pain Headache Rep.**, v. 10, p. 279-287, 2006.
- SZABO, S.; NAGY, L; PLEBANI, M. Glutathione protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clin. Chim. Acta**, v. 206, p. 95-105, 1992.

- TALL, J. M.; RAJA, S. N. Dietary constituents as novel therapies for pain. **Clin J Pain**, v. 20, p. 19-26, 2004.
- TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor. In: ALVES NETO, O. et al. **Dor: princípios e prática**. São Paulo, Artmed, 2009.
- TOURNIGAND, C.; CERVANTES, A.; FIGER, A.; LLEDO, G.; FLESCHE, M.; BUYSE, M.; MINEUR, L.; CAROLA, E.; ETIENNE, PL.; RIVERA, F.; CHIRIVELLA, I.; PEREZ-STAU, N.; LOUVET, C.; ANDRÉ, T.; TABAH-FISCH, I.; DE GRAMONT, A. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-go fashion in advanced colorectal cancer--a GERCOR study. **J. Clin. Oncol.**, v. 24 (3), p. 394-400, 2006.
- VAFEIADOU, K., VAUZOUR, D., RODRIGUEZ-MATEOS, A., WHITEMAN, M., WILLIAMS R.J., SPENCER, J. P. Glial metabolism of quercetin reduces its neurotoxic potential. **Arch Biochem Biophys.**, v. 478(2), p.195-200, 2008.
- VAJDA, F. J. Neuroprotection and neurodegenerative disease. **J. Clin. Neurosci.**, 9: 4-8, 2002.
- VAN CUTSEM, E.; VERSLYPE, C.; DEMEDTS, I. The treatment of advanced colorectal cancer: where are we now and where do we go? **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2002, v. 16(2),p. 319-330, 2002.
- VON DELIUS, S.; ECKEL, F.; WAGENPFEIL, S.; MAYR, M.; STOCK, K.; KULLMANN, F.; OBERMEIER, F.; ERDMANN, J.; SCHMELZ, R.; QUASTHOFF, S.; ADELSBERGER, H.; BREDEKAMP, R.; SCHMID, R. M.; LERSCH, C. Carbamazepine for prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with advanced colorectal cancer: final results of a randomised, controlled, multicenter phase II study. **Invest New Drugs**. v. 25(2), p.173 - 180, 2007.
- WANG, W. S.; LIN, J. K.; LIN, T. C.; CHEN, W. S.; JIANG, J. K.; WANG, H. S.; CHIOU, T. J.; LIU, J. H.; YEN, C. C.; CHEN, P. M. Oral glutamine is effective for preventing oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer patients. **Oncologist**, v. 12 (3), p. 312-9, 2007.

WEI, Y. Q.; ZHAO, X.; KARIYA, Y.; FUKATA, H.; TESHIGAWARA, K.; UCHIDA, A. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. **Cancer Res**, v. 54 (18), p. 4952 - 4957, 1994.

WEICKHARDT, A.; WELLS, K.; MESSERSMITH, W. Oxaliplatin-Induced Neuropathy in Colorectal Cancer. **J. Oncol.**, 201593. Published online 2011 December 12.

WINDEBANK, A. J. GRISOLD W. Chemotherapy-induced neuropathy. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, v. 13 ,p. 27–46, 2008.

WOOD, J. N. Recent advances in understanding molecular mechanisms of

XIAO, W. H.; ZHENG, H.; BENNETT, G. J.; Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison to the neuropathy induced by paclitaxel. **Neuroscience**, v. 20, 2011.

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