



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

**NEUROPATIA AUTONÔMICA INDUZIDA POR
CISPLATINA E VINCRISTINA EM RATOS:
ESTUDO FUNCIONAL, ELETROFISIOLÓGICO E
MORFOLÓGICO**

Fortaleza

2011

KÁTIA VIRGINIA VIANA CARDOSO

**NEUROPATIA AUTONÔMICA INDUZIDA POR
CISPLATINA E VINCRISTINA EM RATOS:
ESTUDO FUNCIONAL, ELETROFISIOLÓGICO E
MORFOLÓGICO**

Tese apresentada à pós-graduação em Ciências Médicas da UFC para obtenção do grau de doutor em Ciências Médicas sob a orientação do Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos.

Fortaleza

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C268n Cardoso, Kátia Virgínia Viana.
Neuropatia autonômica induzida por cisplatina e vincristina em ratos: estudo funcional, eletrofisiológico e morfológico / Kátia Virgínia Viana Cardoso. – 2011.
202 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Medicina I.
Orientação: Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos.
1. Barorreflexo. 2. Esvaziamento Gástrico. 3. Vincristina. I. Título.

CDD 616.8

KÁTIA VIRGINIA VIANA CARDOSO

NEUROPATIA AUTONÔMICA INDUZIDA POR CISPLATINA E VINCRISTINA EM RATOS: ESTUDO FUNCIONAL, ELETROFISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em 07 de outubro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Márcio Flávio de Dutra Moraes
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profª. Dra. Ana Maria Blanco Martinez
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Profª. Dra. Raimunda Hermelinda Maia Macena
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Dedicatória

A Deus por ser fonte de força nos momentos difíceis. A minha filha, Laís minha maior realização, alegria e prazer em viver. Aos meus pais, Vauíres e Albaniza, pela dedicação, exemplo, carinho e compreensão. As minhas irmãs Anna e Virginia e meus queridos sobrinhos pelo incentivo e carinho de sempre.

Agradecimentos

A **DEUS**, pelo dom da vida, pela conforto e força nos momentos difíceis e pela esperança nos meus sonhos.

A **minha filha Laís**, fonte de realização, muita alegria e amor.

Aos **meus pais, Vauíres e Albaniza**, exemplos de amor e dedicação incondicionais.

Aos professores **Armênio Aguiar dos Santos e Francisco de Assis Aquino Gondim**, pela sua atenção e amizade.

Aos meus amigos **Palheta Júnior, Moisés Tolentino, Arnaldo Peixoto e Danielle Macêdo** pelo apoio incondicional.

Aos **estudantes de iniciação científica** do laboratório de Neurofisiopatologia e Terapêutica Neurológica, do laboratório Luís Capelo e da Faculdade Integrada do Ceará que ajudaram na realização desse trabalho.

Aos **funcionários técnicos administrativos** da Universidade Federal do Ceará e da Faculdade Integrada do Ceará pelas preciosas contribuições.

A professora **Ana Maria Blanco Martinez**, pela prestimosa contribuição para esta pesquisa.

Aos **professores desta Universidade** que contribuíram direta ou indiretamente para esta pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, pelo acolhimento e pela dedicação na formação científica de seus pós-graduandos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Introdução: Quimioterápicos são compostos químicos utilizados para o tratamento de câncer. A eficácia destes compostos é limitada pelos efeitos colaterais como nefro, neuro, hepato e ototoxicidade. Cisplatina e vincristina são quimioterápicos de uso limitado que causam neuropatia periférica com alterações autonômicas, sensitivas e/ou motoras. **Objetivos:** Avaliar os efeitos do tratamento com cisplatina e vincristina no esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos, na função barorreflexa, nas latências térmica e mecânica, nos parâmetros eletrofisiológicos de neurônios simpáticos e na morfologia de tecidos nervosos e musculares em ratos. **Métodos:** Sulfato de vincristina, cisplatina ou salina foram injetados na veia da cauda. Cisplatina foi administrada nas doses de 0,5 mg/kg (5 doses), 1 mg/kg (2-5 doses) ou 2 mg/kg (1, 2 ou 5 doses) diariamente e vincristina administrada nas doses de 50 µg/kg (5 doses), 100µg/kg (2-5 doses) ou 150 µg/kg (1, 2 ou 5 doses) em dias alternados, ambas as drogas administradas em ratos Wistar machos (200-250g). No dia seguinte, eles receberam gavagem com uma refeição teste (0,5 mg/ml de vermelho fenol em 5% de solução de glucose) e foram sacrificados após 10 minutos. A recuperação do vermelho fenol no estômago e intestino foi determinada por espectofotometria. Valores de pico da pressão arterial média basal (PAM) e frequência cardíaca (FC) após fenilefrina 5 mg/kg e atropina 0,5 mg/kg i.v. foram utilizados para avaliar as respostas barorreflexas. Animais foram submetidos ao teste da placa quente para avaliar alterações no limiar de dor induzido por calor e para a avaliação do limiar mecânico e alodinia, um estesiômetro dinâmico plantar baseado no princípio dos filamentos de Von Frey foi utilizado. Diferenças foram avaliadas com teste t ou One-Way ANOVA com $P < 0,05$. **Resultados:** Cisplatina aumentou a retenção gástrica de líquidos com doses ≥ 2 mg/kg de 60-70% e este retarde do esvaziamento gástrico não permaneceu após duas semanas de interrupção do tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina. Vincristina aumentou a retenção gástrica de líquidos com doses ≥ 250 µg/kg de 54,5-69,3% e este retarde do esvaziamento gástrico não permaneceu após uma semana de interrupção do tratamento com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina. Cisplatina também aumentou o ganho do barorreflexo possivelmente pelo aumento da atividade simpática. Bradicardia induzida por fenilefrina foi aumentada sugerindo disfunção simpática e após a infusão de atropina (0,5 mg/kg) as alterações da frequência cardíaca relacionadas a infusão desta droga foram mais proeminentes nos ratos tratados com cisplatina que no grupo controle. Cisplatina também alterou a excitabilidade de neurônios do gânglio cervical superior e a morfologia de gânglios autonômicos, somáticos e do nervo vago em ratos. Vincristina reforçou a redução da FC induzida pela fenilefrina e atropina. **Conclusão:** Nossos resultados demonstraram que cisplatina e vincristina induzem neuropatia autonômica com retarde do esvaziamento gástrico, alteração das respostas barorreflexas e aumento do peso colônico. Cisplatina alterou a latência mecânica, mas não a térmica e a neuropatia autonômica precedeu estas alterações. Em ratos tratados com vincristina neuropatia sensitiva precedeu as disfunções autonômicas.

Palavras chaves: neuropatia autonômica; barorreflexo; cisplatina; esvaziamento gástrico, vincristina; ratos.

Abstract

Introduction: Chemotherapeutic agents are chemical compounds used for the treatment of cancer. The efficacy of chemotherapy is limited by its side effects such as nephro, neuro, hepato and ototoxicity. Cisplatin and vincristine are chemotherapy drugs and their use is limited by peripheral neuropathy with autonomic, sensory and/or motor involvement. **Aims:** We evaluated the effect of cisplatin and vincristine on the gastric emptying (GE), gastrointestinal (GI) transit of liquid, baroreflex function, thermal and mechanical withdrawal latencies, electrophysiological parameters of sympathetic neurons and morphology of nerve and muscle tissues in rats. **Methods:** Vincristine sulphate, cisplatin or saline were injected into the tail vein. Cisplatin was administered at doses of 0.5 mg/Kg (5 doses), 1 mg/kg (2-5 doses) or 2 mg/kg (1, 2 or 5 doses) daily and vincristine was administered at the doses of 50 µg/kg (5 doses), 100µg/kg (2-5 doses) or 150 µg/kg (1, 2 or 5 doses) every other day, both drugs administered in male Wistar rats (200-250g). Next day, they were gavage-fed with a test meal (0.5 mg/ml of phenol red in 5% glucose solution) and were sacrificed 10 minutes later. The recovery of phenol red in the stomach and intestine was determined by spectrophotometry. Peak values of basal mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) after i.v. phenylephrine 5 mg/kg and atropine 0.5 mg/kg were used to evaluate the baroreflex responses. Animals were subjected to hot plate testing to evaluate changes in the thermal pain threshold and for the assessment of mechanical threshold and allodynia, a dynamic plantar aesthesiometer based on the von Frey filament principle was used. Differences were evaluated by One-Way ANOVA with $P < 0.05$. **Results:** Cisplatin increased the GE of liquid with doses ≥ 2 mg/Kg by 59.7-77.4% and this GE delay was not present two weeks after the treatment with 5 doses of cisplatin at 1 mg/kg. Vincristine increased the GE of liquid with doses ≥ 250 µg/kg by 54.5 – 69.3% and this GE delay was not present one week after the treatment with 5 doses of vincristine at 150 µg/kg. Cisplatin also enhanced baroreflex gain possibly by increasing sympathetic activity. Phenylephrine-induced bradycardia was enhanced suggesting sympathetic dysfunction and after infusion of atropine (0.5 mg/kg) heart rate changes related this drug infusion were still more prominent in cisplatin-treated rats than controls. Cisplatin changed the excitability of sympathetic neurons of the superior cervical ganglion and the morphology of autonomic and somatic ganglia and the vagus nerve in rats. Vincristine enhanced the HR reduction induced by phenylephrine and atropine ($P < 0.05$). **Conclusion:** Our results demonstrated that cisplatin and vincristine induced autonomic neuropathy courses with delayed GE, altered baroreflex responses and increased colonic weight. Cisplatin altered mechanical threshold but not thermal, and autonomic neuropathy preceded this changes, in rats treated with vincristine sensory neuropathy preceded and outlasted the autonomic changes.

Key words: autonomic neuropathy; baroreflex; cisplatin; gastric emptying; rats; vincristine.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fórmula estrutural da cisplatina..... | 27 |
| Figura 2. Sítios de lesão do sistema nervoso periférico de animais tratados com cisplatina ou vincristina..... | 28 |
| Figura 3. Fórmula estrutural do sulfato de vincristina..... | 38 |
| Figura 4. Esquema de dosagem para a administração dos quimioterápicos com a finalidade de estudar o efeito destas drogas sobre a retenção gástrica, trânsito intestinal de líquidos, peso colônico..... | 49 |
| Figura 5. Esquema de dosagem para a administração dos quimioterápicos com a finalidade de estudar o efeito residual sobre o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos, peso colônico..... | 49 |
| Figura 6. Etapas do estudo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos pela modificação da técnica descrita por Reynell, Spray 1956..... | 52 |
| Figura 7. Estudo das respostas barorreflexas através da mensuração dos níveis de pressão arterial média (PAM, mmHg) registrados por transdutores de pressão (P1000B) e frequência cardíaca (FC, bpm) por eletrodos subcutâneos acoplados ao sistema de aquisição digital (PowerLab; AD Instruments, Austrália)..... | 58 |
| Figura 8. Protocolos para o estudo das respostas barorreflexas utilizando um sistema de aquisição digital (PowerLab; AD Instruments, Austrália)..... | 59 |
| Figura 9. Protocolo de indução da colite (Latella <i>et al</i> , 2008)..... | 63 |

| | |
|--|-----|
| Figura 10. Montagem do aparato experimental necessário para o registro dos parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios do gânglio cervical superior..... | 67 |
| Figura 11. Protocolos experimentais para estudar os parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios do gânglio cervical superior..... | 69 |
| Figura 12. Parâmetros eletrofisiológicos avaliados no potencial de ação dos neurônios do gânglio cervical superior..... | 71 |
| Figura 13. Mensurações morfométricas do nervo isquiático de rato utilizando o software Image Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Carlsbad, CA, EUA..... | 75 |
| Figura 14. Efeito do tratamento crônico com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica de vermelho fenol..... | 85 |
| Figura 15. Efeito do tratamento crônico com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina e 5 doses de 150 µg/kg de vincristina intravenosa sobre os cólons de ratos acordados..... | 89 |
| Figura 16. Parâmetros associados à toxicidade em ratos acordados tratados com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina intravenosa..... | 104 |
| Figura 17. Parâmetros associados à toxicidade em ratos acordados tratados com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina intravenosa..... | 109 |
| Figura 18. Avaliação Microscópica – Secções longitudinais de lesões do segmento coloretal induzido pela administração transretal de ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS) e óleo de mostarda dissolvido em etanol em ratos previamente tratados com quatro doses de 150 µg/kg vincristina i.v..... | 142 |
| Figura 19. Potenciais de ação (PA) dos neurônios simpáticos do gânglio cervical superior em ratos tratados ou não com 5 mg/kg de cisplatina i.v. por meio de fixação do potencial transmembrana..... | 147 |

Figura 20. Análise morfológica de amostras de gânglios somáticos e autonômicos de ratos tratados ou não com 10 mg/kg de cisplatina i.v., através de cortes ultrafinos transversais (60-70 nm) e coloração com citrato de chumbo, contrastada em acetato de uranila para análise de microscopia eletrônica de transmissão. Barra de 20 µm.....150

Figura 21. Análise qualitativa de amostra de nervo isquiático de rato, através de cortes semifinos transversais (500 nm) e coloração com azul de toluidina para análise de microscopia óptica.....151

Figura 22. Análise qualitativa de amostra de nervo vago de rato, através de cortes semifinos transversais (500 nm) e coloração com azul de toluidina para análise de microscopia óptica.....153

Figura 23. Análise qualitativa de amostras de tecido muscular do estômago, intestinos delgado e grosso de rato, fixadas por formol a 10% tamponado e em parafina, cortadas a 4 mm de espessura e tingidas com hematoxilina-eosina para análise de microscopia óptica.....154

Lista de Tabelas

Tabela 1. Volume plasmático e volume sanguíneo total após administração intravenosa de 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina em dias consecutivos, de 5 doses de 150 µg/kg de vincristina em dias alternados ou de salina (controle) em ratos.....132

Tabela 2. Lesões colônicas macroscópicas e microscópicas e peso colônico em dois modelos de colite em ratos tratados ou não com vincristina (4 doses de 150 µg/kg).....141

Tabela 3. Efeitos do potencial transmembrana para restaurar artificialmente o controle do potencial de repouso (via injeção de corrente intracelular) em ratos tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg na resistência de entrada, limiar de excitabilidade, amplitude, duração, inclinação máxima da voltagem em relação ao tempo ($dv/dt_{\text{máx}}$) do ramo ascendente e descendente do potencial de ação e amplitude e duração da hiperpolarização pós-potencial.....146

Lista de Gráficos

- Gráfico 1.** Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 0,5 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos.....80
- Gráfico 2.** Efeito do tratamento crônico intravenoso com 2, 3 e 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica em ratos acordados.....81
- Gráfico 3.** Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados.....82
- Gráfico 4.** Efeito do tratamento crônico intravenoso com 1, 2 e 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica em ratos acordados.....83
- Gráfico 5.** Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados.....84
- Gráfico 6.** Efeito dose-dependente do tratamento com cisplatina na retenção gástrica de líquidos.....86
- Gráfico 7.** Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o peso dos cólons em ratos acordados e sacrificados um dia, uma e duas semanas após o tratamento.....87
- Gráfico 8.** Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 0,5 mg/kg; 2, 3 e 5 doses de 1 mg/kg e 1, 2 e 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre o peso dos cólons.....88

| | |
|---|-----|
| Gráfico 9. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 50 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos..... | 93 |
| Gráfico 10. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 2, 3, 4 e 5 doses de 100 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica em ratos acordados..... | 94 |
| Gráfico 11. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 100 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados..... | 95 |
| Gráfico 12. Efeito do tratamento crônico intravenosos com 1, 2 e 5 doses de 150 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica em ratos acordados..... | 96 |
| Gráfico 13. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados..... | 97 |
| Gráfico 14. Efeito dose-dependente do tratamento com vincristina na retenção gástrica de líquidos..... | 98 |
| Gráfico 15. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica e o peso dos cólons em ratos acordados e sacrificados um dia, uma e duas semanas após o tratamento..... | 99 |
| Gráfico 16. Efeito do tratamento crônico com 5 doses de 50 µg/kg; 2, 3, 4 e 5 doses de 100 µg/kg e 2 e 5 doses de 150 µg/kg de vincristina intravenosa sobre o peso dos cólons..... | 100 |
| Gráfico 17. Peso corporal em ratos avaliados 24 h após a 1 ^a , 3 ^a e 5 ^a dose de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg e 2 mg/kg de cisplatina ou salina intravenosa em ratos acordados..... | 102 |

| | |
|---|-----|
| Gráfico 18. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre o peso corporal em ratos acordados um dia, uma e duas semanas após a última dose..... | 103 |
| Gráfico 19. Peso corporal em ratos avaliados 24 h após a 1 ^a , 3 ^a e 5 ^a dose de 50 µg/kg, 100 µg/kg e 150 µg/kg de vincristina ou salina intravenosa em ratos acordados..... | 107 |
| Gráfico 20. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina sobre o peso corporal em ratos acordados um dia, uma e duas semanas após a última dose..... | 108 |
| Gráfico 21. Efeito da depleção da função do sistema nervoso simpático com guanetidina sobre a retenção gástrica e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados, tratados com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina ou solução salina intravenosa em dias consecutivos..... | 111 |
| Gráfico 22. Efeito da depleção da função do sistema nervoso simpático com guanetidina sobre a retenção gástrica e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados, tratados com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina ou solução salina intravenosa em dias alternados..... | 112 |
| Gráfico 23. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina..... | 115 |
| Gráfico 24. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina..... | 116 |
| Gráfico 25. Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a da pressão arterial) após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina..... | 117 |

| | |
|--|-----|
| Gráfico 26. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina..... | 120 |
| Gráfico 27. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina..... | 121 |
| Gráfico 28. Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a da pressão arterial) após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina..... | 122 |
| Gráfico 29. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina..... | 125 |
| Gráfico 30. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina..... | 126 |
| Gráfico 31. Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a da pressão arterial) após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina..... | 127 |
| Gráfico 32. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina..... | 129 |
| Gráfico 33. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| Gráfico 34. Tempo de latência térmica avaliada 24 h após 5ª dose de 1 mg/kg e 2 mg/kg de cisplatina intravenosa em ratos acordados..... | 135 |
| Gráfico 35. Latência da retirada da pata avaliada 1 dia e 1 semana após 5ª dose de 2 mg/kg de cisplatina intravenosa nas patas D e E em ratos acordados..... | 136 |
| Gráfico 36. Tempo de latência térmica avaliada 24 h após 5ª dose de 100 µg/kg e 150 µg/kg de vincristina intravenosa em ratos acordados..... | 138 |
| Gráfico 37. Efeito de 4 doses de 150 µg/kg de vincristina na latência térmica de ratos com colite induzida por administração de ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS) dissolvida em etanol..... | 140 |
| Gráfico 38. Efeito de 4 doses de 150 µg/kg de vincristina na latência térmica de ratos com colite induzida por administração de óleo de mostarda..... | 144 |
| Gráfico 39. Morfometria de amostras do nervo isquiático de ratos tratados ou não com 5 mg/kg de cisplatina i.v..... | 152 |

Lista de siglas e abreviaturas

α - alfa

A/D – analógico digital

ANOVA RM - análise de variância com mensurações repetidas

AOI – área de interesse

asc – ascendente

ATP - trifosfato de adenosina

b.p.m. – batimentos por minuto

β - beta

$^{\circ}\text{C}$ – grau centígrado

Ca^{2+} - íon cálcio

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ – concentração de íon cálcio intracelular

CaCl_2 – cloreto de cálcio

C_i – concentração do corante Azul de Evans injetado

CIS – cisplatina

Cl^- - íon cloreto

cm - centímetro

C_p - concentração plasmática do corante de Azul de Evans injetado

Δ - delta

D – direta

DCC - discontinuous current clamp

desc – descendente

DII – doença inflamatória intestinal

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO - densidade óptica

dt – derivada do tempo

dV – derivada da voltagem

E – esquerda

EG - esvaziamento gástrico

E_m – potencial de repouso

e.p.m. – erro padrão da média
et al. - et alii (outros)
FC - frequência cardíaca
 γ – gama
g - grama
GCS - gânglio cervical superior
GM – gânglio mesentérico
GMPc – guanosina monofosfato cíclico
GRD – gânglio da raiz dorsal
GT - gânglio trigeminal
h - hora
 H^+ - íon hidrogênio
HE – hematoxilina eosina
Hct - hematócrito venoso total
5-HT - 5-hidroxitriptamina ou serotonina
i – corrente
i.p. – intraperitoneal
i.v. – intravenoso
 K^+ - íon potássio
KCl – cloreto de potássio
kg – kilograma
kHz - kilohertz
 \pm - mais ou menos
MAPs – proteínas associadas ao microtúbulo
> - maior
máx – máxima
M Ω - megohm
< - menor
m – metro
mg – miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
MI – matrizes intramusculares
min - minuto

ml – mililitro
mm – milímetro
mM - milimolar
mmHg – milímetro de mercúrio
MΩ - megaohm
ms – milisegundos
mV - milivoltes
μg - micrograma
μl – microlitros
μm – micrometro
N – normal
N - número
Na⁺ - íon sódio
NaCl – cloreto de sódio
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄ – fosfato mossódico
NaOH- hidróxido de sódio
NH₃ - amônia
nm – nanômetro
OM – óleo de mostarda
ON – óxido nítrico
pA – pico ampere
PA – potencial de ação
PAM - pressão arterial média
PB – concentração plasmática do corante de Azul de Evans
PE – polietileno
pH - potencial hidrogeniônico
PPH – potencial pós-hiperpolarização
Pt - platinum
% - porcentagem
R – resistência
Ri – resistência de entrada

rpm – rotação por minuto
R-R – intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma
s – segundos
SNE – sistema nervoso entérico
TGI - trânsito gastrointestinal
TLI - terminações laminares intraganglionares
TNBS – ácido 2,4,6 - trinitro benzeno sulfônico
TRPA – receptor de potencial **transiente canal iônico**
TRPM - receptor de potencial **transiente melastatin**
TRPV – receptor de potencial **transiente vanilóide**
U – unidade
UV – ultravioleta
V – voltagem
Vi - volume do corante Azul de Evans injetado
 V_m – diferença de voltagem de membrana
VP - volume plasmático
vs – versus
VST - volume sanguíneo total

Índice

| | |
|---|----|
| Introdução | 25 |
| 1. Neuropatias induzidas por quimioterápicos | 25 |
| 2. Cisplatina | 26 |
| 2.1. Neurotoxicidade induzida por cisplatina..... | 27 |
| 2.1.1. Neuropatia induzida por cisplatina em humanos..... | 30 |
| 2.1.2. Neuropatia induzida por cisplatina em roedores..... | 33 |
| 3. Vincristina | 36 |
| 3.1. Neurotoxicidade induzida por vincristina..... | 37 |
| 3.1.1. Neuropatia induzida por vincristina em humanos..... | 41 |
| 3.1.2. Neuropatia induzida por vincristina em roedores..... | 43 |
| Objetivos | 45 |
| Metodologia | 46 |
| Protocolo 1 | 47 |
| 1.1. Estudo do esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos e peso colônico em ratos acordados submetidos a tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 47 |
| 1.1.1. Procedimentos experimentais..... | 47 |
| 1.1.2. Estudo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos..... | 50 |
| 1.1.3. Avaliação do peso colônico..... | 51 |
| Protocolo 2 | 53 |
| 2.1. Estudo da inibição farmacológica (com guanetidina) do sistema nervoso simpático sobre as alterações no esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados induzidas pelo tratamento crônico intravenoso cisplatina ou vincristina..... | |
| 2.1.1. Procedimentos experimentais..... | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.2. Estudo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos..... | 53 |
| 2.1.3. Análise estatística..... | 54 |
| Protocolo 3..... | 55 |
| 3.1. Avaliação hemodinâmica em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 55 |
| 3.1.1. Procedimentos experimentais e cirúrgicos..... | 55 |
| 3.1.2. Estudo das respostas barorreflexas..... | 56 |
| 3.1.3. Mensuração do volume sanguíneo..... | 57 |
| Protocolo 4..... | 60 |
| 4.1. Avaliação sensitiva periférica em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 60 |
| 4.1.1. Procedimentos experimentais..... | 60 |
| 4.1.2. Avaliação da nocicepção térmica com teste da placa quente.... | 60 |
| 4.1.3. Avaliação da nocicepção mecânica com algesímetro plantar...61 | 61 |
| 4.1.4. Protocolo de indução da colite com TNBS..... | 61 |
| 4.1.5. Protocolo de indução da colite com óleo de mostarda | 62 |
| 4.1.6. Avaliação macroscópica do colon..... | 62 |
| 4.1.7. Avaliação microscópica do colon..... | 63 |
| 4.1.8. Avaliação do peso colônico..... | 63 |
| Protocolo 5..... | 66 |
| 5.1. Registros eletrofisiológicos de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina..... | 64 |
| 5.1.1. Procedimentos experimentais..... | 64 |
| 5.1.2. Remoção do gânglio cervical superior (GCS)..... | 64 |
| 5.1.3. Registro eletrofisiológico dos neurônios do gânglio cervical superior..... | 65 |
| 5.1.4. Protocolo para análise dos dados..... | |
| Protocolo 6..... | |
| 6.1. Avaliação morfológica de amostras de tecidos de ratos submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina..... | 72 |

| | |
|---|------------|
| 6.1.1. Procedimentos experimentais e cirúrgicos..... | 72 |
| 6.1.2. Microscopia óptica e eletrônica..... | 73 |
| Resultados..... | 76 |
| Protocolo 1..... | 76 |
| 1.1. Estudo do esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos e peso colônico em ratos acordados submetidos a tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 76 |
| 1.1.1. Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos em ratos tratados com cisplatina..... | 76 |
| 1.1.2. Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos em ratos tratados com vincristina..... | 90 |
| 1.2. Toxicidade do protocolo..... | 101 |
| 1.2.1. Cisplatina..... | 101 |
| 1.2.2. Vincristina..... | 105 |
| Protocolo 2..... | 110 |
| 2.1. Estudo da inibição farmacológica (com guanetidina) do sistema nervoso simpático sobre as alterações no esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados induzidas pelo tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 110 |
| 2.1.1. Cisplatina..... | 110 |
| 2.1.2. Vincristina..... | 110 |
| Protocolo 3..... | 113 |
| 3.1. Estudo hemodinâmico em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 113 |
| 3.1.1. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de fenilefrina em animais tratados com cisplatina..... | |
| 3.1.2. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de atropina em ratos tratados com cisplatina..... | 118 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.3. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de fenilefrina em animais tratados com vincristina..... | 123 |
| 3.1.4. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de atropina em ratos tratados com vincristina..... | 128 |
| 3.1.5. Volemia em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 131 |
| Protocolo 4..... | 133 |
| 4.1. Disfunção sensitiva periférica (somática e visceral) em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina..... | 133 |
| 4.1.1. Disfunção sensitiva somática em ratos submetidos ao tratamento com cisplatina..... | 133 |
| 4.1.2. Disfunção sensitiva somática em ratos submetidos ao tratamento com vincristina..... | 137 |
| 4.1.3. Disfunção sensitiva somática em animais com colite induzida por ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS)..... | 139 |
| 4.1.4. Disfunção sensitiva somática em animais com colite induzida por óleo de mostarda..... | 143 |
| Protocolo 5..... | 145 |
| 5.1. Registros eletrofisiológicos de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina..... | 145 |
| Protocolo 6..... | 155 |
| 6.1. Análise morfológica de amostras de tecidos de ratos submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina..... | 148 |
| 6.1.1. Tecidos nervosos..... | 148 |
| 6.1.2. Tecidos musculares | |
| Discussão | 155 |
| Considerações finais..... | 172 |

| | |
|---|-----|
| Referências bibliográficas | 173 |
| Anexos | 202 |

Introdução

1. Neuropatias induzidas por quimioterápicos

O termo "quimioterapia" significa, literalmente, o uso de substâncias químicas para o tratamento de doenças, porém este termo é comumente utilizado para os compostos químicos que tratam o câncer.

A primeira droga usada para a quimioterapia do câncer, data do século XX, através de pesquisas com a utilização de produtos químicos em tumores transplantáveis em roedores. Foi, no entanto, a partir da Segunda Guerra Mundial, que se iniciaram as pesquisas em humanos com o gás de mostarda que diminuía a contagem de leucócitos do sangue e tratava o linfoma. Depois disto, as pesquisas e a utilização de drogas anti-neoplásicas avançou muito e hoje, a quimioterapia está sendo utilizada para triagem de potenciais novos medicamentos, bem como para tratamentos direcionados (DeVita Jr., Chu, 2008).

Apesar da eficácia destas drogas no tratamento do câncer, estas podem afetar o funcionamento de células normais e causar efeitos colaterais como as neuropatias somática e autonômica. Esta neurotoxicidade é dose limitante, resultando em sofrimento do paciente e limitando o tratamento com quimioterápicos. Este efeito colateral pode levar a diminuição da dose da droga ou interrupção do tratamento anti-câncer, conseqüentemente diminuindo a efetividade da terapia (Forman, 1990 a,b; Quasthoff, Hartung, 2002; Velasco, Bruna, 2010).

A incidência da neurotoxicidade depende da droga utilizada, da dose da droga e da duração da administração. A incidência de neuropatia é significativamente aumentada com prévia ou simultânea administração de outro quimioterápico e com pré-existência de neuropatias, como as causadas por diabetes ou abuso de álcool (Quasthoff, Hartung, 2002).

Muitas drogas quimioterápicas são conhecidas por causar neuropatia periférica, incluindo neste grupo os análogos platinos (cisplatina e carboplatina), os alcalóides da vinca (vincristina, vinblastina, vindesina e vinorelbina), suramino, bortezomib, taxol, talidomida e vários outros (Plotkin, Wen, 2003; Quasthoff, Hartung, 2002; Stubblefield

et al., 2006; Windebank, 1999). Dependendo da substância usada, pode haver uma neuropatia sensitiva pura e neuropatia dolorosa (como cisplatina, oxaliplatina, carboplatina) ou uma neuropatia sensitivo motora com ou sem neuropatia autonômica (como vincristina, taxol, suramino).

A quimioterapia pode causar ainda disfunção autonômica, indicativa de neuropatia que afeta o sistema nervoso autônomo. Evidências clínicas de disautonomia ocorrem mais consistentemente com a vincristina e incluem distúrbios gastrintestinais, atonia da bexiga, impotência e hipotensão ortostática, porém há relatos de alterações dos testes de função autonômica em pacientes tratados com cisplatina ou taxol. Bortezomib, droga inibidora do proteossoma, causa neuropatia autonômica com os seguintes efeitos adversos relatados comumente pelos pacientes em tratamento: fadiga, náuseas, vômitos, diarreia, constipação, hipotensão postural. Estas anormalidades geralmente revertem vários meses após a interrupção do tratamento (Boogerd *et al.*, 1990; Earl *et al.*, 1998; Ghose *et al.*, 201; Jerian *et al.*, 1993; Scheithauer *et al.*, 1985). Todavia, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis para o desenvolvimento de neuropatia induzida por quimioterápicos (Quasthoff, Hartung, 2002).

2. Cisplatina

Cisplatina (cis-diamina-dicloro-platino [II]) (Figura 1), que foi descrita pela primeira vez, como um agente antineoplásico em 1965 por Rosenberg e colaboradores, está entre os agentes quimioterápicos mais frequentemente utilizados para o tratamento de uma ampla variedade de tumores malignos, como o câncer em ovários, peritônio, bexiga, pulmão, testículo e colo do útero (Decatris *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2010; Pezzuolo *et al.*, 2010).

Cisplatina age como agente anticâncer reagindo com o DNA, formando aductos, ou seja, ligações covalentes químico-DNA, originando ligações intra e intercadeias que podem levar a um bloqueio na duplicação e na transcrição, podendo induzir a morte apoptótica da célula rapidamente (Huang *et al.*, 1995).

A capacidade de cisplatina para induzir apoptose é efetivamente influenciada pelo fluxo de K^+ celular. A redução das correntes de K^+ dependentes de voltagem pela

cisplatina pode estar ligada á ativação de enzimas que levam a apoptose (Marklund *et al.*, 2001).

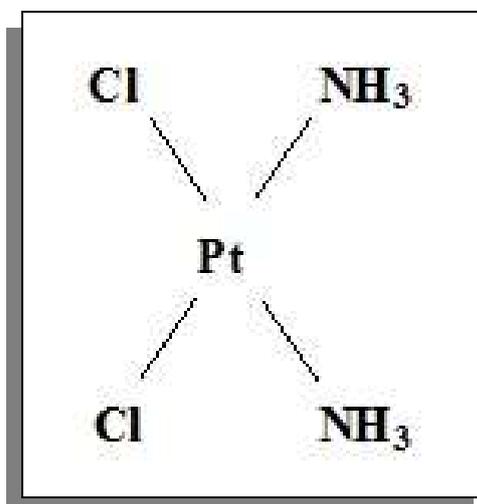


Figura 1. Fórmula estrutural da cisplatina

A eficácia da quimioterapia baseada em platina é limitada pelo desenvolvimento de resistência celular e clínica (Siddik, 2003; Timmer-Bosscha, 1992), levando à falha terapêutica e efeitos colaterais dose – limitantes.

Dependendo da dose e do método de administração da cisplatina, a toxicidade limitante pode incluir nefro (Cornelison, Reed, 1993; Pabla, Kidney, 2008), neuro (Boogerd *et al.*, 1990; Cano *et al.*, 1998; Roelofs *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1984) e ototoxicidade (Glendenning *et al.*, 2010; Smoorenburg *et al.*, 1999), além de mielosupressão (Gandara *et al.*, 1991) e distúrbios gastrintestinais (Cabezos *et al.*, 2008; Cabezos *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 1995; Pezzuolo *et al.*, 2010).

2.1. Neurotoxicidade induzida por cisplatina

Os mecanismos envolvidos na toxicidade do sistema nervoso ainda não são bem compreendidos, sabe-se que a cisplatina liga-se avidamente às proteínas do plasma e dificilmente cruza a barreira hematoencefálica, mas tem uma afinidade elevada pelo sistema nervoso periférico, como ilustrada pela Figura 2.

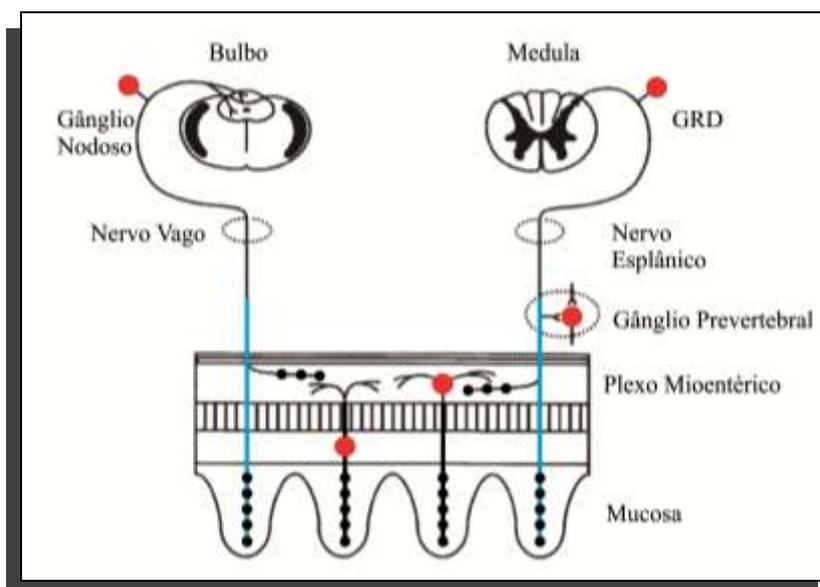


Figura 2. Sítios de lesão do sistema nervoso periférico de animais tratados com cisplatina (■) ou vincristina (■). Inervação aferente do trato gastrointestinal.

Compostos platinos afetam mais os nervos sensitivos que os nervos motores. Uma explicação possível poderia ser a afinidade elevada da droga em acumular nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD), reduzindo os compartimentos citoplasmático e nuclear (Gregg *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1995).

Estudos onde houve a análise *post mortem* de material de vários tecidos neuronais em pacientes tratados com 360 mg/m^2 de cisplatina revelaram o desaparecimento de 15% das fibras nos nervos sural, a presença de neurônios necróticos e nódulos de Nageotte no GRD, a redução do volume médio do corpo de neurônios do GRD em alguns pacientes. Nestes estudos o teor de platina foi alto em todos os tecidos, exceto na medula espinal (Krarup-Hansen *et al.*, 1999).

Esta ação específica da cisplatina pode ser explicada pelo fato de que, em contraste com os neurônios motores, os neurônios do GRD estão situados fora da barreira hemato-encefálica. Em ratos tratados por períodos prolongados com a cisplatina, as concentrações deste composto são elevadas no gânglio espinal e nervos periféricos enquanto baixas no cérebro e medula espinal, indicando que esta droga não ultrapassa a barreira hemato encefálica, não agindo no corpo do neurônio motor localizado no corno anterior da medula espinal (Cavaletti *et al.*, 1991). Administração intraperitoneal (i.p.) de

10 mg/kg de cisplatina (2 mg/kg diariamente por 5 dias) causa apoptose de neurônios sensitivos (Gill, Windebank, 1998).

O mecanismo da neurotoxicidade induzida por cisplatina não é, provavelmente, devido aos danos diretos do DNA, mas é baseado em um distúrbio do metabolismo celular e do transporte axoplasmático, provavelmente ligado às alterações na homeostase intracelular do cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) (Tomaszewski, Büsselberg, 2007). Esta elevação na concentração de Ca^{2+} citosólico pode induzir danos no citoesqueleto e prejudicar o crescimento celular, levando à alteração da ultra-estrutura da célula (Necchi *et al.*, 1995).

A microscopia eletrônica revelou que 16 mg/kg de cisplatina (2 mg/kg uma vez por semana, por 8 semanas) altera esta ultra-estrutura celular ao modificar as propriedades da membrana plasmática em diferentes células e induzir lesões estruturais na membrana nuclear de neurônios do GRD (Yoon *et al.*, 2010). Este composto se liga preferencialmente a proteínas da membrana mitocondrial, particularmente a canais iônicos dependentes de voltagem (Yang *et al.*, 2006).

Outros autores também relataram esta afinidade da cisplatina por proteínas de membrana. Milosavljevic *et al.*, 2010 evidenciaram que esta droga anti neoplásica é um inibidor de transportadores e canais mecanossensíveis, como o trocador Na^+/H^+ e canais de Cl^- e K^+ , envolvidos no programa de destino celular e/ou expressão em órgãos mecanossensíveis, causando fortes efeitos secundários no ouvido interno ou sistema nervoso periférico. Hori *et al.*, 2010 em seus estudos revelaram que a cisplatina alterou a expressão de canais para cátions, envolvidos na nocicepção e termosensibilidade em neurônios do GRD e gânglio trigeminal (GT) e Ta *et al.*, 2010 encontraram que este quimioterápico aumenta o número de canais envolvidos na dor induzida por inflamação e lesão nervosa, no GRD e GT em camundongos.

Outros sítios de lesões estruturais são revelados pela microscopia eletrônica, como a condensação de mitocôndrias (Isonishi *et al.*, 2001), a redução nas áreas do núcleo, citoplasma e nucléolo, além de destruição nucleolar em neurônios primários do GRD e alterações no tamanho e morfologia de células satélites destes gânglios (Barajon *et al.*, 1996; Cece *et al.*, 1995; Ter Laak *et al.*, 2000), além de ter sido revelado níveis aumentados de compostos platinos no DNA nuclear de neurônios e células satélites do GRD (McDonald *et al.*, 2005).

A investigação eletrofisiológica dos efeitos da cisplatina revelou uma redução de correntes de K^+ e Ca^{2+} ativadas por voltagem, de maneira concentração dependente, em

neurônios pequenos do GRD (Scott *et al.*, 1995; Tomaszewski, Busselberga, 2007). Neurônios pequenos e grandes do GRD mostram diferente sensibilidade à aplicação de cisplatina, estes neurônios maiores, que estão relacionados à função motora, provaram ter menor sensibilidade a cisplatina. A redução destas correntes poderia certamente ser responsável pelos efeitos neurotóxicos causados por esta droga e podem explicar um efeito direto da cisplatina na excitabilidade do nervo.

Alterações da excitabilidade nervosa induzida por cisplatina foram evidenciados em nervos periféricos isolados *in vitro* (Grosskreutz *et al.*, 2000), em neurônios γ dinâmicos da lâmina profunda medular de ratos, com o aumento da atividade espontânea após estímulo mecânico nocivo (Cata *et al.*, 2008) e em neurônios do núcleo coclear dorsal relacionados com a perda de células ciliadas externas no aparelho auditivo e o zumbido, relatado por muitos pacientes como efeito colateral da utilização deste quimioterápico (Alberts, Noel, 1995). Estudos revelaram também que camundongos tratados com a dose de 2 mg/kg, uma vez por semana, por 8 semanas de cisplatina, apresentaram hiperalgesia visceral, ao registrar um aumento da atividade visceromotora através de eletromiografia com eletrodos implantados no músculo oblíquo externo (Yoon *et al.*, 2010).

2.1.1. Neuropatia induzida por cisplatina em humanos

Em humanos, o efeito neurotóxico da cisplatina está bem estabelecido (Boogerd *et al.*, 1990; Roelofs *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1984) e constitui um importante fator limitante para o tratamento de diversas neoplasias. Neuropatia sensitiva é um dos efeitos colaterais mais comuns da terapia com cisplatina (doses cumulativas de 200 a 600 mg/m²) e os primeiros sinais de neuropatia predominantemente sensitiva aparecem aproximadamente um mês após o início da terapia (Lomonaco *et al.*, 1992; Mollman *et al.*, 1988; Van Der Hoop *et al.*, 1990).

A gravidade da neuropatia pode ser correlacionada à dose cumulativa deste composto, mais depende também de dose única dada em cada administração. A neuropatia pode surgir após a exposição de quantidades tão baixas quanto 200 mg/m² de cisplatina (Glendenning *et al.*, 2010; Grunberg *et al.*, 1989) e nestas doses baixas, há degeneração de neurônios sensitivos, sem evidências de degeneração axonal distal (Krarup-Hansen *et al.*, 1999). As doses acima de 400 mg/m² conduzirão sempre a danos

neurônios e é relatado que, até 90% dos pacientes que receberam estas dosagens desenvolvem neurotoxicidade periférica grave (Grunberg *et al.*, 1989; Pace *et al.*, 2010).

O quadro clínico da neuropatia é caracterizado pela neuropatia predominantemente sensitiva, com alteração do limiar de percepção vibratória, redução significativa dos reflexos tendinosos profundos e parestesia, começando nas extremidades inferiores, associados a padrão característico de neuropatia axonal sensitiva no estudo da condução nervosa (Brydoy *et al.*, 2009; Earl *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 1984).

A intensidade da parestesia relatada pode ir desde um leve formigamento à dor intensa. Em estágio avançado, o paciente apresenta ataxia com pronunciado distúrbio de marcha, devido à alteração da propriocepção. Contudo estes sintomas freqüentes, que incluem também, câibras musculares, sensação dolorosa, alterações da percepção descrita como choques que percorreram a coluna cervical e dorsal (sinal de Lhermitte) são conseqüências da desmielinização das colunas e raízes dorsais (Inbar *et al.*, 1995; Siegal, Haim, 1990). Sintomas de neuropatia podem iniciar mesmo após terminar a terapia e podem persistir por meses seguidos (Grunberg *et al.*, 1989).

O exame histológico de axônios e raiz dorsal de animais tratados com cisplatina revela a perda dos axônios com atrofia secundária da raiz dorsal. Em um estágio avançado da neuropatia, desenvolve-se perda de fibras mielinizadas e gliose reativa da coluna dorsal em conseqüência da perda do GRD (Walsh *et al.*, 1982). A neuropatia induzida por compostos platinos pode conseqüentemente ser categorizada como neuropatia primária ao invés de axonopatia (Krarup-Hansen *et al.*, 1999).

A eletroneuromiografia detecta neuropatia axonal sensitiva pura e neuropatia desmielinizante secundária, relativamente tardia ante as manifestações clínicas dos sintomas. O nervo sural, o mais sensível indicador de neuropatia sensitiva, mostra redução na amplitude e na velocidade de condução do potencial de ação em conseqüência de perda axonal e desmielinização (Grunberg *et al.*, 1989).

Condições que afetam as fibras nervosas de pequeno diâmetro, como a neurotoxicidade induzida por cisplatina, são mais susceptíveis a causar disfunção autonômica.

Vários estudos demonstram alterações gastrintestinais associadas ao uso da cisplatina. Pezzuolo *et al.*, 2010 relataram que 3% dos pacientes idosos com câncer de pulmão, que fizeram uso deste quimioterápico (20 mg/m², nos 3 primeiros dias de um

ciclo de 21 dias), tiveram como efeito colateral a toxicidade gastrointestinal. Nelson *et al.*, 1993 afirmaram que a cisplatina induz o vômito em 90% dos pacientes e retarde do esvaziamento gástrico que podem ser responsáveis, em parte, por anorexia, saciedade precoce e náuseas associadas ao tratamento do câncer.

Diarréia, vômito e náusea são os principais sinais de toxicidade gastrointestinal em pacientes tratados com 120-675 mg/m² (20-40 mg/m², uma vez por semana, durante 6 ciclos ou 75 mg/m², uma vez a cada duas semanas, por 9 ciclos) de cisplatina, acompanhados de sintomas, tais como o desconforto abdominal nos pacientes (Punushapai *et al.*, 2010; Stathopoulos *et al.*, 2010). Estes problemas podem estar relacionados à disfunção do sistema nervoso autônomo (Nelson *et al.*, 2002). Além disso, os pacientes podem apresentar hipotensão postural, palpitações e dispnéia aos esforços (Richardson, Cantwell, 1990; Schiller, 1996; Shin *et al.*, 1998).

As origens da neuropatia autonômica em pacientes com câncer, entretanto, são provavelmente multifatoriais e drogas citotóxicas pode ser apenas um fator. As mortes súbitas nestes doentes têm sido indevidamente atribuídas à toxicidade vascular e pode de fato ter sido devido à disfunção autonômica. Além disso, a disfunção autonômica pode ser incapacitante em pacientes idosos. Estas alterações autonômicas podem ter papel importante na disfunção da bexiga, hipotensão postural e insuficiência de termorregulação em idosos (Richardson, Cantwell, 1990).

Estas manifestações autonômicas induzidas por cisplatina podem aparecer como síndrome disautonômica expressa sob a forma de hipotensão ortostática grave, implicando a ação deste composto em pequenas fibras nervosas vegetativas (mielinizadas ou não), através de possíveis mecanismos diretos, toxicidade nas fibras nervosas, e indiretos, devido a perturbações imunológicas de desordens metabólicas (Keime-Guibert *et al.*, 1998; Lebrun *et al.*, 1999; Tuailon *et al.*, 2004).

Estudos comprovaram que, em indivíduos que em média fizeram uso de 400 mg/m² de cisplatina, os testes de função autonômica podem indicar anormalidades no sistema nervoso simpático com a queda da pressão arterial sistólica ou anormalidades no sistema nervoso parassimpático, em pacientes submetidos à manobra de Valsalva, cujo resultado foi expresso em taxa de Valsalva anormal, que é a razão entre as durações do maior intervalo R-R no eletrocardiograma após a manobra (bradicardia) e do menor intervalo R-R durante o esforço (taquicardia do esforço) ou resposta anormal a respiração profunda, como o aumento da frequência cardíaca (Earl *et al.*, 1998).

Argyriou *et al.*, 2005, evidenciaram disfunção simpática ao pesquisarem a resposta simpática da pele, usada na avaliação das fibras sudomotoras simpáticas, em pacientes tratados com 360 mg/m^2 (60 mg/m^2 a cada 3 ou 4 semanas por 6 ciclos) de cisplatina. Estes autores relataram sintomas de disfunção autonômica em 13% dos pacientes que fizeram uso de cisplatina, sugerindo que a neuropatia periférica induzida por cisplatina possa produzir alteração da atividade simpática na pele, agindo em fibras pequenas, distais e não mielinizadas, antes de danificar fibras simpáticas ou parassimpáticas para causar sintomas de disautonomia.

2.1.2. Neuropatia induzida por cisplatina em roedores

O modelo de injeções repetidas de cisplatina para induzir neuropatia periférica em roedores já é bem estabelecido. As diferentes doses, esquemas de dosagens e vias de administração encontrados na literatura foram: 2 mg/kg de cisplatina, 2 vezes por semana por 8 vezes, i.p. (Lauria *et al.*, 2005; Pisano *et al.*, 2003), 2 mg/kg de cisplatina, 2 vezes por semana por 4 vezes, i.p. (Cavalleti *et al.*, 1992), 1 e 2 mg/kg de cisplatina alternadamente a cada 3 dias por 10 vezes, i.p. (Authier *et al.*, 2000), uma (3 mg/kg), duas (2 mg/kg), ou três (1 mg/kg) vezes semanalmente até doses cumulativas de 15 ou 20 mg/kg , i.p. (Authier *et al.*, 2003a) e 2 mg/kg de cisplatina via veia da cauda (Joseph e Levine, 2009).

Este composto platino induz uma neuropatia sensitiva severa e dose-limitante, devido aos danos nos neurônios sensitivos primários do gânglio da raiz dorsal (GRD), onde este forma aductos de DNA (De Grandis, 2007; Meijer *et al.*, 1999). Cisplatina é também responsável pelas mudanças na expressão gênica em neurônios do GRD de ratos. Esta droga afeta a expressão de vários genes associados a apoptose, a inflamação, o crescimento e a regeneração de nervo (Alaedini *et al.*, 2008).

Doses cumulativas altas e baixas de cisplatina produzem modelo de neuropatia sensitiva em roedores que podem ser avaliados pelos critérios comportamental, eletrofisiológico ou anatômico. Contudo, doses altas de cisplatina têm maior efeito prejudicial a saúde geral dos animais, o suficiente para limitar o desenvolvimento da pesquisa (Boyle *et al.*, 1999). O modelo de baixa dose é pois suficiente para reproduzir neuropatia nociceptiva, tendo vantagem significativa de ser menos prejudicial na saúde em geral do animal. Os modelos de neuropatia em roedores utilizam doses baixas

cumulativas (7,5 – 20 mg/kg) (Authier *et al.*, 2003a) e estas são administradas com diferentes esquemas de dosagem [tratamento agudo com 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg de cisplatina, i.p. ou 1, 3 e 10 mg/kg, i.p., ambos 30 min antes da administração da refeição teste (Badary *et al.*, 2006; Kishibayashi *et al.*, 1993) e tratamento crônico com 3 ou 6 mg/kg de cisplatina, i.p., 24 ou 48 h antes da refeição teste (Cabezos *et al.*, 2008) ou 1–3 mg/kg de cisplatina, i.p., uma vez por semana por 4 semanas consecutivas (Cabezos *et al.*, 2010).

Nestes modelos surgem alterações na função sensitiva incluindo diminuição do limiar para dor, hiperalgesia e alodinia mecânicas, hiperalgesia e alodinia ao frio e hipoalgesia ou hiperalgesia térmica, além de diminuição no ganho de peso e déficit motor incluindo diminuição de força muscular e atividade motora (Authier *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a; Bardos *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2010; Pisano *et al.*, 2003; Ta *et al.*, 2010).

Doses altas cumulativas de cisplatina alteram a propriocepção e podem causar hipoalgesia, diminuição da velocidade de condução nervosa sensitiva e alterações anatômicas, que inclui diminuição da inervação periférica (Aloe *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a; Boyle *et al.*, 1999; Chattopadhyay *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 1995).

As alterações comportamentais em roedores reproduzem os sintomas clínicos de neuropatia observados em humanos tratados com cisplatina. No início do tratamento os pacientes apresentam sensações anormais que podem ser desde formigamento à dor persistente, parestesias e disestesias distais. Roedores tratados com doses baixas cumulativas de cisplatina têm diminuição do limiar de dor que reflete a dor observada em humanos (Hammack *et al.*, 2002; Pirovano *et al.*, 1992). Déficit proprioceptivo é observado em ratos tratados com doses altas cumulativas (Boyle *et al.*, 1999; Chattopadhyay *et al.*, 2004; Hori *et al.*, 2010) e em humanos em estágios mais avançados da neuropatia, assim como a perda de sensibilidade vibratória com sinais de ataxia e ausência de reflexos profundos (Pirovano *et al.*, 1992; Quasthoff, Hartung, 2002).

Uma diferença importante entre o modelo animal e a patologia humana é que a diminuição da atividade motora e da força muscular observada em alguns modelos animais (Authier *et al.*, 2000; Bardos *et al.*, 2003; Chattopadhyay *et al.*, 2004), fenômeno não observado em humanos tratados com cisplatina (Bianchi *et al.*, 2005; Quasthoff, Hartung, 2002).

Anormalidades anatômicas e eletrofisiológicas incluindo degeneração axonal principalmente em fibras mielinizadas maiores e diminuição da velocidade de condução nervosa, observadas em humanos tratados com cisplatina são também vistas em modelos de neuropatia induzida por cisplatina em roedores (Authier *et al.*, 2003a; Gao *et al.*, 1995; Quasthoff, Hartung, 2002;).

Alterações anatômicas do neurônio ou degeneração axonal são observadas principalmente no tecido subcutâneo da pata, onde há diminuição da densidade de fibras nervosas intraepidermais e células de Langerhans, sendo esta degeneração menos extensa no nervo isquiático e medula lombar. Porém, a destruição estrutural da bainha de mielina e mitocôndrias do nervo isquiático e a perda da integridade da mielina e estrutura do nervo sural podem ser encontradas em animais tratados com cisplatina (Authier *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a; Bardos *et al.*, 2003; James *et al.*, 2010; Lauria *et al.*, 2005; Pisano *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2009).

Estudos das propriedades eletrofisiológicas dos nervos sensitivos encontram alterações como a diminuição na condutância nervosa e velocidade de condução, aumento da latência distal e redução da amplitude do potencial de ação do nervo sural, porém apenas ligeira alteração da velocidade de condução nervosa para a função motora é encontrada em nervos isquiático / tibial. Os estudos da condução do nervo sural são consistentes com a polineuropatia sensitiva, encontrada em seres humanos que recebem a terapia com a cisplatina (Authier *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a; Bardos *et al.*, 2003; James *et al.*, 2010; Lauria *et al.*, 2005; Pisano *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2009).

O modelo animal também difere entre os sexos, sendo a toxicidade da cisplatina em geral mais grave nos machos do que nas fêmeas, como indicado pelo maior grau de perda de peso e mortalidade. No caso da velocidade de condução motora do nervo isquiático, a redução é mais acentuada nos machos. Além disso, as alterações morfológicas do nervo parecem ser mais graves nas fêmeas, enquanto que alterações nos neurônios do GRD são mais marcantes nos machos. Quanto ao nível de fator de crescimento no nervo isquiático, este é similar entre machos e fêmeas (Wongtawatchai *et al.*, 2009).

Nos estudos sobre a neuropatia autonômica induzida por cisplatina em roedores, inibição dose-dependente no esvaziamento gástrico, refletida por acúmulo de alimento no estômago, anorexia e dismotilidade gastrointestinal (Bradner, Schurig, 1981; Cabezos *et al.*, 2008; Cabezos *et al.*, 2010), ou ainda disfunção sudoromotora (Verdú *et al.*, 1999),

atividade mioelétrica anormal no antro e no intestino delgado (Chey *et al.*, 1988), neurite em neurônios simpáticos do gânglio cervical superior (Hayakawa *et al.*, 1994) estão associados à disfunção autonômica (Vandertop *et al.*, 1996).

Estes efeitos colaterais da cisplatina no sistema gastrointestinal podem ser alterados pelos antagonistas da metoclopramida, um bloqueador dopaminérgico, antiemético e estimulante peristáltico (Roos *et al.*, 1981), do receptor 5-HT₃ (5-hidroxitriptamina ou serotonina) (Kishibayashi *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1992) e os antioxidantes (Sharma, Gupta, 1998).

Badary *et al.*, 2006 relataram que cisplatina inibiu de maneira dose-dependente a taxa de esvaziamento gástrico após uma refeição teste. Este efeito pode ter sido devido à liberação de 5-HT das células enterocromafins da mucosa no trato gastrointestinal. O 5-HT libera os receptores periféricos 5-HT₃ nas fibras aferentes vagais e causa o relaxamento do estômago que pode ocasionar o retardo no esvaziamento gástrico de líquidos. Ademais a cisplatina induz a geração de radicais livres no intestino (Sangeetha *et al.*, 1990) que pode conduzir à liberação subsequente de 5-HT (Matsuki *et al.*, 1993) podendo agir em 5-HT₃ periférico para relaxar o estômago e produzir um atraso no esvaziamento gástrico.

O vômito, as náuseas, as perturbações da função gastrointestinal, ou a menor ingestão de alimentos induzida por cisplatina pode ter como mecanismo a ativação do rombencéfalo e regiões cerebrais posteriores e rostrais responsáveis pelo circuito emético, possivelmente por via vagal (De Jonghe, Horn, 2009).

3. Vincristina

Vincristina é um alcalóide natural (Figura 3), derivado da planta pervinca de Madagascar, denominada de *Catharantus roseus*, mas, devido ao uso frequente e prevalente de *Vinca rosea*, o último nome poderá ser usado como sinônimo. Esta é uma espécie da família das Apocyanaceae, popularmente conhecida em nosso meio como boa-noite (Chabner *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1963). Esta planta tem desfrutado de grande reputação na medicina popular em várias partes do mundo. Em 1910, Peckholt descreveu o uso no Brasil de uma infusão das folhas para controle da hemorragia e

escorbuto, seja como bochecho para dor de dente ou para a cura e limpeza de feridas crônicas (Johnson *et al.*, 1963).

Atualmente, a vincristina é um antineoplásico muito utilizado no tratamento do câncer em tumores malignos sólidos e hematológicos, como o linfoma não-Hodgkin, a leucemia linfoblástica aguda, câncer testicular, neuroblastoma, tumor de Wilms, tumores cerebrais, rabdomiosarcoma, carcinoma de mama e de bexiga (Chabner *et al.*, 1996; Siau *et al.*, 2006).

Segundo Dumontet, Sikic, 1999, os alcalóides da vinca (vincristina e vinblastina) promovem seus efeitos no tratamento de tumores malignos, ao ligarem-se na tubulina e interferir na dinâmica do microtúbulo, interrompendo então a mitose. Os microtúbulos são estruturas tubulares rígidas compostas por um esqueleto de tubulina e MAPs (proteínas associadas ao microtúbulo) que determinam a forma celular e desempenham papéis importantes na divisão celular, na motilidade e migração celular, no transporte celular e na transdução de sinais.

Apesar da sua eficácia no tratamento do câncer, estes quimioterápicos produzem importantes efeitos colaterais que limitam a sua utilização, sendo a neurotoxicidade a complicação mais comum. A vincristina, produz mais comumente neuropatia periférica, podendo ainda causar neuropatia autonômica e cranial (Lebrun *et al.*, 1999; Macdonald, 1991; Riga *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 1985; Sarkar *et al.* 2009; Shapiro, Young, 1984).

Dentre os efeitos tóxicos, foram descritos parestesias, mielosupressão evidenciada por trombocitopenia, anemia e leucopenia transitórias (Bergman *et al.*, 1997), mucosite oral grave, íleo paralítico, bexiga neurogênica (Citak *et al.*, 2008), mialgia, fraqueza muscular, febre alta, distúrbios de vários órgãos (fígado, coração), hipertensão e insônia (Chae *et al.*, 1998), fibrose pulmonar (Ki *et al.*, 2010) e isquemia mesentérica superior (Allerton, 1996). Já a cardiotoxicidade induzida por vincristina pode ser manifestada por bradicardia sinusal, bloqueio atrioventricular, taquicardia ventricular, hipotensão arterial, insuficiência cardíaca e isquemia (Yeh *et al.*, 2004).

3.1. Neurotoxicidade induzida por vincristina

Vincristina é um agente neurotóxico, afetando o sistema nervoso periférico, sob a forma de parestesia dolorosa e neuropatia periférica (Kanbayashi *et al.*, 2010; Kaplan,

Wiernick, 1982; Sandler *et al.*, 1969) a ponto de limitar seu uso na clínica médica (Windebank, 1999).

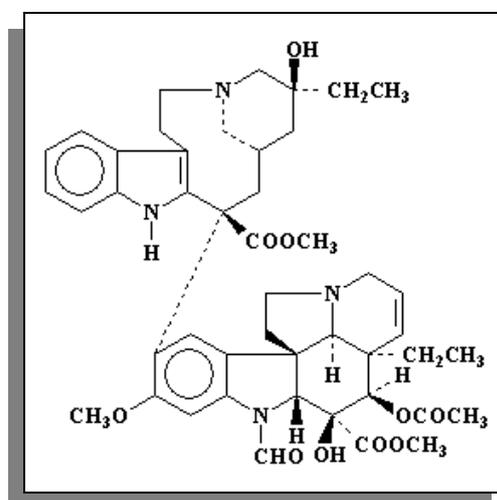


Figura 3. Fórmula estrutural do sulfato de vincristina

Em ratos tratados com doses cumulativas de 500 ou 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.v., Authier *et al.*, 1999 identificaram modelo de neuropatia com toxicidade axonal pura, conservando a bainha de mielina, fenômeno que estaria relacionado à característica lipofílica desta droga na morfologia da degeneração (Authier *et al.*, 2003b). Ogawa *et al.*, 2000 também encontraram injúria axonal em fibras tanto mielinizadas como não mielinizadas as quais progrediram para degeneração da fibra, em suínos tratados com vincristina por via intravenosa em doses de 200, 250 ou 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, uma vez por semana, durante 6 semanas, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uma vez por semana durante 3 semanas, ou dose única de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina. Outra hipótese é a vincristina causar degeneração axonal distal mediante toxicidade axonal em neurônios do GRD (Silva *et al.*, 2006), como ilustrado na figura 2. Já Djaldetti *et al.*, 1996 mostraram a destruição das células de Schwann e bainha de mielina em camundongos. Em cultura de células contendo neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, a vincristina causa desmielinização, demonstrada por microscopia eletrônica (Hiser *et al.*, 2008).

A estrutura e função das fibras nervosas periféricas são afetadas por 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.v. na veia da cauda, ao ligar-se às subunidades da tubulina, proteína dos microtúbulos, causando a dissolução dos microtúbulos axonais e estimulando a

proliferação de neurofilamentos, ocasionando mudanças no fluxo no axoplasma. Esta desorganização do transporte axonal é um provável fator causador destes efeitos neuropáticos (Topp *et al.*, 2000).

Muitas evidências de possíveis mecanismos da neurotoxicidade induzida por vincristina são descritos na literatura. O aumento da atividade espontânea de fibras A β , A Δ e C de neurônios aferentes primários com alterações nos limiares de toque, sensibilidade tátil e calor, parece ser um dos fatores da patogênese da neuropatia periférica dolorosa induzida após 10 doses de 50 μ g/kg de vincristina, i.p. (Dougherty *et al.*, 2007; Xiao, Bennett, 2008). Tanner *et al.*, 2003 evidenciaram que o tratamento diário (de segunda a sexta-feira) com 100 μ g/kg de vincristina durante 2 semanas, i.v., altera o padrão temporal de potenciais de ação em nociceptores de fibras C, aumentando a frequência de disparos e induzindo a atividade dependente de efeitos pós-sinápticos nas vias sensitivas.

A degeneração parcial da inervação intraepidermal sugere mecanismos que possam produzir dor neuropática induzida por 10 doses de 50 μ g/kg de vincristina, i.p., e a ativação de células epidermais de Langerhans sugere possíveis interações neuroimunes que também pode ter um papel (Siau *et al.*, 2006).

A literatura relata também o envolvimento de receptores β 1 e β 2 na transmissão do estímulo nociceptivo induzido por vincristina sendo que os inibidores de cicloxigenases podem aumentar a atividade antihiperálgica de antagonistas seletivos destes receptores. Além disto, a bradicinina parece ativar neurônios via síntese do ON (Óxido Nítrico). Portanto, a bradicinina e a síntese do ON são vias envolvidas na dor neuropática induzida por vincristina (Bujalska *et al.*, 2008; Bujalska *et al.*, 2009). Além de disfunção da cascata L-arginina / ON / GMPc na medula espinal poder desencadear hiperálgia térmica induzida por 50 μ g/kg de vincristina, i.p., em camundongos (Kamei *et al.*, 2005).

Os adrenorreceptores α 1 e α 2 também estão envolvidos em modelos de dor neuropática induzida por vincristina. Neste modelo a administração de um inibidor destes receptores retardou a hiperálgia, bem como produziu antinocicepção (Bujalska *et al.*, 2008).

Hipersensibilidade e alodinia mecânica presentes na neuropatia induzida por 100 μ g/kg (10 μ g/kg diariamente em dois ciclos de 5 dias) de vincristina, i.p., podem ter como mecanismos a expressão de receptores opióides de mecanoceptores com baixo

limiar. O aumento dos níveis de encefalinas endógenas, induzidas por um inibidor das enzimas que catabolizam a encefalina, pode reduzir estas alterações sensitivas, para isso, Thibault *et al.*, 2008 sugerem que as encefalinas podem vincular-se a receptores opióides periféricos expressos em mecanonociceptores C e A Δ .

Outro mecanismo envolvido neste tipo de neuropatia seriam os receptores de serotonina atuantes na sensibilização de nociceptores periféricos e nocicepção medular. Nas células do gânglio da raiz dorsal de ratos tratados com vincristina, há aumento no número de receptores 5-HT_{2A}. Já a alodinia térmica e hipersensibilidade mecânica induzida por vincristina diminuíram de maneira dose dependente após injeção epidural de antagonista do receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Thibault *et al.*, 2008).

O receptor de potencial transiente vanilóide (TRPV4), componente de um complexo molecular que contribui para a hiperalgesia mecânica de diversas etiologias, presumivelmente como parte de um complexo de sinalização de mecanorreceptores, também está envolvido no mecanismo da neuropatia induzida por 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.p., já que em camundongos nocaute para TRPV4 a hiperalgesia mecânica nestes animais foi fortemente reduzida (Alessandri-Haber *et al.*, 2008). A interleucina 6 previne as alterações dos testes comportamentais relacionados a dor neuropática e alterações eletrofisiológicas induzidas por 12 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.p., além de prevenir alterações patológicas no sistema nervoso periférico, semelhante a 4-metilcatecol, conhecido indutor de secreção de fator de crescimento neural, com já conhecido efeito protetor em modelos de neuropatia induzida por quimioterápicos (Callizot *et al.*, 2008).

A hiperalgesia induzida por 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, administrada i.v., diariamente (de segunda a sexta-feira) durante 2 semanas, parece envolver as seguintes vias de segundo mensageiro: proteína quinase A, a proteína quinase C e o óxido nítrico (Aley, Levine, 2002). A administração de 10 doses de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.p., está associada ao aumento do estresse oxidativo e dos níveis de cálcio intracelular (Kaur *et al.*, 2010; Muthuraman *et al.*, 2008). As alterações na regulação de Ca^{2+} contribuem para evocar a dor neuropática induzida por 10 doses de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (Flatters, Bennett, 2004; Siau, Bennett, 2006). O bloqueio do ON envolvido na transmissão nociceptiva, em que os canais de Na^+ tetrodotoxina-resistentes desempenham um papel importante, podem participar no efeito antinociceptivo da mexiletina na hiperalgesia térmica induzida por 12 doses de 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.p. (Kamei *et al.*, 2006).

A administração de inibidores dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e Na^+/H^+ atenua a degeneração axonal, reduz o limiar nociceptivo com redução dos níveis de Ca^{2+} e estresse oxidativo de animais tratados com 10 doses de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.p., (Muthuraman *et al.*, 2008).

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial contribui com a dor neuropática induzida por 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.v. e esta é dependente de ATP (Joseph, Levine, 2006).

A vagotomia subdiafragmática em ratos tratados com 10 doses de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.v., com conseqüente diminuição da atividade vagal, aumenta a gravidade da evolução temporal da polineuropatia dolorosa induzida por este quimioterápico. Nestes animais houve o desenvolvimento mais precoce da sensibilização central, aumento da incidência de comportamento de dor espontânea, aumento da alodinia mecânica dinâmica e aumento da resposta à dor induzida por estímulos mecânicos repetitivos e não dolorosos (Weissman-Fogel *et al.*, 2008).

Em estudos eletrofisiológicos, amplitude, integral e velocidade de condução foram reduzidas de maneira dose dependente (Favaro *et al.*, 1988). Foi encontrada também velocidade de condução normais ou alteradas ligeiramente em fibras sensitivas e motoras, com redução na amplitude das respostas evocadas (Gottschalk *et al.*, 1968; Sandler *et al.*, 1969). Já em registro eletrofisiológico *ex vivo* de nervo isquiático de ratos, tratados com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, ocorreu diminuição significativa da velocidade de condução (Authier *et al.*, 2003b). De acordo com Tanner *et al.*, 1998b, tratamento com vincristina induz hiperresponsividade do nociceptor e significativa diminuição da velocidade de condução de fibras A e C em fibra do nervo sural.

Estudos histológicos em ratos revelaram mudanças ultraestruturais do nervo, como o aumento do diâmetro dos axônios (Topp *et al.*, 2000) e diminuição da densidade de microtúbulos e do número de axônios não mielinizados (Shiraishi *et al.*, 1985; Tanner *et al.*, 1998a).

3.1.1. Neuropatia induzida por vincristina em humanos

Vincristina produz uma variedade de condições neuropáticas caracterizadas por: mialgias, dor e parestesia em queimação, neuropatia sensitiva em luvas e botas, hipersensibilidade espontânea a estímulo doloroso (hiperalgesia) e dor evocada por

estímulo não nocivo (alodinia). Estes efeitos em humanos são dose e tempo dependentes e freqüentemente persistentes. A hiperalgesia / alodinia deve ocorrer com latências de dias a semanas, e deve ser cumulativa com toxicidade similar a outras drogas como o paclitaxel (Ashburn, Lipman, 1993; Cavaletti *et al.*, 1995; Forman, 1990 a,b).

A neurotoxicidade da vincristina é bem conhecida, no entanto, a neuropatia craniana não é amplamente conhecida. Naithani *et al.*, 2009 descreveram em uma criança com leucemia linfociblastica aguda tratada com vincristina, paralisia bilateral das cordas vocais. Vincristina induz raramente paralisia nas cordas vocais, mas esta é uma complicação séria, onde o paciente desenvolve progressivo estridor durante o tratamento com este quimioterápico (Burns, Shotton, 1998; Latiff *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 1999). Paresia de músculos oculares pode estar presente em neuropatia do abducente em paciente tratado com 4 mg/m²/d de vincristina, uma vez a cada 3 semanas (Toker *et al.*, 2004).

A neuropatia periférica induzida por vincristina é sensitivo motora, começando com parestesia nas mãos e pés (Kaplan, Wiernick, 1982) e a sensibilidade tátil e a térmica apresentam-se mais afetadas que a sensibilidade vibratória. Características clínicas de polineuropatia periférica simétrica estão presentes como: arreflexia ou hiporreflexia, dor neuropática, parestesias, disestesias e fraqueza dos membros inferiores. Pode apresentar neuropatia autonômica com severa constipação, bem como neuropatia craniana (Akbarayam *et al.*, 2010; Bahl *et al.*, 2010; Leker *et al.*, 1997; Ozyurek *et al.*, 2007; Tarlaci, 2008).

Esta neuropatia periférica é dose dependente com variável suscetibilidade individual e depois de parada na administração desta droga, há recuperação clínica completa ou parcial, sendo mais comum, recuperação incompleta com alterações sensitivas e déficit motor (Gottschalk *et al.*, 1968).

Sintomas gastrintestinais ocorrem comumente, com constipação, dor abdominal e íleo paralítico como as principais manifestações (Evans *et al.*, 1963; Evans, 1968; Haggard *et al.*, 1968). Sandler *et al.*, 1969, em uma série de 50 pacientes com leucemia, tratados com vincristina, relataram que 46% apresentavam dor abdominal ou constipação e foi encontrado, em 25% destes pacientes, íleo adinâmico.

A neuropatia autonômica apresenta-se como constipação, dor abdominal com cólicas, prisão de ventre, e retenção urinária e está relacionada à inibição do transporte axoplasmático devido à ruptura dos microtúbulos axonais (Gomber *et al.*, 2010;

Macdonald, 1991; Wang *et al.*, 2000). Os danos ao plexo mioentérico pela vincristina implicam em hipomotilidade intestinal (Smith, 1967) que conduz à constipação em até 33-46% dos pacientes tratados (Macdonald, 1991). O íleo paralítico ocorre em 3-12% dos pacientes, e em 30% deles pode ser fatal.

3.1.2. Neuropatia induzida por vincristina em roedores

Neuropatia sensitiva periférica induzida por vincristina em ratos tem revelado hiperalgesia mecânica e térmica, como também alodinia térmica e mecânica ou hipoalgesia térmica, associados com significativas alterações histológicas e eletrofisiológicas. Prolongada administração intravenosa de 200 - 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina causa alodinia tátil, dose dependente, com ausência de hiperalgesia térmica, sugerindo que estas duas manifestações têm etiologias fisiopatológicas diferentes (Aley *et al.*, 1996; Authier *et al.*, 1999; Authier *et al.*, 2003b; Kaur *et al.*, 2010; Nozaki-Taguchi *et al.*, 2001).

Vincristina causa neuropatia dolorosa em ratos e camundongos verificados por hiperalgesia e alodinia mecânicas (Joseph, Levine, 2003; Saika *et al.*, 2009). Um modelo de neuropatia nociceptiva induzida por 5 doses de 50, 100 ou 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.v., tem sido caracterizado por alterações nas mensurações nociceptivas que aparecem em uma semana depois da primeira dose de vincristina e permanecem após várias semanas da última dose (Authier *et al.*, 2003b).

Ratos tratados com vincristina ganham peso em menor razão que ratos controles, mas não há diferença na aparência geral. Não há déficit motor em ratos tratados com única dose. Modelos em que a neuropatia induzida por doses múltiplas de vincristina produz início rápido da neuropatia dolorosa, mas doses cumulativas $> 150 \mu\text{g}/\text{kg}$ também produz moderado a severos efeitos na saúde geral e déficit motor em muitos estudos. Doses cumulativas $> 750 \mu\text{g}/\text{kg}$ causam significativa mortalidade (Aley *et al.*, 1996; Authier *et al.*, 1999; Nozaki-Taguchi *et al.*, 2001).

Quanto à neuropatia autonômica, Uy *et al.*, 1967 relataram que quando ratos foram tratados com dose única de vincristina (1 mg/kg), estes apresentaram distensão abdominal e diminuição das contrações intestinais.

Segundo Sninsky, 1987, 7,5, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.v., altera a atividade mioelétrica do intestino e isto está associado a alterações no trânsito intestinal. Após administração de vincristina a imunocitoquímica revelou concomitantes distúrbios em células apresentando imunoreatividade para a gastrina no antro, para polipeptídeo inibitório da gastrina e 5-hidroxitriptamina no duodeno, para enteroglucagon no colon e somatostatina em todos os três sítios (Johnston *et al.*, 1985).

O tratamento crônico com 150 – 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina intravenosa retarda o esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal de líquido em ratos, este efeito está correlacionado com o aumento máximo no peso do cólon, mas não com a mudança de limiar da dor (Peixoto Júnior *et al.*, 2009).

Neuropatia autonômica é induzida por 10 doses de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, i.v., ao diminuir a atividade vagal expressa pela diminuição de parâmetros parassimpáticos da variabilidade da frequência cardíaca, sem expressar destruição da inervação simpática cardíaca (Weissman-Fogel *et al.*, 2008).

Os quimioterápicos causam, além de neuropatia periférica, disfunções gastrintestinais como náuseas, vômitos e desconforto abdominal o que limita sua administração (Eglen *et al.*, 1993). A maioria de agentes anticâncer retarda o esvaziamento gástrico (Kishibayashi *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1992).

Objetivos

Diante destas evidências resolvemos realizar um estudo da função autonômica induzida por cisplatina ou vincristina em ratos e seus possíveis mecanismos, sendo os objetivos específicos desta pesquisa:

- Estudar a retenção gástrica, o trânsito gastrintestinal de líquidos e o peso colônico;
- Investigar o efeito da depleção da função do sistema nervoso simpático com guanetidina sobre a retenção gástrica e trânsito gastrintestinal de líquidos;
- Avaliar hemodinamicamente e as alterações barorreflexas nestes animais;
- Avaliar a sensibilidade térmica e a mecânica;
- Realizar a análise eletrofisiológica de neurônios simpáticos do GCS;
- Analisar morfológicamente amostras dos nervos ciático e vago, gânglios autonômicos e somáticos, músculo liso do estômago e intestinos destes animais.
- Produzir um modelo para neuropatia autonômica em ratos.

Metodologia

Os experimentos foram realizados em ratos albinos machos, pesando 170-350 g, mantidos sob ciclo de 12h luz/escuro, recebendo comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos cirúrgicos e manipulação dos animais foram conduzidos de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Estes animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Ceará e este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Ceará (ANEXO I).

Os experimentos foram realizados em laboratórios de pesquisa, procurando atenuação de som e mantendo-se a temperatura em estabilidade com ar-condicionado (20 - 22°C).

Estatística descritiva foi aplicada para cada subgrupo do experimento, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão, plotados em gráficos pelo software Sigma Plot e analisados pelo Sigma Stat. O Teste One-Way Análise de Variância (ANOVA) seguido do Teste de Holm-Sidak foram usados para comparar médias entre os múltiplos subgrupos. Para comparação entre dois subgrupos foi usado o Teste “*t*” de Student-Newman-Keuls, enquanto a análise dos subgrupos antes, durante e após o tratamento foi realizada pelo ANOVA com Medidas Repetidas seguido do Teste de Holm-Sidak. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$) e diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

Protocolo 1

1.1. Estudo do esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos e peso colônico em ratos acordados submetidos a tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

1.1.1. Procedimentos experimentais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar, machos, pesando entre 170 e 250 g. Os ratos foram aleatoriamente divididos em subgrupos de 5-10 ratos, experimentais e controles.

Para estes experimentos foram utilizados protocolos de tratamento semelhantes aos descritos por Joseph e Levine, 2009 e Authier *et al.*, 2003b para indução de neuropatia periférica em ratos.

Os quimioterápicos foram administrados da seguinte forma:

A cisplatina (Tecnoplatin®, Eurofarma/Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, São Paulo-SP), cujo peso molecular é 300,1 g/mol, foi administrada em 36 animais, por via intravenosa na veia da cauda nas doses de 0,5, 1 ou 2 mg/kg em dias consecutivos. Os ratos submetidos ao tratamento crônico com cisplatina foram divididos em sete subgrupos. Um subgrupo (N=5) recebeu 5 doses de cisplatina 0,5 mg/kg (total de 2,5 mg/kg), três outros subgrupos receberam 2 (N=4), 3 (N=6) ou 5 (N=5) doses de cisplatina 1 mg/kg (2-5 mg/kg) e 3 demais subgrupos 1 (N=6), 2 (N=5) e 5 (N=5) doses de 2 mg/kg cisplatina (2-10 mg/kg) (Figura 4A).

Os subgrupos controle para a cisplatina, formados por um total de 38 animais, receberam volume de salina de acordo com o peso dos ratos, mantendo a equivalência de volume. O tratamento dos subgrupos controle foi realizado com 1 (N=6), 2 (N=10), 3 (N=5) ou 5 (N=17) doses de solução salina intravenosa, em dias consecutivos.

O sulfato de vincristina (Tecnocris®, Eurofarma/Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, São Paulo-SP), cujo peso molecular é 824,9 g/mol, foi administrado em 49 animais, esta foi diluída em salina normal (0,9% NaCl) imediatamente antes da administração para obter uma concentração final entre 50 e 150 µg/ml, dependendo do peso animal e assegurando-se que o volume injetado na veia da cauda fosse menor que 1 ml. Esta droga

foi reconstituída em solução salina (0,9% NaCl) em uma concentração maior e posteriormente diluída em salina para concentrações menores. A vincristina foi administrada por via intravenosa na veia da cauda nas doses de 50, 100 ou 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a cada dois dias. Os ratos submetidos ao tratamento crônico com vincristina foram divididos em sete subgrupos. Um subgrupo (N=5) recebeu 5 doses de vincristina 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (total de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$), quatro outros subgrupos receberam 2 (N=6), 3 (N=6), 4 (N=5) ou 5 (N=9) doses de vincristina 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (200-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e 3 demais subgrupos 1 (N=5), 2 (N=6) e 5 (N=7) doses de vincristina 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (150-750 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Figura 4 B).

Os subgrupos controle para a vincristina, formados por um total de 34 animais, receberam volume de salina de acordo com o peso dos ratos, mantendo a equivalência de volume. O tratamento dos subgrupos controle foi realizado com 1 (N=6), 2 (N=8), 3 (N=5), 4 (N=5) ou 5 (N=5) doses de solução salina intravenosa, a cada dois dias.

A fim de estudar o efeito residual do tratamento intravenoso com cisplatina ou vincristina sobre o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos, peso colônico foram administradas 5 doses de cisplatina 1 mg/kg intravenosa em dias consecutivos em 13 ratos e 5 doses de vincristina 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intravenosa a cada dois dias em outro grupo com 12 ratos. Os animais submetidos ao tratamento com estes quimioterápicos foram divididos em quatro subgrupos. Dois subgrupos com 10 animais ao todo, um tratado com cisplatina e o outro com vincristina foram mantidos vivos durante uma semana e depois submetidos ao estudo do EG e do TI de líquidos. Outros dois subgrupos com 15 animais ao todo foram mantidos vivos durante duas semanas até serem submetidos ao mesmo estudo depois deste período (Figura 5).

Os subgrupos controles, formados por um total de 24 animais, um subgrupo recebeu 5 doses de salina intravenosa a cada dois dias, o outro subgrupo recebeu 5 doses de salina intravenosa em dias consecutivos, com o volume de acordo com o peso dos ratos. Doze animais foram sacrificados uma semana após e os outros doze animais somente duas semanas após a última dose de salina, quando foi então realizada a medição do EG e do TI de líquidos.

A toxicidade sistêmica das drogas foi avaliada pela perda de peso, fraqueza motora, alopecia, diarreia e morte do animal.

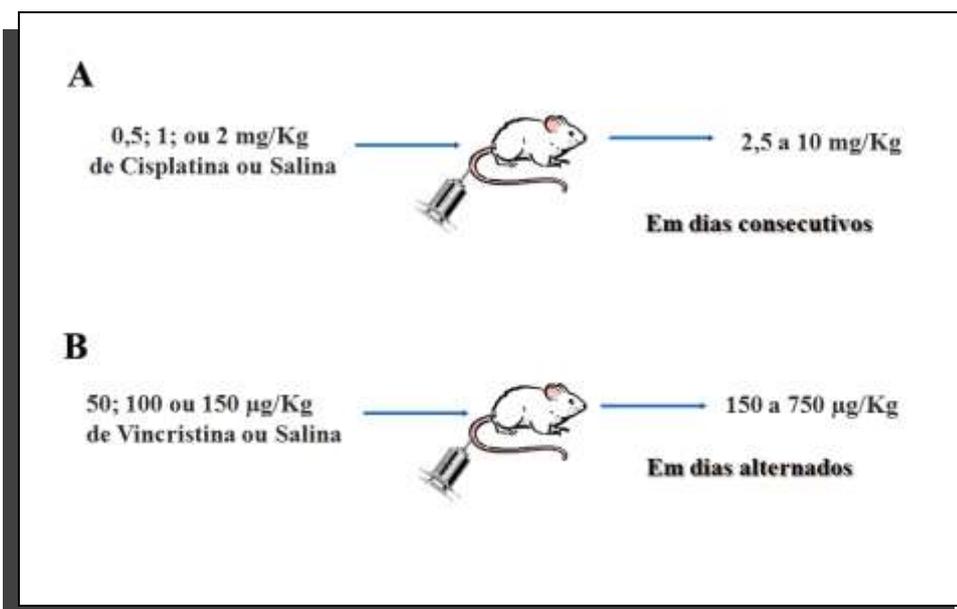


Figura 4. Esquema de dosagem para a administração dos quimioterápicos com a finalidade de estudar o efeito destas drogas sobre a retenção gástrica, trânsito intestinal de líquidos, peso colônico. (A) Esquema de administração da cisplatina. (B) Esquema de administração da vincristina.

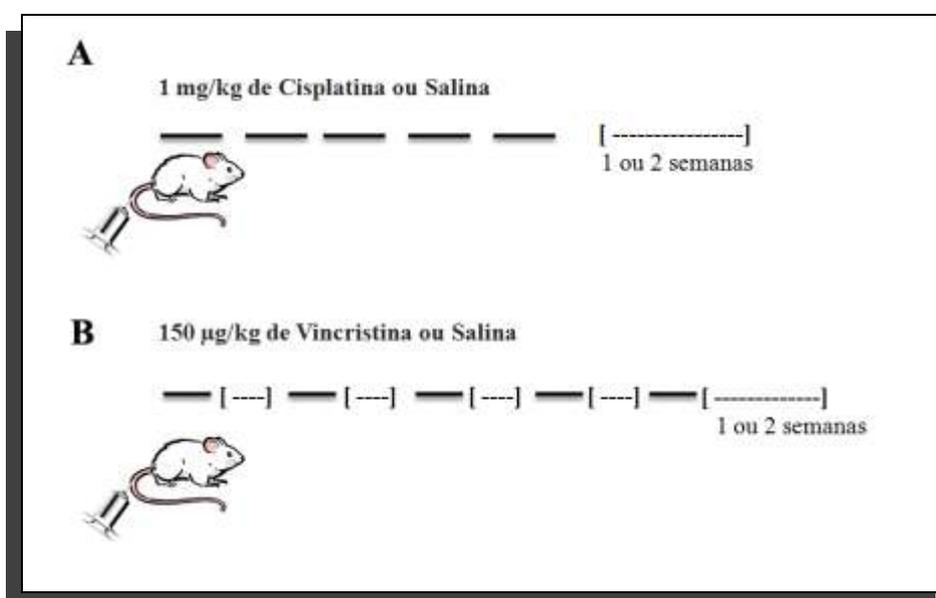


Figura 5. Esquema de dosagem para a administração dos quimioterápicos com a finalidade de estudar o efeito residual sobre o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos, peso colônico. (A) Esquema de administração da cisplatina. (B) Esquema de administração da vincristina.

1.1.2. Estudo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos

A mensuração do EG (Esvaziamento gástrico) e do TI (Trânsito intestinal) de líquidos foi realizada 24 h, uma semana e duas semanas após a última dose do tratamento crônico com cisplatina, vincristina ou salina.

Os subgrupos de animais experimentais e controles permaneceram em jejum durante 16 h, antes da medição do EG e TI, com livre ingestão de água até 2 h antes do procedimento.

Para mensuração do EG e TI, foi usada uma modificação da técnica previamente descrita por Reynell, Spray, 1956. Animais controles e previamente tratados com cisplatina e vincristina, em concentrações anteriormente descritas, foram alimentados por gavagem (1,5 ml) com uma refeição teste contendo um marcador não absorvível (0,5 mg/ml de vermelho fenol em 5% de solução de glucose) e sacrificados 10 min depois por deslocamento cervical.

Após laparotomia, as porções do piloro e cárdia do estômago, bem como íleo terminal foram rapidamente clampeados e removidos. O intestino foi cuidadosamente estirado, ao longo de uma fita métrica, em uma mesa plana e dividido em três segmentos consecutivos: proximal (~40% inicial), medial (~30% intermediário) e distal (~30% final). Cada volume de segmento foi mensurado pela adição de 0,1 N NaOH (100 ml) em uma proveta graduada. Depois eles foram triturados e homogeneizados por 30 s. A suspensão permaneceu por 20 min em temperatura ambiente e então 10ml de sobrenadante foi centrifugada por 10 min (2800 rpm). Proteínas presentes em 5ml do homogeneizado foram precipitadas com 0,5 ml de ácido tricloroacético (20%), e então centrifugado novamente por 20 min a 2800 rpm. Finalmente, a 3 ml do sobrenadante foram adicionados 4 ml de NaOH a 0,5 N.

Todas as amostras foram lidas a 560 nm (Biospectro, SP-22) e expressas em densidade óptica (DO). Em cada experimento, uma curva padrão de diluição foi obtida por meio de plotagem da concentração de vermelho fenol contra a densidade óptica da solução de NaOH a 0,1 N. O coeficiente linear (R^2) da curva de diluição permite determinar a concentração da solução, bem como a quantidade de vermelho fenol recuperada de cada segmento (Figura 6). O valor da fração de corante (%) recuperada em cada segmento intestinal foi expresso de acordo com a seguinte equação:

Retenção segmento X = Volume da víscera x Absorbância da víscera

$$\text{Retenção fracional do segmento X} = \frac{\text{Retenção do segmento X}}{\Sigma \text{ Retenção estômago} + \text{retenção intestino}} \times 100$$

1.1.3. Avaliação do peso colônico

Os cólons dos animais tratados cronicamente com cisplatina ou vincristina intravenosas ou solução salina foram cuidadosamente retirados durante a laparotomia mediana. Estes segmentos foram pesados logo em seguida.

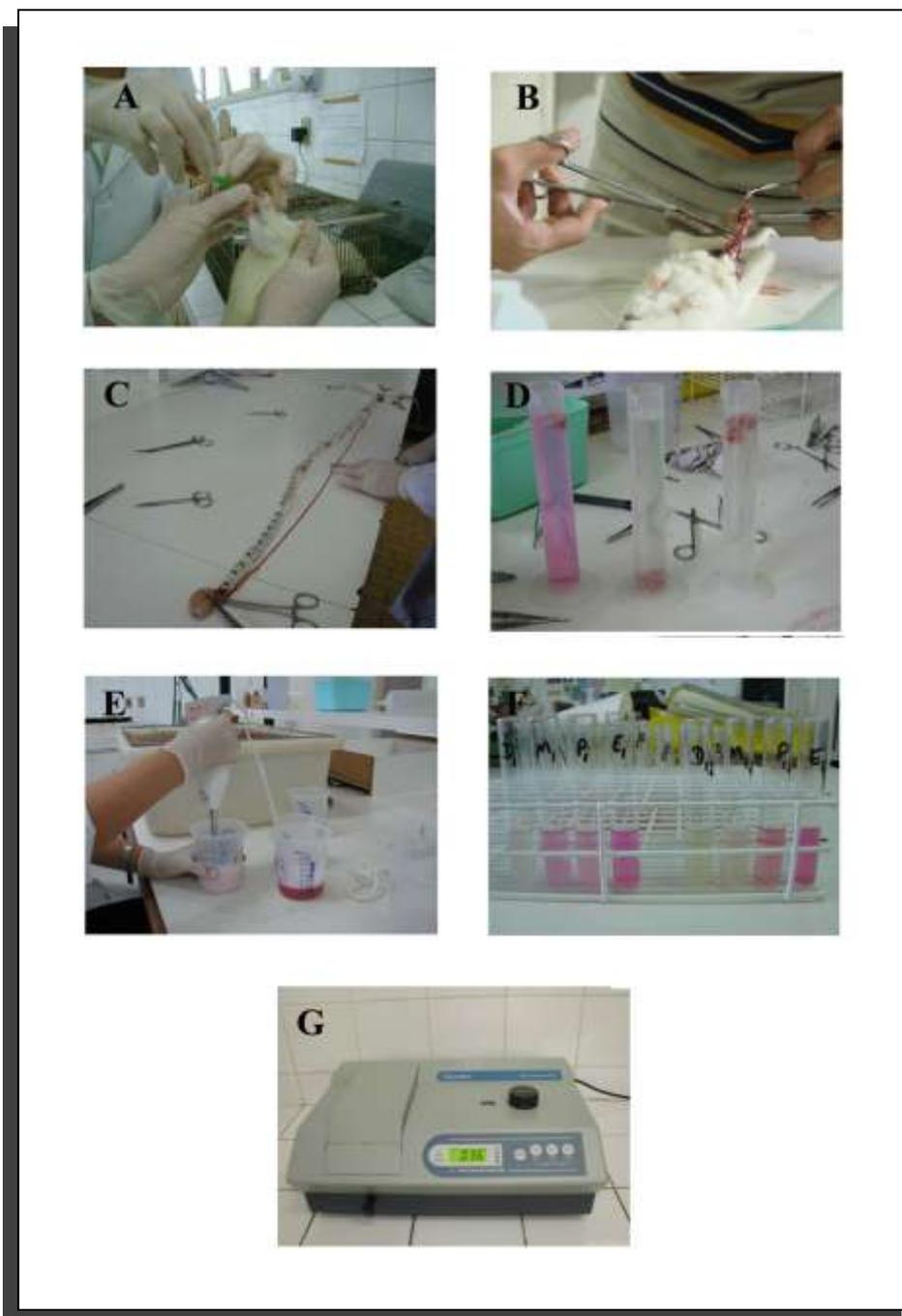


Figura 6. Etapas do estudo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos pela modificação da técnica descrita por Reynell, Spray 1956. (A) Gavagem com vermelho fenol. (B) Laparotomia e clampeamento do piloro e cárdia com remoção do estômago e intestino. (C) Intestino estirado ao longo de uma fita métrica e dividido em três segmentos. (D) Volume dos segmentos mensurados pela adição de 0,1N NaOH em proveta graduada. (E) Tecidos triturados e homogeneizados. (F) Ao sobrenadante centrifugado com proteínas precipitadas foi adicionado 4 ml de NaOH a 0,5N. (G) Leitura da absorbância da víscera para calcular a fração de corante (%) recuperada em cada segmento.

Protocolo 2

2.1. Estudo da inibição farmacológica do sistema nervoso simpático sobre as alterações no esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados induzidas pelo tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

2.1.1. Procedimentos experimentais

Com o intuito de estudar a participação das vias simpáticas sobre o aumento da retenção gástrica de corante induzido pela cisplatina e vincristina, foi realizado o experimento em 19 ratos Wistar, machos, pesando entre 190 e 240 g, mantidos sob ciclo de 12h luz/escuro, recebendo comida e água *ad libitum*.

Foi administrado em um subgrupo 5 doses diárias de 1 mg/kg cisplatina em 5 animais e em outro, 5 doses a cada dois dias de 150 µg/kg sulfato de vincristina em 5 animais, por via intravenosa na veia da cauda.

Os subgrupos controles, formados por um total de 9 animais, receberam volume de salina de acordo com o peso dos ratos, mantendo a equivalência de volume. O tratamento do subgrupo controle para a vincristina foi realizado com 5 doses de solução salina intravenosa, a cada dois dias e do subgrupo controle para a cisplatina, 5 doses de solução salina em dias consecutivos.

Os subgrupos de animais tratados com cisplatina, vincristina ou salina foram submetidos ao bloqueio simpático com sulfato de guanetidina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) diluída em salina, intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg, aplicada uma hora antes do sacrifício para medição do EG e do TI de líquidos.

2.1.2. Estudo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos

Para a medição do EG e do TI de líquidos, foi utilizada uma modificação da técnica descrita por Reynell, Spray, 1956, descrita no protocolo 1.

A mensuração foi realizada 24 h após a última dose do tratamento com cisplatina, vincristina ou salina e uma hora após o bloqueio simpático com guanetidina intraperitoneal.

Os subgrupos de animais experimentais e controles permaneceram em jejum durante 16 h, antes da medição do EG e TI, com livre ingestão de água até duas horas antes do procedimento.

Protocolo 3

3.1. Avaliação hemodinâmica em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

3.1.1. Procedimentos experimentais e cirúrgicos

3.1.1.1. Estudo das respostas barorreflexas

A fim de se evidenciar a presença de neuropatia autonômica induzida pela cisplatina ou vincristina ao nível da regulação das respostas cardiovasculares, foi utilizado o protocolo de Dunlap *et al.*, 1987.

Os experimentos foram realizados em 21 ratos Wistar, machos, pesando entre 190 e 240 g, mantidos sob ciclo de 12h luz/escuro, recebendo comida e água *ad libitum*.

Cisplatina e sulfato de vincristina foram administrados por via intravenosa na veia da cauda, em 5 e 6 animais, diariamente e a cada dois dias, respectivamente. Os ratos submetidos ao tratamento com cisplatina receberam 5 doses de 1 mg/kg e os tratados com vincristina receberam um total de 5 doses de 150 µg/kg.

Os subgrupos controles, formados por um total de 11 animais, receberam volume de salina de acordo com o peso dos ratos, mantendo a equivalência de volume. O tratamento dos subgrupos controles foi realizado com 5 doses de solução salina intravenosa, diariamente (controle cisplatina) ou a cada dois dias (controle vincristina).

No dia de aplicação da quinta dose de quimioterápico ou salina, os animais tratados foram anestesiados com Tribromo etanol a 2% (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA), na dose de 10 ml/kg, i.p., e em seguida submetidos a procedimento cirúrgico de canulação da veia jugular externa esquerda e da artéria carótida direita com cânula de polietileno (PE 50), contendo heparina (500 U/ml). Estas serviram para mensuração da pressão arterial média. Foram colocados também eletrodos subcutâneos nas patas dianteiras e na pata traseira esquerda, para registro do traçado eletrocardiográfico e mensuração da frequência cardíaca. Uma pequena incisão possibilitou a fixação destas cânulas e dos fios de eletrodos na região dorsal do animal, mediante sutura. Estes animais permaneceram em gaiolas individuais até o dia seguinte onde houve a

monitoração da PAM e FC. Após os experimentos para estudo do barorreflexo, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical.

3.1.1.2. Mensuração do volume sanguíneo

Os experimentos foram realizados em 16 ratos Wistar, machos, pesando entre 190 e 240 g, mantidos sob ciclo de 12h luz/escuro, recebendo comida e água *ad libitum*.

Cisplatina e sulfato de vincristina foram administrados, em 4 e 4 animais, e os subgrupos controles formados por um total de 8 animais foram administrados nas doses e via descritas no item anterior.

No dia de aplicação da quinta dose de quimioterápico ou salina, os animais foram anestesiados e em seguida submetidos a procedimento cirúrgico de canulação da veia jugular semelhante ao descrito no item anterior, esta cânula serviu para a administração do azul de Evans.

3.1.2. Estudo das respostas barorreflexas

Foi realizada a mensuração dos níveis de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) através do registro contínuo, durante um período de 40 min com o animal tratado com cisplatina, vincristina ou salina em repouso e livre de estímulos sonoros.

A PAM foi registrada através de transdutores de pressão (P1000B), ligados à cânula na carótida do animal e conectados a um sistema de aquisição digital (PowerLab; AD Instruments, Austrália) (Figura 7).

A FC foi obtida através dos eletrodos subcutâneos, ligados a um sistema de registro do traçado eletrocardiográfico (PowerLab; AD Instruments, Austrália), sendo esta mensurada através dos intervalos R-R.

A média dos valores obtidos nos últimos 5 min do registro foi considerada o valor basal e o barorreflexo foi avaliado através dos testes com fenilefrina e atropina.

3.1.2.1. Teste da fenilefrina

Foi administrada fenilefrina (em salina na concentração de 10 mg/ml, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), na dose de 5 µg/kg, diluída em um volume constante da solução de 0,1 ml, por via intravenosa, na jugular canulada previamente, sendo registrados o pico pressórico e a variação da FC reflexa. Foi registrado então o ganho, dado pela razão entre a variação da FC e a variação da PAM (Cardoso *et al.*, 2005) (Figura 8A).

3.1.2.2. Teste da atropina

Após estabilização dos níveis pressóricos e da frequência cardíaca para obtenção de novos valores basais de PAM e FC, foi administrada o sulfato de atropina (em salina na concentração de 1mg/ml, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), na dose 0,5 mg/kg, diluída em um volume constante da solução de 0,1 ml, por via intravenosa, na jugular canulada previamente, sendo registrada a variação da FC. Foi então avaliada como resposta, a mensuração da variação da FC com o bloqueio parassimpático com atropina (Figura 8B).

O ganho das respostas dos barorreflexos foi calculado comparando animais controle com animais tratados com 5 mg/kg de cisplatina e 750 µg/kg de vincristina, medindo o Δ de PA e FC, e calculando um índice de acordo com o protocolo de Loss *et al.*, 2007.

3.1.3. Mensuração do volume sanguíneo

O volume plasmático (VP) e volume sanguíneo total (VST) foram determinados com adaptação da técnica descrita por Migita *et al.*, 1997, utilizando azul de Evans. Quinhentos microlitros de sangue foram coletados pelo plexo orbital através de capilares de hematócrito heparinizados, antes e após o tratamento com o quimioterápico, estas amostras foram centrifugadas por 3 min para a obtenção dos valores de hematócrito. Após o tratamento foram colhidas amostras antes e depois da administração de corante azul Evans (40mg%) e 50 µl da amostra de plasma foi coletada e diluída 1:20 em solução salina normal. A absorbância foi registrada usando um 4050 UV / Visível espectrofotômetro (LKB Biochrom, Cambridge, UK) a 620 nm (A620) e foi corrigido

primeiro para a presença de hemoglobina em A620 (branco) e, em seguida, para a turbidez A740. Volume plasmático foi determinado pela equação $VP = (Ci \times Vi) / PB$; onde Ci e Vi são a concentração e o volume, respectivamente, do corante Azul de Evans que foi injetado e PB é a concentração plasmática do corante de Azul de Evans. Um fator de correção do plasma (Cp), de 0,96, a taxa de hematócrito venoso total ($Hct \times 0,74$) foram empregados (Migita *et al.*, 1997) para estimar o volume sanguíneo (VS) utilizando a equação, $VS = VP / (1 - (Cp \times Hct \times 0,74))$.

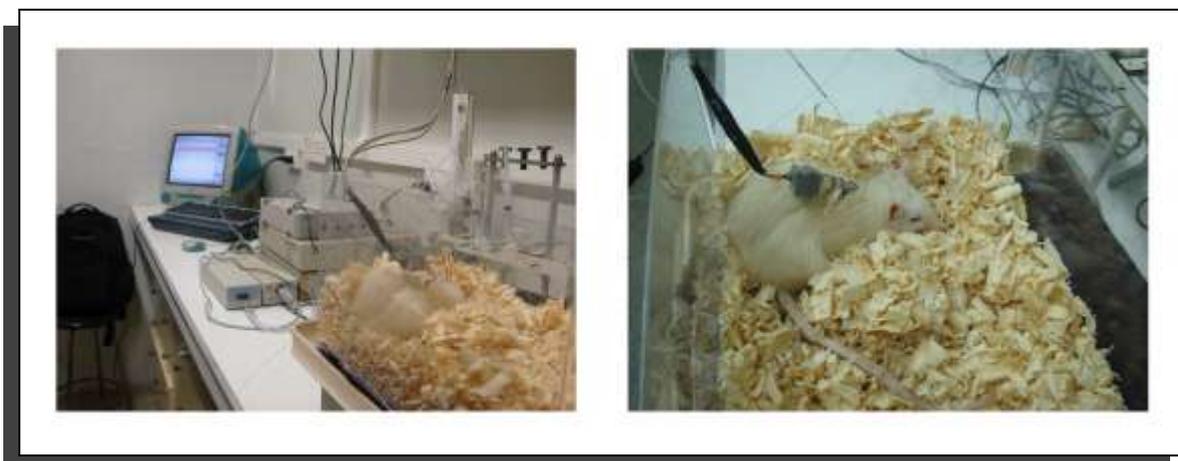


Figura 7. Estudo das respostas barorreflexas através da mensuração dos níveis de pressão arterial média (PAM, mmHg) registrados por transdutores de pressão (P1000B) e frequência cardíaca (FC, bpm) por eletrodos subcutâneos acoplados ao sistema de aquisição digital (PowerLab; AD Instruments, Austrália).

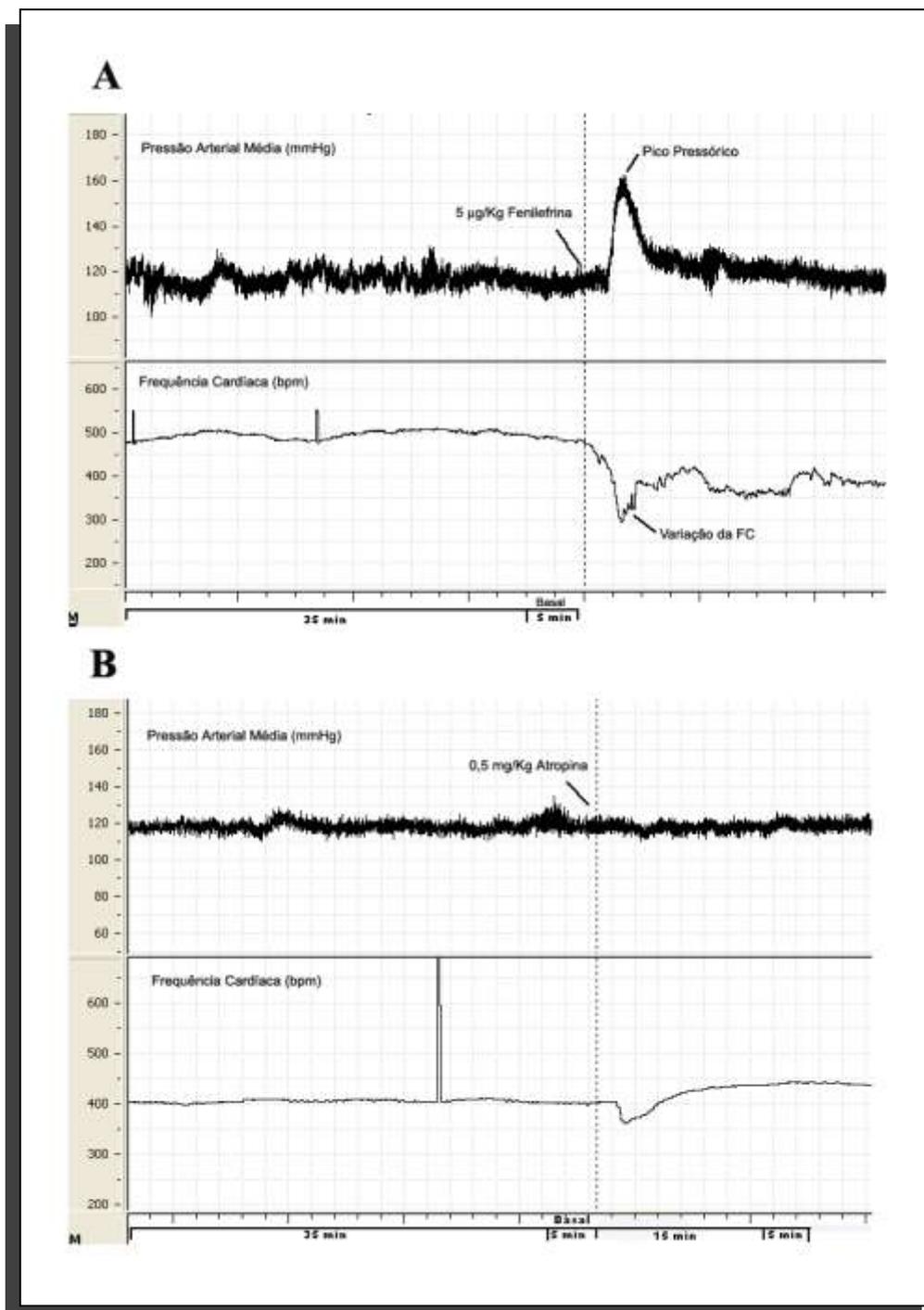


Figura 8. Protocolos para o estudo das respostas barorreflexas utilizando um sistema de aquisição digital (PowerLab; AD Instruments, Austrália). (A) Registro do pico pressórico e da variação da FC reflexa após fenilefrina. (B) Registro da variação da PAM e da FC após bloqueio parassimpático com atropina

Protocolo 4

4.1. Avaliação sensitiva periférica em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

4.1.1. Procedimentos experimentais

Os experimentos foram realizados em 31 ratos Wistar, machos, pesando entre 190 e 240 g.

Cisplatina e sulfato de vincristina foram administrados por via intravenosa na veia da cauda, em 17 e 11 animais, diariamente e a cada dois dias, respectivamente. Os ratos submetidos ao tratamento com cisplatina receberam 5 doses de 1 mg/kg ou de 2 mg/kg (5 mg/kg ou 10 mg/kg) e os tratados com vincristina receberam um total de 5 doses de 100 µg/kg ou 150 µg/kg (500 µg/kg ou 750 µg/kg).

Os subgrupos controles, formados por um total de 10 animais, receberam volume de salina de acordo com o peso dos ratos, mantendo a equivalência de volume. O tratamento dos subgrupos controles foi realizado com 5 doses de solução salina intravenosa, diariamente (controle cisplatina) ou a cada dois dias (controle vincristina).

No presente protocolo, aplicou-se também dois dos modelos de colite mais conhecidos, o modelo da colite por TNBS – ácido 2,4,6-trinitro benzeno sulfônico (Latella *et al*, 2008) e o modelo da colite por óleo de mostarda (Kimball *et al*, 2005). Nestes grupos experimentais os animais foram tratados com quatro doses de 150 µg/kg (dose cumulativa de 600 µg/kg) com esquema e via de administração descrita anteriormente. No dia que seguiu a quarta dose de vincristina foi realizado o teste da placa quente e induzido à colite, seguindo outro teste de placa quente duas horas após esta indução.

4.1.2. Avaliação da nocicepção térmica com teste da placa quente

Utilizou-se o teste da placa quente, de acordo com o protocolo descrito por Eddy, Leimbach, 1953 e modificado por O' Callaghan, Holzman, 1975, para determinar a latência da retirada da pata antes e após a administração de 5 mg/kg e 10 mg/kg de

cisplatina, 500 µg/kg ou 750 µg/kg de vincristina ou salina. Os ratos foram pré-selecionados pela passagem na placa quente mantida a $51 \pm 0,5^\circ$ C e aqueles que mostraram tempo de reação (saltar ou lambe as patas traseiras) superior a 30 s foram descartados. Um tempo de 45 s foi considerado como tempo máximo de reação para prevenir danos nas patas dos animais.

4.1.3. Avaliação da nocicepção mecânica com algesímetro plantar

Foi utilizado um algesímetro dinâmico plantar da Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, baseado no princípio dos filamentos de Von Frey (El Maarouf *et al.*, 2005). Os ratos foram colocados em caixas de acrílico acima de um piso de malha que permitiu o acesso às patas. Aclimação e comportamento exploratório foram observados por até uma hora até o rato se acalmar. O avaliador, em seguida, colocou o filamento metálico de estimulação calibrado (diâmetro de 0,7 mm), sob cada pata traseira do animal. O filamento toca a superfície plantar e exerce uma força vertical contínua de 0 a 1 g durante um intervalo de 10 s até que o rato retire a pata e ative um sinal de parada. O instrumento automaticamente registra o limiar de intensidade do peso em gramas quando a pata foi retirada. Cada pata traseira foi testada alternadamente, com um intervalo de 5 min, para a realização de três medidas. O movimento da pata associado à locomoção ou ao deslocamento do peso não foi contado como resposta de retirada. O limiar de retirada da pata foi avaliado pela média de três medidas de ambas as patas traseiras de cada rato, sendo registrado como média \pm EPM.

4.1.4. Protocolo de indução da colite com TNBS

Para avaliar a influência da neuropatia periférica sensitiva induzida por vincristina nas alterações sensitivas evocadas por modelos de colite experimental (TNBS e OM) foi realizado este protocolo.

Os animais permaneceram inicialmente em jejum por 12 h e os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo de Latella *et al.*, 2008. Os animais foram anestesiados com éter, tendo sido uma hora antes do procedimento submetidos a uma lavagem retal com 20 ml de salina através de um cateter introduzido até 8 cm da margem anal (Figura 9). Foi aplicado então 30 mg de TNBS (ácido 2,4,6-trinitro benzeno

sulfônico, Sigma- Aldrich-Brasil) diluído em uma solução de 50% etanol, com um volume total de 0,8 ml por animal. Os animais foram mantidos suspensos pela cauda por 30 s para impedir o refluxo da solução. Os animais no grupo controle foram submetidos a uma infusão transretal com 0,8 ml de água.

4.1.5. Protocolo de indução da colite com óleo de mostarda

Para indução da colite os animais permaneceram inicialmente em jejum por 12 h e os procedimentos foram realizados de acordo com adaptação do protocolo de Kimball *et al*, 2005. Os animais foram anestesiados com éter, uma hora antes do procedimento foram submetidos a uma lavagem retal com 20 ml de salina através de um cateter introduzido até 8 cm da margem anal. Foi aplicado então 1% de óleo de mostarda (alil isocianato; Sigma- Aldrich-Brasil) diluído em uma solução de 30% de etanol, com um volume total de 0,8 ml por animal. Os animais foram mantidos suspensos pela cauda por 30 s para impedir que houvesse refluxo da solução. Os animais no grupo controle foram submetidos a uma infusão transretal com 0,8 ml de água.

4.1.6. Avaliação macroscópica do colon

Os segmentos coloretais foram avaliados pela aplicação dos escores de inflamação descritos por Morris *et al.*, 1989, por dois observadores:

- (0) Aparência normal.
- (1) Hiperemia focal, mas sem úlcera.
- (2) Ulceração sem hiperemia ou espessamento intestinal.
- (3) Ulceração com inflamação em um local.
- (4) Ulceração/inflamação em dois ou mais locais.
- (5) Principal lesão estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon.
- (6-10) Quando a principal lesão estende por mais de 2 cm ao longo do cólon, um escore é adicionado para cada centímetro adicional.

4.1.7. Avaliação microscópica do colon

Os fragmentos do cólon foram extraídos durante o sacrifício do animal para caracterização histológica da colite experimental. Os fragmentos foram submetidos à rotina histológica e coloração com hematoxilina e eosina, sendo às lâminas analisadas de forma cega, segundo escores de microscopia (0-11), de acordo com os seguintes critérios (Appleyard, Wallace, 1995):

- Perda da arquitetura da mucosa (0-3)
- Infiltração celular (0-3)
- Espessamento muscular (0-3)
- Formação de abscesso nas criptas (0-1)
- Depleção de células globet (0-1).

4.1.8. Avaliação do peso colônico

Os segmentos de colon foram pesados como descrito no protocolo 1.

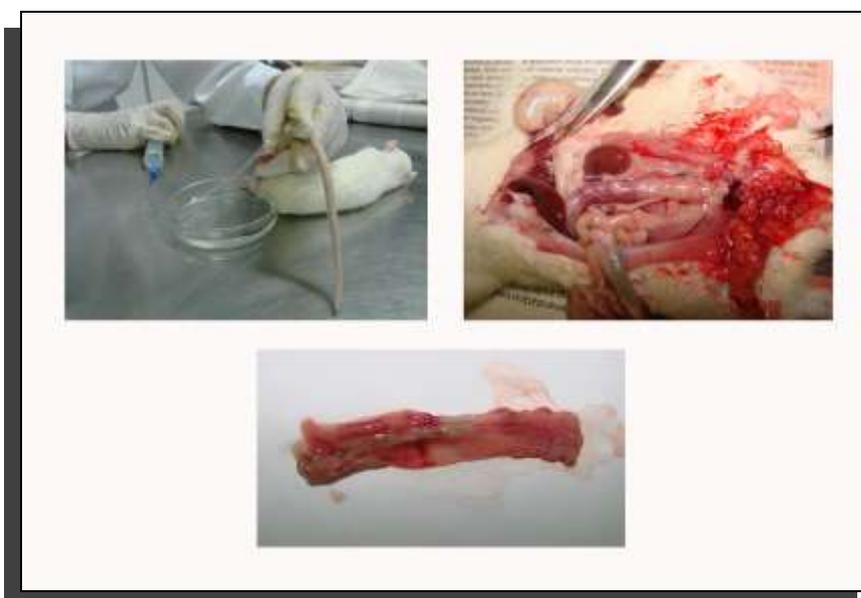


Figura 9. Protocolo de indução da colite (Latella *et al*, 2008). (A) Introdução de cateter até 8 cm da margem anal para a indução da colite com TNBS ou óleo de mostarda diluídos em etanol. (B) Laparotomia para a remoção do colon. (C) Avaliação macroscópica do tecido colônico (Escore de Morris).

Protocolo 5

5.1. Registros eletrofisiológicos de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina.

5.1.1. Procedimentos experimentais

Os experimentos foram realizados em 10 ratos Wistar, machos, pesando entre 200 e 350 g.

Cinco ratos submetidos ao tratamento com cisplatina, receberam 1 mg/kg por via intravenosa, na veia da cauda, diariamente (dose cumulativa de 5 mg/kg). O subgrupo controle, formado por um total de cinco animais, recebeu volume de salina de acordo com o peso dos ratos, mantendo a equivalência de volume. O tratamento do subgrupo controle foi realizado com 5 doses de solução salina intravenosa, diariamente.

5.1.2. Remoção do gânglio cervical superior (GCS)

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral e em seguida pesados. A dissecação cirúrgica foi realizada através de uma incisão longitudinal da pele na face ventral do pescoço, seguida da remoção das glândulas, músculos e tecido adiposo para a localização da traquéia e do ramo da artéria carótida que irriga o pescoço e a cabeça, pois estas estruturas servem como referencia para a localização dos gânglios cervicais superiores (GCS). Os GCS são relativamente discretos em ratos, podendo ser identificados para sua dissecação e estão posicionados na região onde a artéria carótida inicia sua bifurcação. Tanto o gânglio direito como o esquerdo foram rapidamente retirados e depositados em uma placa de Petri contendo solução Locke para a eliminação de tecidos anexos e da cápsula de tecido conjuntivo que o reveste. Os gânglios foram utilizados em experimentos no mesmo dia ou permaneceram sob refrigeração (~4°C) por um período inferior a 24h. Não se observou alteração nos parâmetros eletrofisiológicos com a manutenção do tecido nessas condições (seja ele utilizado prontamente ou após 24h de sua dissecação).

Foi utilizada como solução nutritiva do tecido, a solução de Locke com a seguinte composição (mM): NaCl 136; KCl 5,0; MgCl₂ 0,98; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 11,9; CaCl₂ 2,0; glicose 5,0; pH 7,4. Todos os experimentos foram realizados sob temperatura controlada entre 18 e 22°C.

5.1.3. Registro eletrofisiológico dos neurônios do gânglio cervical superior

Após os procedimentos de remoção do GCS, o tecido foi transferido para uma câmara de acrílico com fundo Silgard®, especialmente projetada para permitir a superfusão desse tecido. Sua fixação ao fundo da câmara foi possível com o emprego de microalfinetes inoxidáveis, tomando o cuidado de prendê-lo pelas extensões pré e pós-ganglionar. Para evitar que o gânglio fosse empurrado pelo microeletrodo durante o impalamento das células, microalfinetes foram colocados nas laterais do tecido, não o perfurando, mas atuando como um esbarro.

A superfusão do tecido foi realizada por meio de fluxo por gravidade, ajustado entre 1 e 1,5 ml/min, com solução de Locke. Para minimizar os efeitos de capacitância do eletrodo, o nível de líquido da câmara foi controlado na menor altura possível acima da superfície do gânglio.

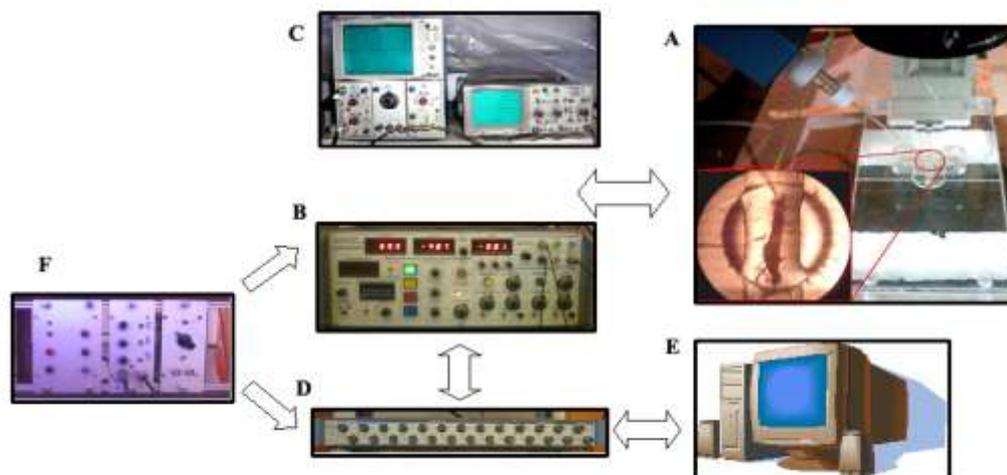
Para a fixação do GCS e observação dos procedimentos de impalamento, a câmara foi montada em uma lupa (modelo COLLEGE STEREO, MLW Intermed, Schöneiche, Alemanha), com ampliação máxima de 40×. Em particular, a ampliação de 20× foi suficiente para a execução desses procedimentos. A movimentação do microeletrodo, bem como o impalamento das células, foi feita com um micromanipulador hidráulico (modelo MWO-3, Narishige International Inc., Long Island, NY, EUA).

As soluções para a superfusão foram colocadas em frascos Mariote e conectadas à câmara por meio de cânulas e válvulas three-way, que permitiram a troca de soluções com rapidez e sem descontinuidade de fluxo. As montagens das conexões e frascos foram otimizados de forma a reduzir as distâncias entre os locais onde estavam as soluções e a câmara, com o intuito de diminuir o lapso de tempo entre a abertura da válvula e o início da exposição do tecido às outras soluções.

Para a retirada de líquido da câmara foi utilizada uma bomba de infusão, com uma de suas extremidades conectada a um tubo estreito (para agir como um sugador de líquido) e a outra a um depósito de descarte de solução. Essa montagem foi instalada fora do local onde estava a câmara, para evitar a vibração do sistema. Por fim, a solução que fica na câmara considerada como meio extracelular foi aterrada e, portanto, atribuído valor do potencial igual a zero.

Os registros eletrofisiológicos foram feitos utilizando a técnica do microeletrodo intracelular, no modo de clampeamento de corrente (current clamp). Neste modo há a fixação do valor da corrente a ser injetada por essa técnica de forma a medir as variações de potencial advindo do sistema. Os potenciais transmembrana foram obtidos através do uso de microeletrodos confeccionados com vidro do tipo borossilicato (diâmetro externo e interno 1,0 e 0,5 mm, respectivamente), apresentando resistências na faixa de 40 a 90M Ω . Foi utilizado um puxador de micropipetas (modelo P-97, Sutter Instrument, Novato, CA, EUA), para a preparação desses microeletrodos e, como etapa posterior, o preenchimento de sua cavidade interna com uma solução de 95% de potássio 3M e 5% de citrato de potássio. Para a conversão de corrente iônica em corrente elétrica, essa solução é posta em contato com um fio de prata, revestido com uma fina camada de cloreto de prata, ao qual está conectado a um eletrômero (modelo AXOCLAMP 2B, Axon Instruments, Foster City, CA, EUA). Este eletrômero possui algumas saídas para o monitoramento dos sinais, onde foram conectados osciloscópios: um para o monitoramento do V_m e da corrente injetada (modelo 5111A, TEKTRONIX, Beaverton, OR, EUA) e outro para monitoramento da carga e descarga do microeletrodo (modelo HM303-6, HAMEG Instruments, Mainhausen, Alemanha). A aquisição dos registros eletrofisiológicos foi feita através do uso de uma interface A/D (modelo DIGIDATA 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, EUA) controlada por um software (CLAMPEX, versão 6.0) e os dados armazenados em computador (Figura 10).

Figura 10. Montagem do aparato experimental necessário para o registro dos parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios do gânglio cervical superior.



O gânglio é fixado no fundo de uma câmara de acrílico com Sylgard® (A) e os dados dos parâmetros eletrofisiológicos são enviados para um eletrômetro (B). Este eletrômetro possui saídas para o monitoramento dos sinais, onde foram conectados osciloscópios (C). A aquisição dos registros eletrofisiológicos foi feita através do uso de uma interface analógico/digital (D) controlada por um software e os dados armazenados em computador (E). Um gerador de sinais (F) foi acoplado ao sistema para determinar a frequência com a qual os dados eram gerados e coletados.

Após o impalamento de uma célula, o V_m foi considerado como sendo a deflexão máxima de voltagem medida entre o valor do potencial na ponta do eletrodo e o valor do potencial no meio extracelular (potencial nulo, conforme citado anteriormente). Devido à diferença de mobilidade entre os íons potássio e cloreto, freqüentemente havia a formação de um potencial de ponta no eletrodo de forma que, nas análises, subtraiu-se do valor do potencial medido o valor do potencial de ponta estabelecido. O valor desse potencial de ponta era verificado após a retirada do microeletrodo da célula. Os sinais foram registrados ora pelo modo Bridge (com freqüência de corte de 30 kHz), ora pelo modo descontínuo de clampeamento de corrente (do inglês Discontinuous Current Clamp (DCC), freqüência de amostragem de 1-2 kHz e freqüência de corte de 3 kHz), pois o confronto dos dados desses dois modos permite uma análise mais fidedigna dos parâmetros eletrofisiológicos.

Para este estudo foram utilizados três protocolos experimentais com características distintas, mas apresentando pontos em comum. Para os três protocolos foi utilizado tanto o modo Bridge como o modo DCC e o tempo entre os episódios (sweeps) eram de 1s (freqüência de 1 Hz). No primeiro protocolo a duração total do episódio foi de 570 ms, com freqüência de amostragem de 20 kHz. A janela de pulso de corrente (tempo no qual havia a injeção de corrente no sistema) tinha duração de 100 ms aproximadamente e amplitude variando de -200 a +200 pA (Figura 11A). Esse protocolo foi utilizado para mostrar com maior clareza algumas propriedades do PA. No segundo protocolo a janela de pulso de corrente tinha, duração de 5 ms aproximadamente e amplitude de 500 pA para observar a hiperpolarização após o potencial de ação (Figura 11B). E o terceiro protocolo tinha, aproximadamente, a duração de 500 ms e amplitude de variando de 0 a 1100 pA para evocar potenciais seguidos (Figura 11C).

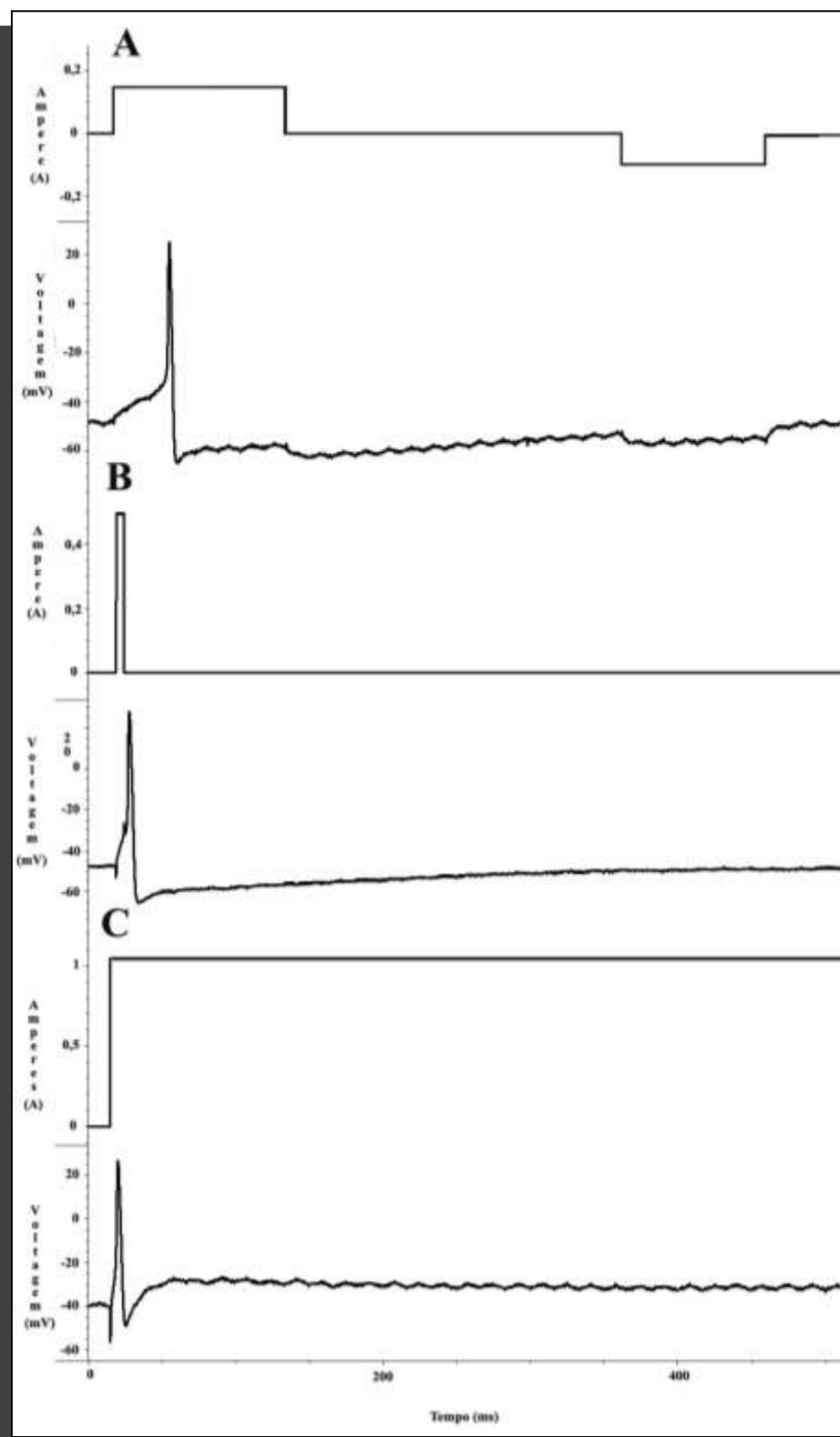


Figura 11. Protocolos experimentais para estudar os parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios do gânglio cervical superior. (A) Protocolo para observação das propriedades do PA (B) Protocolo para observar a hiperpolarização e (C) Protocolo para evocar potenciais seguidos.

5.1.4. Análise dos dados

A análise dos dados foi feita com os softwares Clampfit® (versão 8.1.0.12, Axon Instruments) e Sigmaplot® (versão 9.01, Systat Software). As células foram consideradas significativas quando, ao final do período de estabilização (2,5 a 5 min), o potencial de repouso apresentasse valor mais negativo que -40 mV e resistência de entrada da membrana superior a 30 MΩ. Os resultados estão representados no formato média ± erro padrão da média, onde a variável n representa o número de experimentos feitos.

Os parâmetros eletrofisiológicos estudados neste trabalho foram as propriedades passivas da membrana plasmática: potencial de repouso celular, a resistência de entrada da membrana celular e o limiar de excitabilidade da célula; as propriedades do potencial de ação (PA): amplitude, a inclinação máxima da voltagem em relação ao tempo ($dv/dt_{\text{máx}}$) do ramo ascendente e descendente e a duração; a amplitude e duração da hiperpolarização após o potencial e o comportamento tônico ou fásico dos neurônios. Como já citado, o potencial de repouso foi determinado como sendo uma deflexão estável do V_m após o período de estabilização da célula (Figura 12 A). A resistência de membrana foi determinada pela lei de ohm, $V=R \cdot i$, onde V representa a diferença de voltagem entre o valor máximo alcançado do potencial transmembrana devido à injeção de uma corrente e o potencial de repouso (Figura 12 B). As inclinações máximas dos ramos ascendente e descendente foram determinadas pela razão entre a variação da voltagem de dois pontos próximos e a variação de tempo entre esses dois pontos. Por fim, a amplitude (Figura 12 C) e a duração do PA que foi determinada como o intervalo de tempo quando o potencial de ação, no ramo ascendente e descendente, alcança 50% do valor de sua amplitude (Figura 12 D).

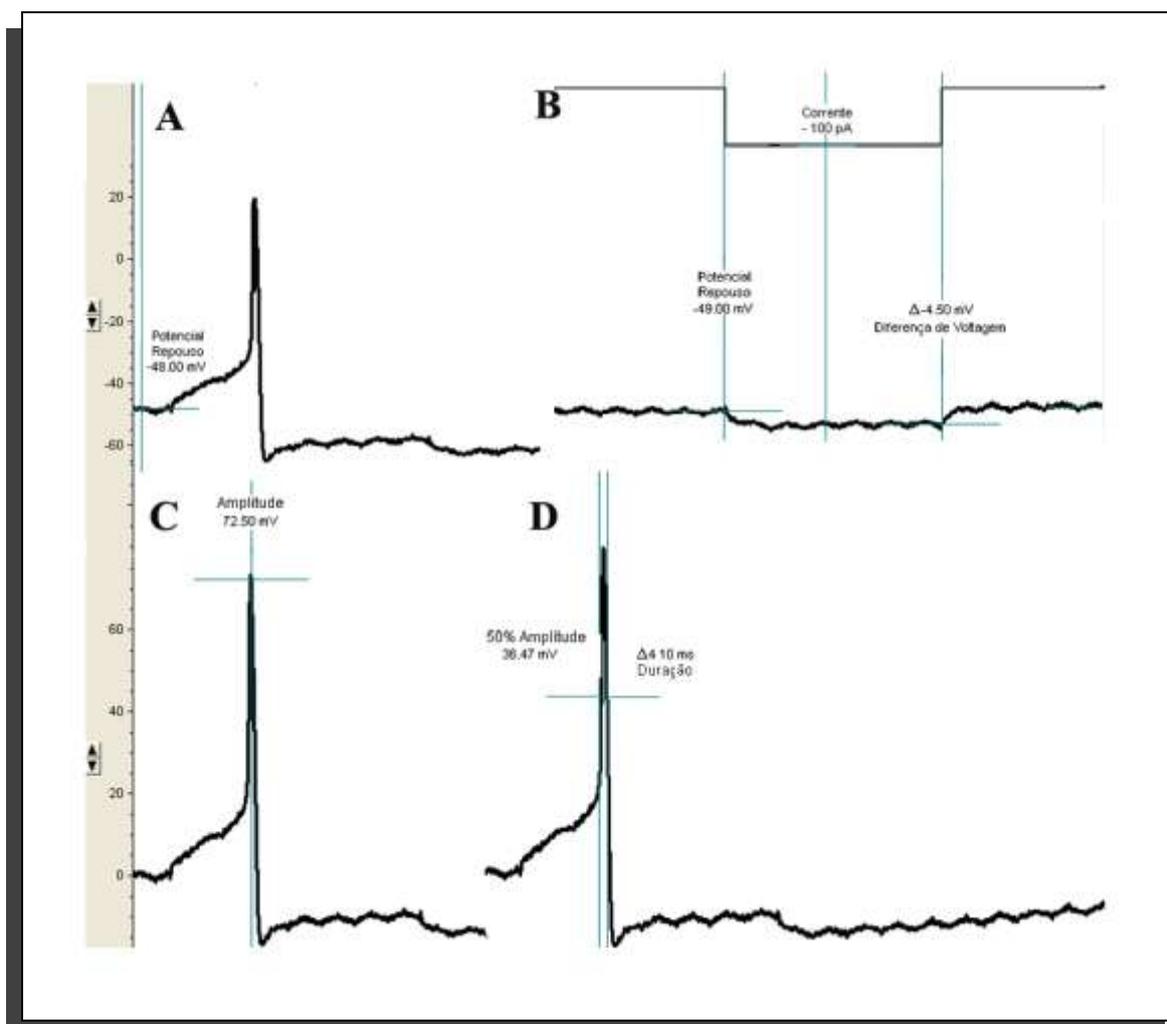


Figura 12. Parâmetros eletrofisiológicos avaliados no potencial de ação dos neurônios do gânglio cervical superior. (A) Potencial de repouso. (B) Resistência de membrana. (C) Amplitude do potencial de ação. (D) Duração do potencial de ação.

Protocolo 6

6.1. Avaliação morfológica de amostras de tecidos de ratos submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina.

6.1.1. Procedimentos experimentais e cirúrgicos

Os experimentos foram realizados em 8 ratos Wistar, machos, pesando entre 200 e 350 g.

Quatro ratos submetidos ao tratamento com cisplatina, receberam 2 mg/kg por via intravenosa, na veia da cauda, diariamente (dose cumulativa de 10 mg/kg). O subgrupo controle, formado por um total de quatro animais, recebeu volume de salina de acordo com o peso dos ratos, mantendo a equivalência de volume. O tratamento do subgrupo controle foi realizado com 5 doses de solução salina intravenosa, diariamente.

Os ratos, tratados ou não previamente com 10 mg/kg de cisplatina foram anestesiados com uretana (1,5 g/kg, i.p.) para perfusão com solução fixadora transcardialmente contendo aldeídos (4% paraformaldeído e glutaraldeído 2,5% em 0,1 M tampão fosfato, pH 7,4).

Após a fixação dos tecidos foram realizados procedimentos para a retirada dos mesmos.

Os nervos isquiáticos esquerdo foram expostos e a porção média dos nervos dissecadas com o auxílio de pinças cirúrgicas.

A cirurgia de isolamento dos nervos vago foi realizada em duas etapas, a saber:

- Etapa macroscópica: após a anestesia, foi realizada uma incisão na região ventral do pescoço, com o auxílio de pinças cirúrgicas e cotonetes de algodão, se procedeu à técnica de dissecação para expor o feixe vículo-nervoso.

- Etapa microscópica: com o auxílio de uma lupa cirúrgica, foi identificado o feixe vículo-nervoso. Utilizando pinças oftálmicas especiais para microcirurgia, foi feita a microdissecação. Identificado o nervo vago foi realizado o isolamento do mesmo.

Os GCS foram removidos como descrito no item 6.1.2 e os GRD removidos após incisão dorsal e exposição da região lateral da coluna vertebral onde se encontram os nervos e estes gânglios, retirados com o auxílio de pinças cirúrgicas e em seguida, com o auxílio de uma lupa cirúrgica, foram removidos o excesso de tecido conjuntivo.

Após laparotomia abdominal amostras do estômago e intestinos foram dissecadas com o auxílio de pinças cirúrgicas.

6.1.2. Microscopia óptica e eletrônica

6.1.2.1. Tecidos Nervosos

Após a perfusão, os segmentos nervosos foram excisados e imersos em uma solução de glutaraldeído (2% de glutaraldeído em 0,1 M tampão cacodilato, pH 7,4) por 2 h seguido de 1% de tetróxido de ósmio com 0,8% de ferricianeto de potássio e CaCl_2 em 0,1 M de tampão cacodilato, pH 7,4 por 1 h. Os nervos e gânglios de animais tratados com cisplatina e controle foram posteriormente desidratados em soluções de concentrações crescentes de acetona e embebidas em resina 812 PolyBed. Cortes semifinos transversais (500 nm) dos nervos isquiáticos e vagos foram obtidas para estudos de microscopia de luz, e corados com azul de toluidina. Cortes ultrafinos transversais (60-70 nm) dos gânglios nervosos foram corados com citrato de chumbo e contrastadas em acetato de uranila para análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Estes procedimentos foram realizados de acordo com Prinz *et al.*, 2005. Cortes ultrafinos foram examinados sob um microscópio eletrônico Zeiss EM- 900 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Cortes semifinos de tecidos foram fotografados com um microscópio de luz Olympus BX 50 (Olympus, Japan) acoplado a uma câmera (Leica DC 300F) e software Leica Image 50 (IM50) e depois analisados morfometricamente (Image Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Carlsbad, CA, EUA).

Mensurações morfológicas: Antes de obter as mensurações o sistema foi calibrado com uma imagem digitalizada de uma régua micrométrica com um comprimento total de 1 mm e graduações de 10 μm de largura. Para calibrar o Pro Image Plus Software, foram utilizados os comandos de Medida/Calibração/Espacial.

As imagens digitalizadas dos nervos isquiático e vago foram exibidas em um monitor de vídeo de alta resolução e observação qualitativa inicial foi realizada. Nessas observações, foram identificadas várias estruturas associadas com o tecido epineural, tais como tecido adiposo e vasos sanguíneos. Embora estes tecidos sejam apresentados na Figura 13 A, não foram avaliados qualitativamente ou quantitativamente, já que apenas os nervos foram medidos. Três quadrantes, denominadas áreas de interesse (AOIs) medindo cada uma 70 μm^2 foram sobrepostos em cada imagem obtida. Estes três AOIs foram organizadas de acordo

com um padrão em que dois AOIs foram colocados eqüidistante de um AOI central (Figura 13 D). As fibras mielinizadas localizadas dentro deste quadrado ou que cruzaram com a borda superior e/ou esquerda da AOI foram contadas, as fibras que cruzaram com a borda inferior e/ou direita da AOI não foram contadas (Figura 13 B).

O número total de fibras mielinizadas contadas é o número total de fibras contadas em todos os AOIs que foram colocados sobre as imagens das seções em cada nervo. Para criar e salvar um AOI apropriado na Image Pro Plus Software, foi selecionado o comando novo AOI. As medidas foram tomadas para dimensões lineares das áreas transversais (áreas da bainha de mielina e axônios) (Figura 13 C) e contagem de número de axônios no centro e regiões marginais do nervo. Todas as avaliações morfométricas foram repetidas por pelo menos três ensaios consecutivos sendo calculada a média.

6.1.2.2. Tecidos Musculares

Imediatamente após a dissecação, as amostras dos tecidos musculares do TGI foram fixadas por 24 h em solução de formol a 10% tamponado e em seguida armazenadas em álcool a 70% para que estivessem preparadas para o exame histológico e microscópico. As amostras dos tecidos do TGI foram fixadas em parafina, cortadas a 4 mm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina antes do exame microscópico.

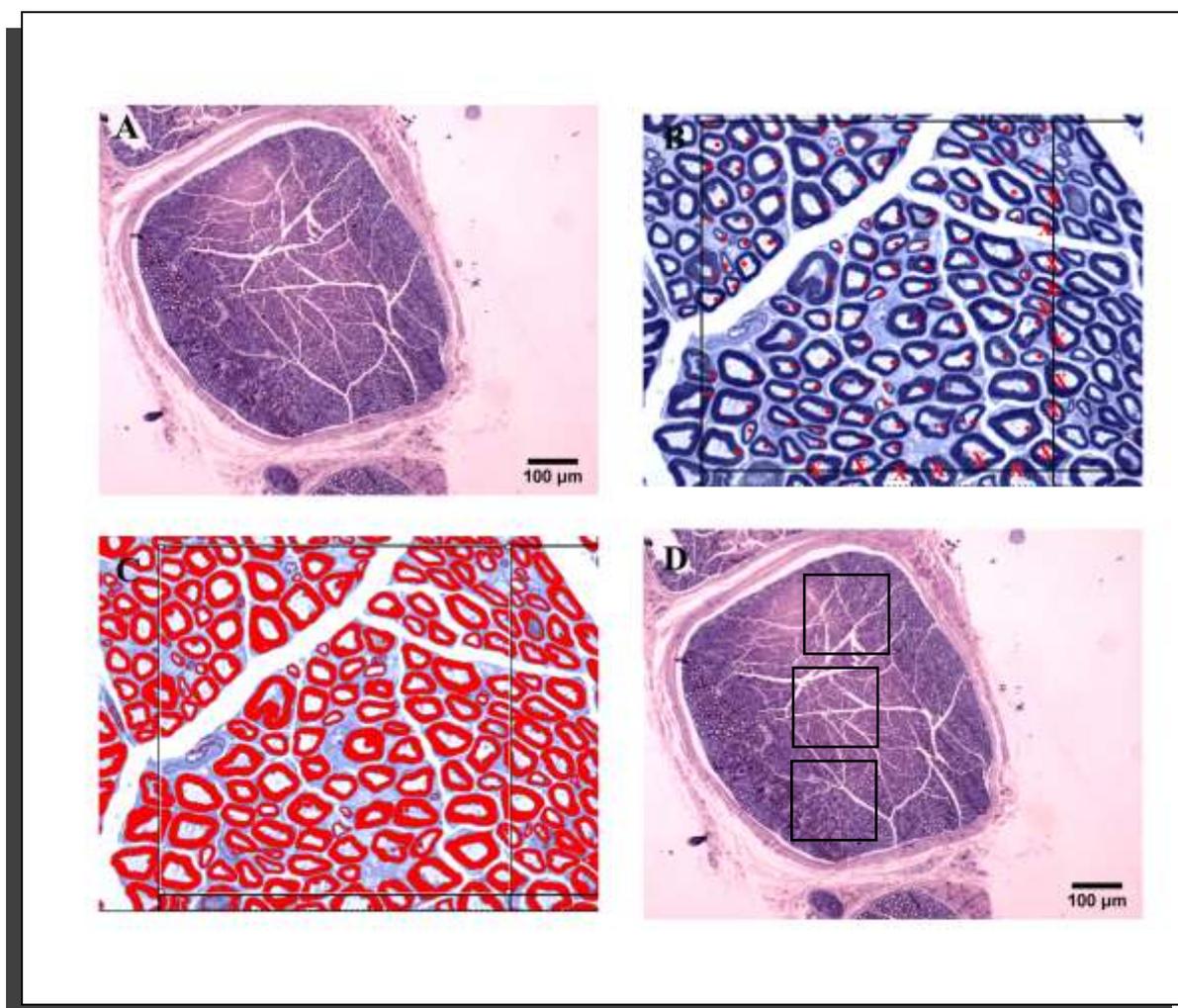


Figura 13. Mensurações morfométricas do nervo isquiático de rato utilizando o software Image Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Carlsbad, CA, EUA. (A) Imagem da área perineural com tecido epineural e vasos sanguíneos. (B) Representação de um dos campos (AOIs), medindo $70 \mu\text{m}^2$, utilizados no estudo para avaliar a densidade e o número total de fibras mielínicas. As fibras localizadas no interior deste quadrado ou cruzaram pela borda superior e/ou esquerdo da AOI foram contados (●), as fibras se cruzaram pela borda inferior e/ou direito da AOI foram não contabilizados (X). (C) Representação de um dos campos (AOIs) utilizados no estudo para avaliar a quantidade de mielina. (D) Imagem digitalizada mostrando a disposição das três AOIs sobrepondo a imagem do nervo

Resultados

Protocolo 1

1.1. Estudo do esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos e peso colônico em ratos acordados submetidos a tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

1.1.1. Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos e peso colônico em ratos tratados com cisplatina.

O gráfico 1 demonstra que em ratos tratados com 5 doses de 0,5 mg/kg (dose cumulativa de 2,5 mg/kg) de cisplatina intravenosa em dias consecutivos não houve alteração da retenção gástrica quando comparado ao subgrupo controle ($54,4 \pm 3,4\%$, N=5 vs. $46,5 \pm 3,3\%$, N=5) ($p > 0,05$).

Quanto ao estudo do trânsito intestinal de líquidos em animais tratados com 5 doses de 0,5 mg/kg de cisplatina, a recuperação de corante vermelho fenol no intestino delgado proximal, medial e distal foi de $21,3 \pm 3,5\%$ vs. $22,3 \pm 2,6\%$; $16,4 \pm 0,7\%$ vs. $26,7 \pm 4,4\%$; $7,7 \pm 2,1\%$ vs. $4,3 \pm 1,8\%$, respectivamente, não havendo diferença significativa no intestino proximal ($p > 0,05$) e demonstrando diferença estatística no segmento medial e distal ($p < 0,05$) (Gráfico 1).

O gráfico 2 representa a retenção gástrica nos animais tratados com 2 e 3 e 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina intravenosa em dias consecutivos (doses cumulativas de 2, 3 e 5 mg/kg). Não houve diferença significativa na recuperação de corante no estômago para a dose de 2 mg/kg ($45,4 \pm 1,8\%$, N=4), quando comparada ao subgrupo de animais tratados com doses equivalentes de solução salina ($42,9 \pm 1,9\%$, N=5) ($p > 0,05$). Dentre os animais tratados com 3 mg/kg de cisplatina, a média do percentual da retenção gástrica de vermelho fenol foi de $61,7 \pm 3,3\%$, N=6 vs. $48,3 \pm 3,5\%$, N=5, havendo diferença estatística com o grupo controle ($p < 0,05$). Quanto ao trânsito intestinal, na dose de 2 mg/kg de cisplatina não houve diferença na retenção no intestino delgado proximal ($20,4 \pm 1,3\%$ vs. $21,3 \pm 3,4\%$), medial ($25,4 \pm 2,4\%$ vs. $25,5 \pm 3,2\%$) e distal ($8,6 \pm 2,2\%$ vs. $10,2 \pm 3,4\%$) ($p > 0,05$). Na dose

de 3 mg/kg, não houve diferença estatística na retenção de corante no segmento proximal ($17,0 \pm 0,8\%$ vs. $24,1 \pm 1,8\%$) e nos segmentos medial ($14,0 \pm 3,5\%$ vs. $21,5 \pm 2,7\%$) e distal ($7,7 \pm 1,5\%$ vs. $5,9 \pm 1,3\%$).

Nos gráficos 2 e 3 está representada a retenção percentual de corante em animais tratados com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina intravenosa, em dias consecutivos, perfazendo uma dose cumulativa de 5 mg/kg, diferindo da retenção em ratos controle ($63,7 \pm 3,1\%$, N=5 vs. $48,3 \pm 3,5\%$, N=5) ($p < 0,05$). Quanto ao estudo do trânsito intestinal de líquidos, os percentuais de corante nos segmentos proximal ($15,6 \pm 2,1\%$ vs. $24,1 \pm 1,8\%$), medial ($12,05 \pm 1,3\%$ vs. $21,46 \pm 3,7\%$) e distal ($9,6 \pm 4,1\%$ vs. $5,9 \pm 1,3\%$) de delgado não diferiram entre os seus respectivos subgrupos controles ($p > 0,05$) (Gráfico 3).

O gráfico 4 mostra um aumento da retenção de corante no estômago após a administração de 1, 2 e 5 doses de cisplatina 2 mg/kg ($59,7 \pm 4,6$, N=6 vs. $46,0 \pm 2,6$, N=6; $75,4 \pm 3,4$, N=5 vs. $46,9 \pm 3,0$, N=5; $79,9 \pm 3,6$, N=5 vs. $40,9 \pm 3,1$, N=7), respectivamente ($p < 0,05$). Houve uma redução do esvaziamento gástrico após o tratamento com 1, 2 e 5 doses de 2 mg/kg cisplatina intravenosa, em dias consecutivos, totalizando uma dose cumulativa de 2 mg/kg a 10 mg/kg, respectivamente, quando comparada ao tratamento com salina em doses equivalentes ($p < 0,05$).

Após administração de 1 dose de 2 mg/kg de cisplatina intravenosa, a retenção de corante no intestino delgado proximal ($20,8 \pm 2,3\%$ vs. $24,2 \pm 1,9\%$) e distal ($7,3 \pm 1,0\%$ vs. $3,2 \pm 0,5\%$), não diferiu significativamente do controle ($p > 0,05$), enquanto no segmento medial ($12,0 \pm 5,0\%$ vs. $26,5 \pm 3,4\%$), houve diferença estatística ($p < 0,05$). Enquanto isso, o tratamento com 2 doses de 2 mg/kg de cisplatina intravenosa, em dias consecutivos, apresentou diferença de retenção de corante entre o intestino medial e o grupo controle ($4,3 \pm 1,5\%$ vs. $25,1 \pm 3,7\%$), ($p < 0,05$), enquanto nos segmentos proximal ($15,7 \pm 2,3\%$ vs. $24,9 \pm 2,1\%$) e distal ($6,5 \pm 1,4\%$ vs. $2,8 \pm 0,5\%$) não houve diferença com significância estatística ($p > 0,05$).

No subgrupo de animais tratados com a dose cumulativa máxima de 10 mg/kg de cisplatina (Gráficos 4 e 5), dividida em 5 doses de 2 mg/kg e administradas em dias consecutivos, também houve maior recuperação do corante no estômago ($79,9 \pm 3,6\%$, N=7), enquanto que no subgrupo controle esta foi significativamente inferior $40,9 \pm 3,1\%$, N=7 ($p < 0,05$). Não houve diferença no percentual de corante recuperado no segmento intestinal distal ($2,5 \pm 0,7\%$ vs. $3,3 \pm 0,4\%$) entre os dois subgrupos ($p > 0,05$). Entretanto, nos segmentos intestinais proximal ($13,0 \pm 3,1$ vs. $25,2 \pm 2,6$) e medial ($4,4 \pm 1,1\%$ vs. $30,3 \pm$

2,2%) a recuperação do vermelho fenol foi bem inferior nos animais tratados com cisplatina, frente à encontrada no subgrupo controle ($p < 0,05$) (Gráfico 5).

A figura 14 ilustra o aspecto macroscópico do estômago de ratos submetidos ao tratamento crônico com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina e solução salina, após 18 h de jejum e administração da refeição teste (vermelho fenol). Mostrando retenção de grande quantidade de alimento e corante no estômago do animal tratado com cisplatina.

A análise de regressão linear demonstrou que o efeito da retenção gástrica da cisplatina foi dose-dependente, nas doses e esquema de administração aqui apresentados, como ilustrado no gráfico 6, onde os valores do percentual da recuperação do vermelho fenol (variável dependente) foi plotado versus as doses cumulativas de cisplatina (variável independente) ($R=0,60$, $p < 0,001$, teste de força=0,99).

A avaliação da motilidade gastrintestinal, através da mensuração da retenção gástrica de corante e do trânsito intestinal de líquidos em ratos tratados com 5 doses de 1 mg/kg cisplatina intravenosa e sacrificados após uma semana foi realizada em 5 animais. Conforme ilustrado no gráfico 7, não foi evidenciada uma reversão na retenção de corante no estômago após uma semana do tratamento com cisplatina ($62,6 \pm 1,5\%$) quando comparada com a do grupo controle ($41,9 \pm 2,1\%$) ($p > 0,05$). Nos segmentos intestinais proximal e medial a retenção encontrada foi de $15,0 \pm 0,8\%$, $18,7 \pm 0,9\%$, respectivamente e diferiu do controle.

Nos subgrupos de animais tratados com 5 doses de 1 mg/kg cisplatina e sacrificados após duas semanas ($N=8$), a retenção de corante no estômago foi semelhante ao grupo controle ($44,8 \pm 3,2\%$ vs. $44,3 \pm 3,0\%$) ($p > 0,05$) (Gráfico 7). Nos segmentos intestinais proximais e mediais, a recuperação encontrada foi de $28,5 \pm 4,6\%$ e $18,9 \pm 4,1\%$ respectivamente, sendo semelhante ao subgrupo controle.

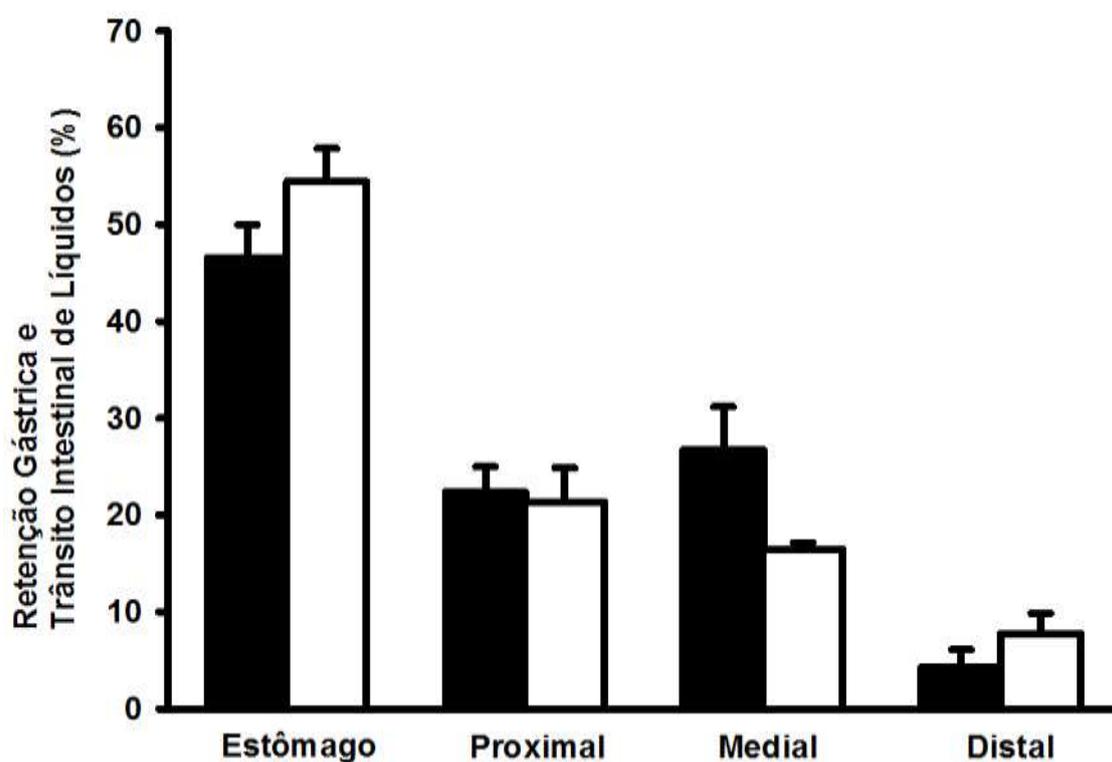
Nos subgrupos de animais sacrificados após uma e duas semanas, os pesos dos cólons persistiram elevados ($5,3 \pm 0,6$ e $5,6 \pm 0,5g$) quando comparados com os encontrados no subgrupo controle ($2,8 \pm 0,1g$) ($p < 0,05$). Não houve reversão do aumento do peso colônico, nem mesmo após duas semanas depois da última dose do tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina, como ilustrado no gráfico 7.

Conforme ilustrado no gráfico 8, houve um aumento significativo no peso dos cólons nos animais tratados com 1 e 2 doses de 2 mg/kg de cisplatina e sacrificados 24h após a última dose quando comparado com os animais tratados com solução salina ($5,6 \pm 0,5g$ vs. $3,9 \pm 0,1g$ e $4,6 \pm 0,4g$ vs. $3,6 \pm 0,1g$, respectivamente) ($p < 0,05$). Nos ratos tratados com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina, o peso dos cólons foi de $3,2 \pm 0,16g$, semelhante ao grupo

controle ($3,9 \pm 0,14\text{g}$) ($p>0,05$). Nos animais que receberam 5 doses de $0,5\text{ mg/kg}$; 2, 3 e 5 doses de 1 mg/kg ; 5 doses de 2 mg/kg , o peso dos cólons não diferiu estatisticamente quando comparado ao grupo controle ($4,7 \pm 0,4$ vs. $4,0 \pm 0,1$; $3,9 \pm 0,08\text{ g}$ vs. $3,6 \pm 0,1\text{ g}$; $3,7 \pm 0,3\text{ g}$ vs. $3,7 \pm 0,2\text{ g}$; $3,2 \pm 0,1\text{g}$ vs. $3,9 \pm 0,1\text{g}$; $3,8 \pm 0,2\text{ g}$ vs. $3,9 \pm 0,1\text{ g}$, respectivamente) ($p>0,05$).

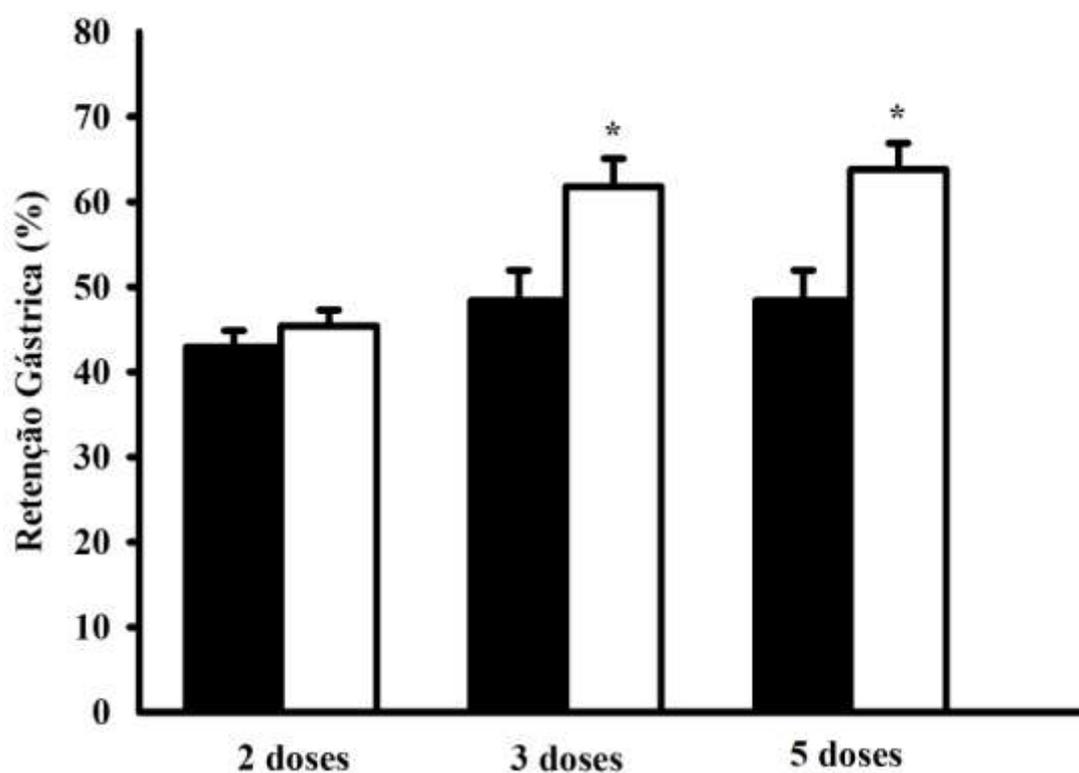
A figura 15 ilustra o aspecto macroscópico do cólon de ratos submetidos ao tratamento crônico com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina ou solução salina e sacrificados 24h após a última dose. Mostrando volumes dos colons semelhantes nos animais tratados com salina e com cisplatina.

Gráfico 1. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 0,5 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos.



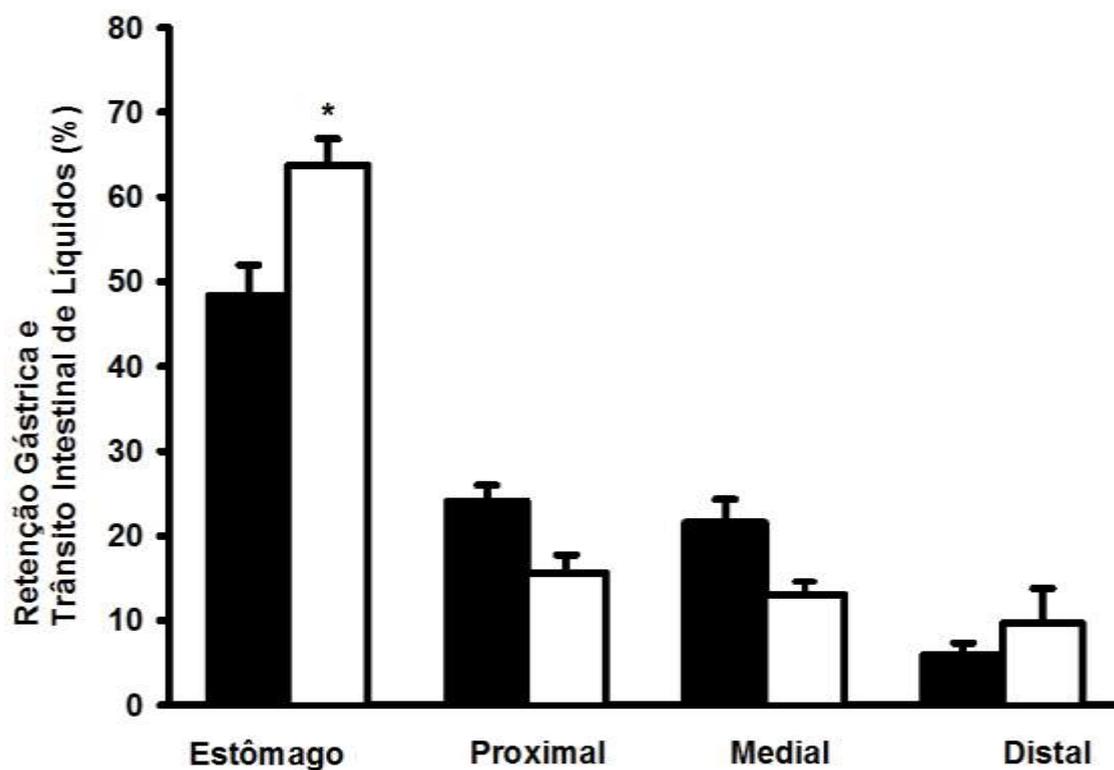
Retenção gástrica e nos segmentos do intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 0,5 mg/kg de cisplatina (N=5) (□) ou solução salina (N=5) (■) intravenosa em dias consecutivos. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 2. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 2, 3 e 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica em ratos acordados.



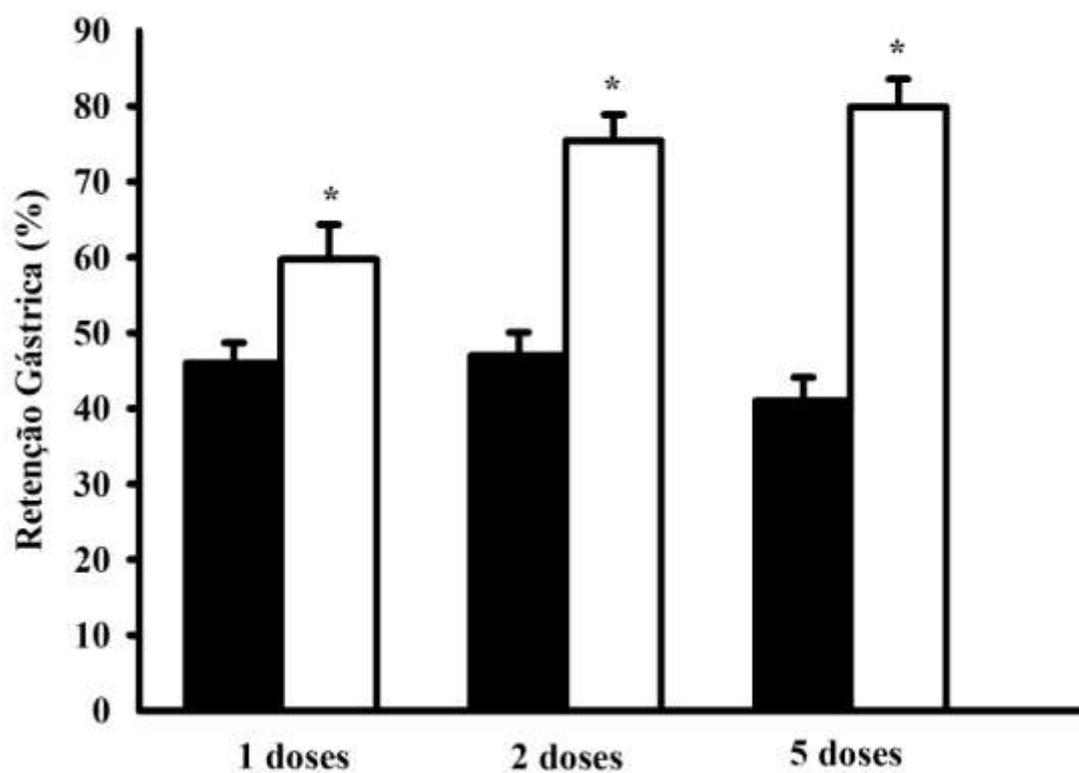
Retenção gástrica em ratos acordados submetidos ao tratamento com 2, 3 e 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=4, 6 e 5) (□) ou solução salina (N=5, 5 e 5) (■) intravenosa em dias consecutivos. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 3. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados.



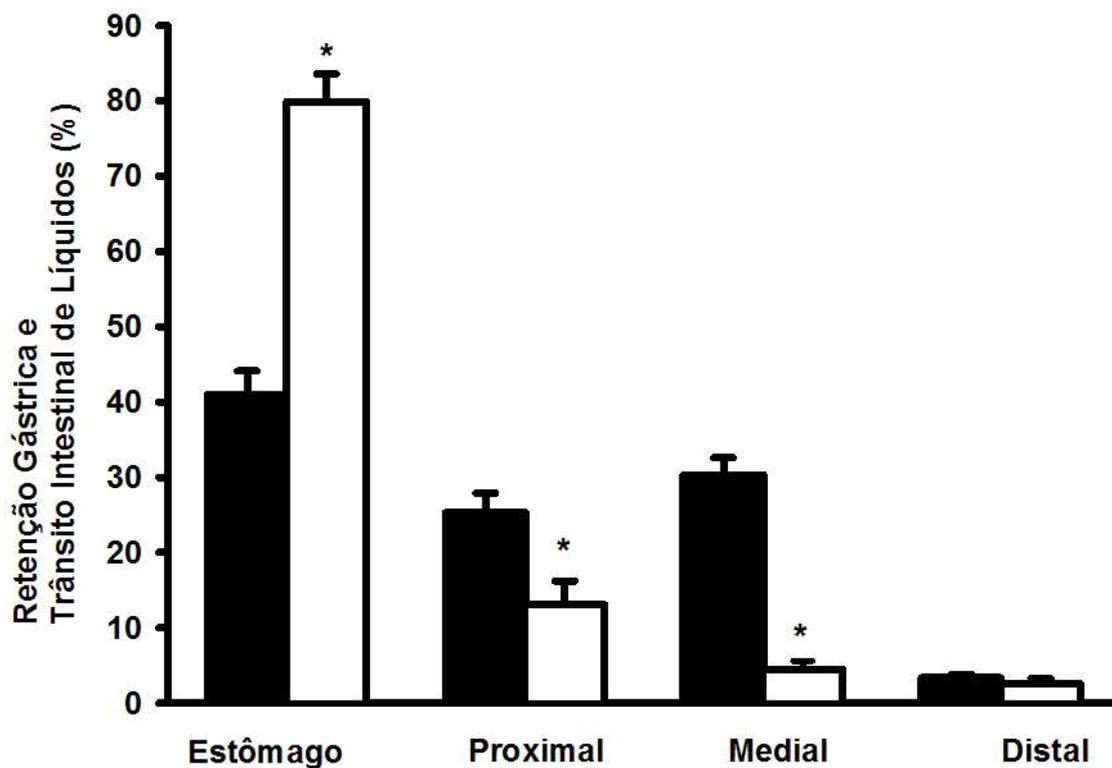
Retenção gástrica e do intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=5) (□) ou solução salina (N=5) (■) intravenosa em dias consecutivos. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 4. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 1, 2 e 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica em ratos acordados.



Retenção gástrica em ratos acordados submetidos ao tratamento com 1, 2, e 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina (N=6, 5 e 7) (□ ou solução salina (N=6, 5 e 7) (■) intravenosa em dias alternados. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 5. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados.



Retenção gástrica e do intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina (N=7) (□) ou solução salina (N=7) (■) intravenosa em dias consecutivos. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

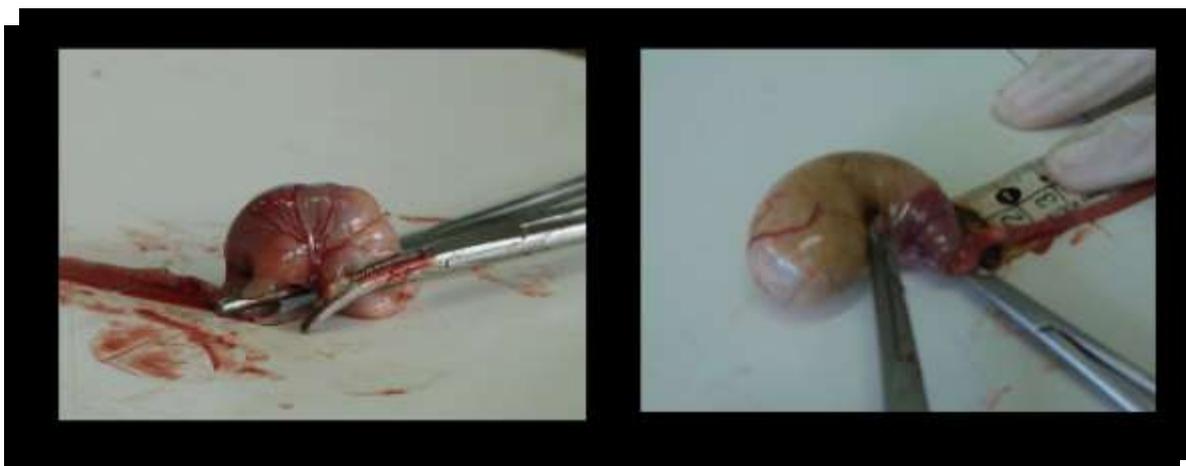
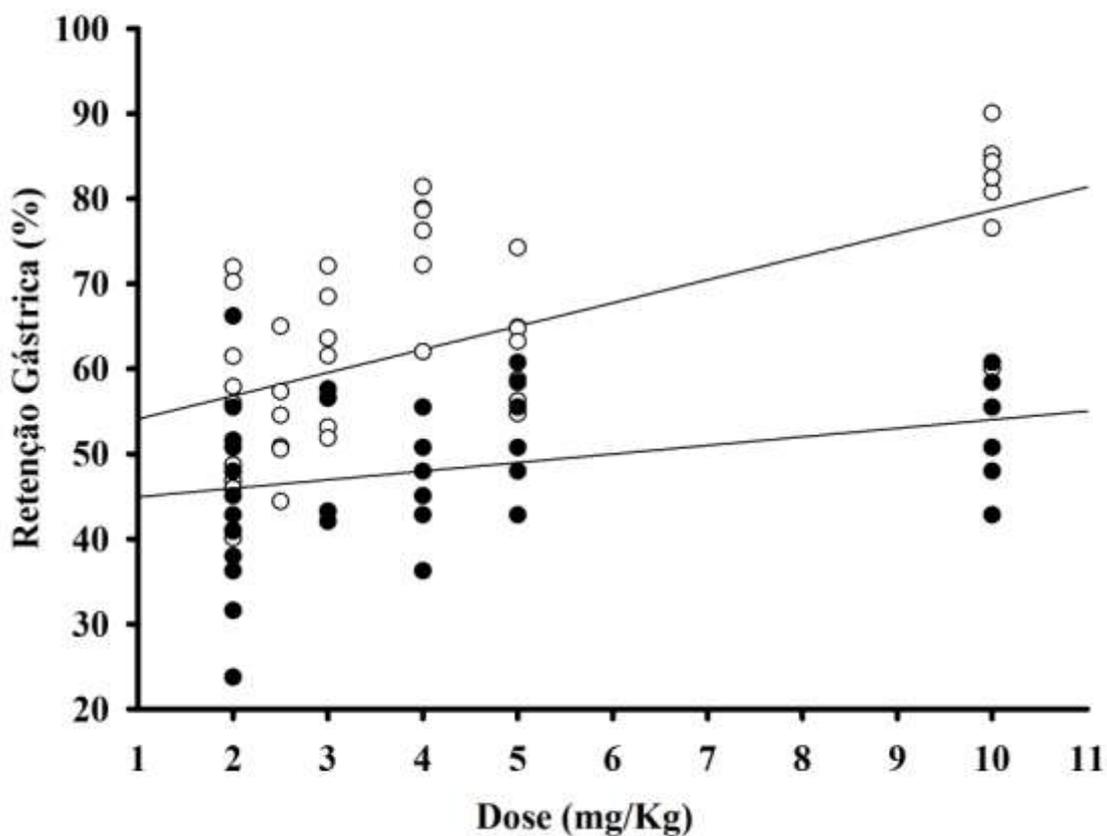


Figura 14. Efeito do tratamento crônico com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica de vermelho fenol. (A) Aparência do estômago normal em animal tratado com salina. (B) Estômago com retenção de alimento e corante após administração de 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina.

Gráfico 6. Efeito dose-dependente do tratamento com cisplatina na retenção gástrica de líquidos.



Análise da regressão linear do efeito de diferentes doses de cisplatina intravenosa na recuperação gástrica do vermelho fenol, 1 dia após o tratamento com cisplatina (2-10 mg/kg doses cumulativas) ($R=0,60$, $p<0,001$, teste de força=0,99) (○) ou salina ($R=0,41$, $p=0,845$, teste de força=0,72) (●). Para esta análise, os valores do percentual da recuperação do vermelho fenol (variável dependente) foi plotado versos as doses cumulativas de cisplatina (variável independente).

Gráfico 7. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre a retenção gástrica e o peso dos cólons em ratos acordados e sacrificados um dia, uma e duas semanas após o tratamento.

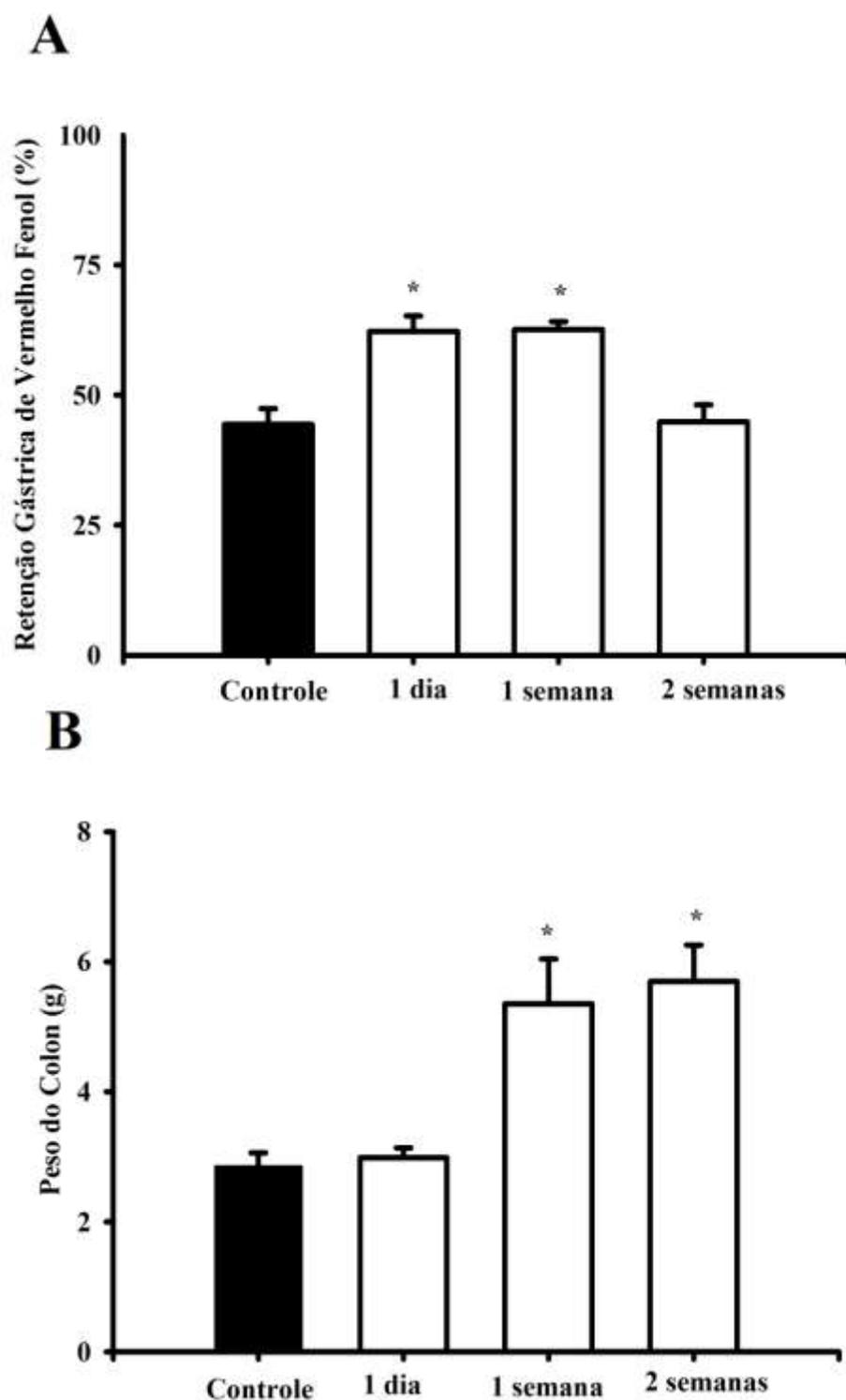
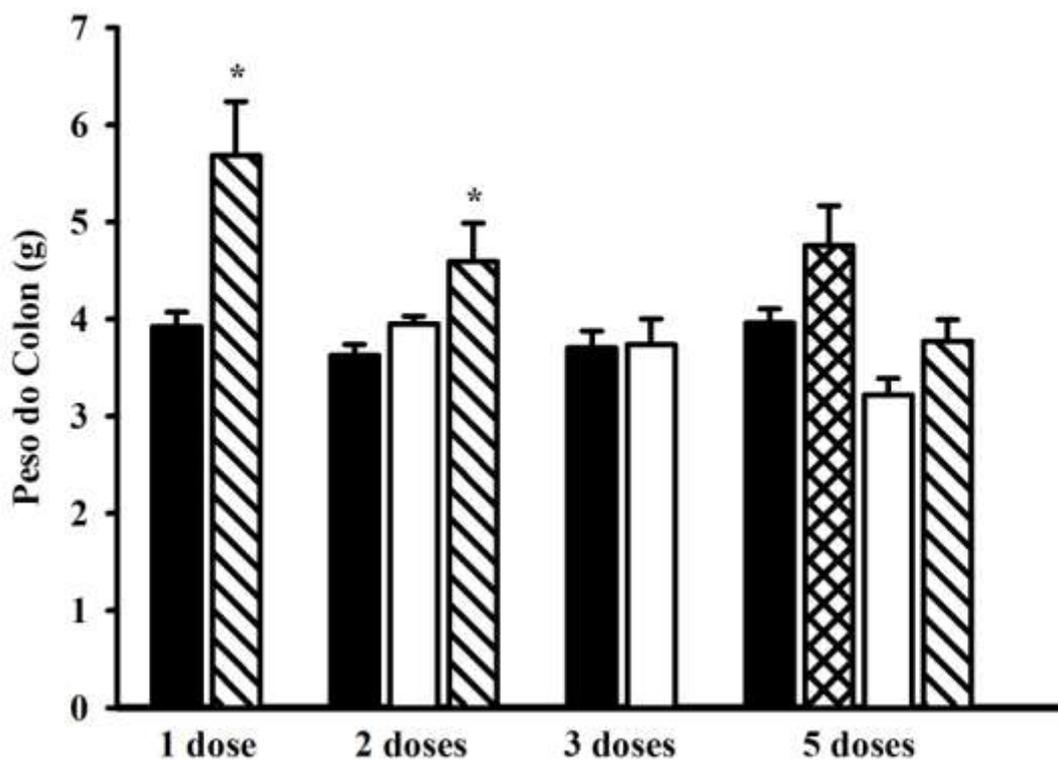


Gráfico 8. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 0,5 mg/kg; 2, 3 e 5 doses de 1 mg/kg e 1, 2 e 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina sobre o peso dos cólons.



Peso do cólon em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 0,5 mg/kg (N=5) (▨); 2, 3 e 5 doses de 1 mg/kg (N=5, 6 e 6) (□) e 1, 2 e 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina (N=6, 6 e 6) (▩) ou solução salina (N=6, 6, 6 e 5) (■) intravenosa em dias consecutivos. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de cisplatina ou salina. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.



Figura 15. Efeito do tratamento crônico com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina e 5 doses de 150 µg/kg de vincristina intravenosa sobre os cólons de ratos acordados. (A) Aparência do colon normal em animal tratado com salina. (B) Colon de animal após administração de 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina. (C) Aparência do colon normal em animal tratado com salina. (D) Colon de animal após administração de 5 doses de 150 µg/kg de vincristina.

1.1.2. Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos e peso colônico em ratos tratados com vincristina.

O gráfico 9 demonstra que o tratamento com 5 doses de 50 µg/kg (250 µg/kg) de vincristina intravenosa em dias alternados, resultou em aumento significativo na retenção gástrica ($63,9 \pm 3,0\%$, N=5) quando comparada ao subgrupo de animais controle ($43,7 \pm 6,2\%$, N=5) ($p < 0,05$).

Quanto ao estudo do trânsito intestinal de líquidos em animais tratados com 5 doses de 50 µg/kg de vincristina, a recuperação de corante vermelho fenol no intestino delgado proximal, medial e distal foi de $23,1 \pm 1,4\%$ vs. $27,1 \pm 3,4\%$; $12,8 \pm 3,3\%$ vs. $28,1 \pm 4,4\%$; $0,0\%$ vs. $0,9 \pm 0,1\%$, respectivamente, não havendo diferença significativa no intestino proximal ($p > 0,05$) e demonstrando diferença estatística nos segmentos medial e distal ($p < 0,05$) (Gráfico 9).

A retenção gástrica nos animais tratados com 2 doses de 100 µg/kg de vincristina intravenosa em dias alternados (dose cumulativa de 200 µg/kg), foi semelhante quando comparada aos subgrupos de animais tratados com doses equivalentes de solução salina ($53,0 \pm 5,1\%$, N=6 vs. $48,6 \pm 1,9\%$, N=8) ($p > 0,05$) (Gráfico 10). Não houve diferença também entre os percentuais de retenção no intestino delgado proximal ($30,7 \pm 2,9\%$ vs. $30,0 \pm 1,5\%$), medial ($16,1 \pm 5,2\%$ vs. $21,3 \pm 1,8\%$) e distal ($0,0 \pm 0,0$ vs. $0,0 \pm 0,0$) dos animais dos subgrupos experimental e controle ($p > 0,05$).

Dentre os animais tratados com 3 e 4 doses de 100 µg/kg de vincristina em dias alternados, a média do percentual da retenção gástrica de vermelho fenol foi de: $54,5 \pm 2,9\%$, N=6 vs. $38,1 \pm 6,6\%$, N=5; $57,8 \pm 1,0\%$, N=5 vs. $44,0 \pm 4,5\%$, N=5, respectivamente, havendo diferença entre estes dois grupos e seus respectivos grupos controles ($p < 0,05$) (Gráfico 8). Não houve diferença, porém, na retenção no intestino delgado em segmentos proximais ($27,8 \pm 2,0\%$ vs. $30,2 \pm 3,3\%$; $22,8 \pm 1,8\%$ vs. $20,3 \pm 2,1\%$) e mediais ($17,6 \pm 4,4\%$ vs. $23,4 \pm 6,8\%$; $19,2 \pm 1,7$ vs. $24,7 \pm 2,1\%$) ($p > 0,05$). Nos segmentos distais do intestino, houve diferença na retenção de corante entre estes subgrupos ($0,0\%$ vs. $8,1 \pm 1,9\%$; $0,0\%$ vs. $10,8 \pm 4,3\%$) ($p < 0,05$).

Nos gráficos 10 e 11 está representada a retenção percentual de corante em animais tratados com 5 doses de 100 µg/kg de vincristina intravenosa, em dias alternados, perfazendo uma dose cumulativa de 500 µg/kg, diferiu da retenção em ratos controle ($62,2 \pm 3,7\%$, N=9 vs. $43,7 \pm 6,2\%$, N=5) ($p < 0,05$). Quanto ao estudo do trânsito intestinal de líquidos, os

percentuais de corante no segmento proximal de delgado ($30,0 \pm 2,3\%$ vs. $27,1 \pm 3,4\%$) não diferiram entre os dois subgrupos ($p > 0,05$). Entretanto, no segmento medial ($7,2 \pm 2,2\%$ vs. $28,1 \pm 4,4\%$) e distal ($0,4 \pm 0,4\%$ vs. $0,9 \pm 0,1\%$) houve diferença estatística ($p < 0,05$) (Gráfico 9).

O gráfico 12 mostra um aumento da retenção de corante no estômago após a administração de 2 e 5 doses de vincristina $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($69,3 \pm 4,4\%$, $N=6$ vs. $48,6 \pm 1,9\%$, $N=5$ e $69,3 \pm 3,3\%$ vs. $43,7 \pm 6,2\%$) ($p < 0,05$), enquanto o subgrupo que recebeu apenas 1 dose de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ deste quimioterápico não ($44,7 \pm 3,2\%$, $N=5$ vs. $45,0 \pm 3,1\%$, $N=6$) ($p > 0,05$). Houve uma redução do esvaziamento gástrico após o tratamento com 2 e 5 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ vincristina intravenosa, em dias alternados, totalizando uma dose cumulativa de $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ e de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, quando comparada ao tratamento com salina em doses equivalentes ($p < 0,05$). Este mesmo efeito não foi encontrado após a administração de 1 dose de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ vincristina.

Após administração de 1 dose de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ vincristina intravenosa, a retenção de corante no intestino delgado proximal ($35,0 \pm 1,0\%$ vs. $23,8 \pm 2,0\%$), medial ($16,5 \pm 1,8\%$ vs. $23,7 \pm 2,5\%$) e distal ($3,6 \pm 1,6\%$ vs. $7,3 \pm 1,9\%$), não diferiu significativamente do controle ($p > 0,05$). Enquanto isso, o tratamento com 2 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina intravenosa, em dias alternados, não resultou em diferença de retenção de corante entre o intestino proximal e o grupo controle ($29,2 \pm 3,2\%$ vs. $30,0 \pm 1,5\%$) e entre a porção distal e seu respectivo controle, enquanto no segmento medial houve diferença com significância estatística ($1,4 \pm 1,4\%$ vs. $21,3 \pm 1,8\%$) ($p < 0,05$).

No subgrupo de animais tratados com a dose cumulativa máxima de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (Gráfico 13), dividida em 5 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ e administradas em dias alternados ($N=7$), também houve maior recuperação do corante no estômago ($69,3 \pm 3,3\%$), em comparação com o grupo controle ($43,7 \pm 6,2\%$, $N=5$) ($p < 0,05$). Não houve diferença no percentual de corante recuperado no segmento intestinal proximal ($26,8 \pm 2,5\%$ vs. $27,1 \pm 3,4\%$) e distal ($0,3 \pm 0,3\%$ vs. $0,9 \pm 0,1\%$) entre os dois subgrupos ($p > 0,05$). Entretanto, no segmento intestinal medial, a recuperação do vermelho fenol foi bem inferior nos animais tratados com vincristina ($4,1 \pm 1,3\%$), frente à encontrada no subgrupo controle ($28,1 \pm 4,4\%$) ($p < 0,05$) (Gráfico 13).

A análise de regressão linear demonstrou que o efeito da retenção gástrica da vincristina foi dose-dependente, nas doses e esquema de administração aqui apresentados, como ilustrado no gráfico 14, onde os valores do percentual da recuperação do vermelho

fenol (variável dependente) foi plotado versus as doses cumulativas de vincristina (variável independente) ($R=0,43$, $p=0,001$, teste de força= $0,89$).

A avaliação da motilidade gastrointestinal, através da mensuração da retenção gástrica de corante e do trânsito intestinal de líquidos em ratos tratados com 5 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina intravenosa e sacrificados após uma semana foi realizada em 5 animais. Conforme ilustrado no gráfico 15, foi evidenciada uma reversão na retenção de corante no estômago após uma semana do tratamento com vincristina ($60,5 \pm 3,6\%$) quando comparada com a do grupo controle ($43,7 \pm 6,2\%$) ($p>0,05$). Nos segmentos intestinais proximais e mediais, a recuperação encontrada foi de $27,8 \pm 2,0\%$, $11,6 \pm 3,4\%$, respectivamente e não diferiu do controle.

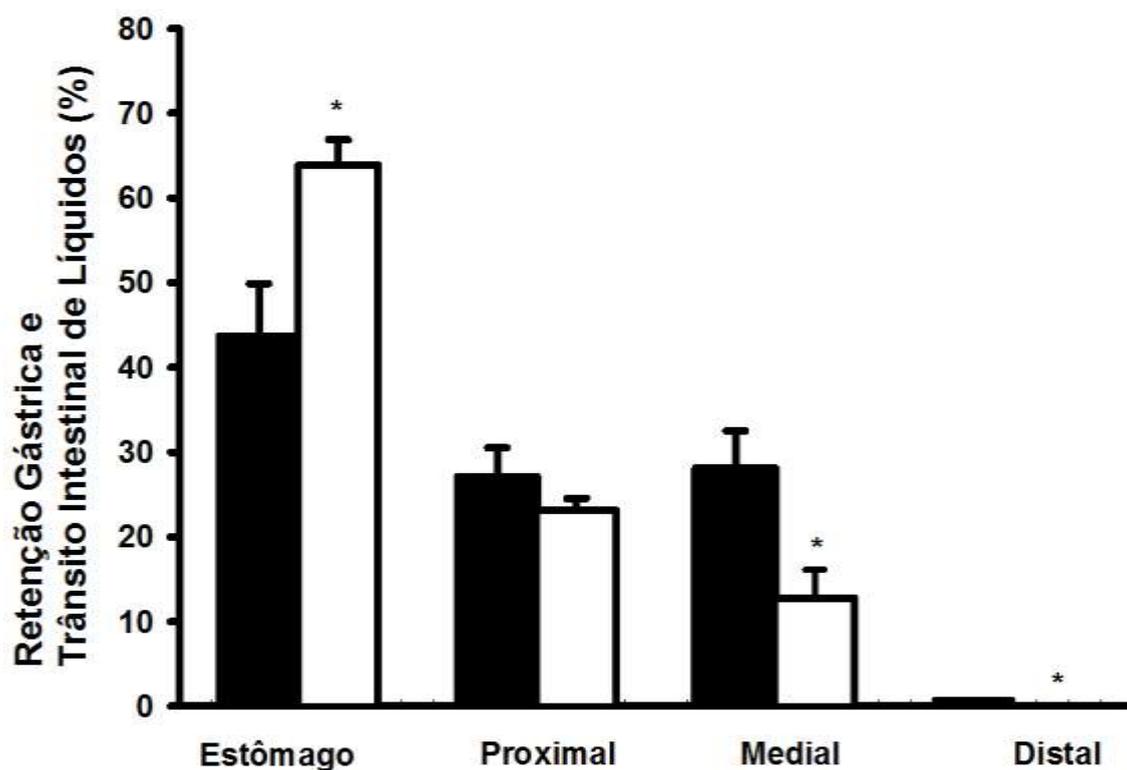
No subgrupo de animais tratados com 5 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina e sacrificados após duas semanas ($N=7$), a retenção de corante no estômago também foi semelhante a do grupo controle ($55,9 \pm 4,0\%$ vs. $43,7 \pm 6,2\%$) ($p>0,05$) (Gráfico 15). Nos segmentos intestinais proximais e mediais, a recuperação encontrada foi de $33,4 \pm 4,5\%$ e $10,6 \pm 1,1\%$, respectivamente, sendo semelhante ao subgrupo controle.

No subgrupo de animais sacrificados após uma semana, os pesos dos cólons persistiram elevados ($4,1 \pm 0,3 \text{ g}$) quando comparados com os encontrados no subgrupo controle ($2,4 \pm 0,1 \text{ g}$) ($p<0,05$). Entretanto, como ilustrado no gráfico 15, houve reversão do aumento do peso colônico duas semanas após a última dose do tratamento com 5 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina ($3,4 \pm 0,4 \text{ g}$).

Conforme ilustrado no gráfico 16, houve um aumento significativo no peso dos cólons nos animais tratados com 2 e 5 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina quando comparado com os animais tratados com solução salina ($4,7 \pm 0,2\text{g}$ vs. $3,4 \pm 0,1\text{g}$ e $5,0 \pm 0,5\text{g}$ vs. $3,5 \pm 0,2\text{g}$, respectivamente) ($p<0,05$). Nos ratos tratados com 5 doses de $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina, o peso dos cólons foi de $2,2 \pm 0,4\text{g}$, semelhante ao subgrupo controle ($3,5 \pm 0,2\text{g}$) ($p>0,05$). Nos animais que receberam 2, 3, 4 e 5 doses de $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, o peso dos cólons não diferiu estatisticamente quando comparado com o dos que foram tratados com solução salina ($2,7 \pm 0,2\text{g}$ vs. $3,4 \pm 0,1\text{g}$; $2,9 \pm 0,1\text{g}$ vs. $3,5 \pm 0,2\text{g}$; $2,8 \pm 0,2\text{g}$ vs. $3,7 \pm 0,1\text{g}$; $3,2 \pm 0,1\text{g}$ vs. $3,5 \pm 0,2\text{g}$, respectivamente) ($p>0,05$).

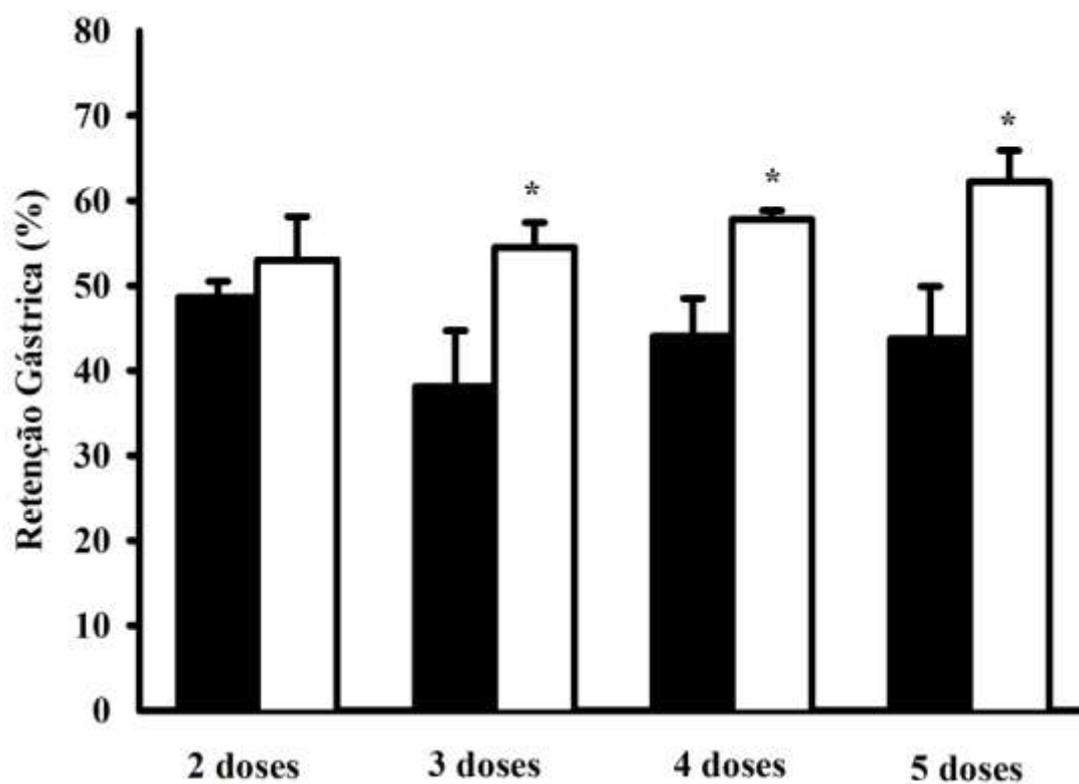
A figura 15 ilustra o aspecto macroscópico do cólon de ratos submetidos ao tratamento crônico com 5 doses de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina ou solução salina. Ilustrando um aumento do volume do colon do animal tratado com vincristina quando comparado ao animal tratado com salina.

Gráfico 9. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 50 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos.



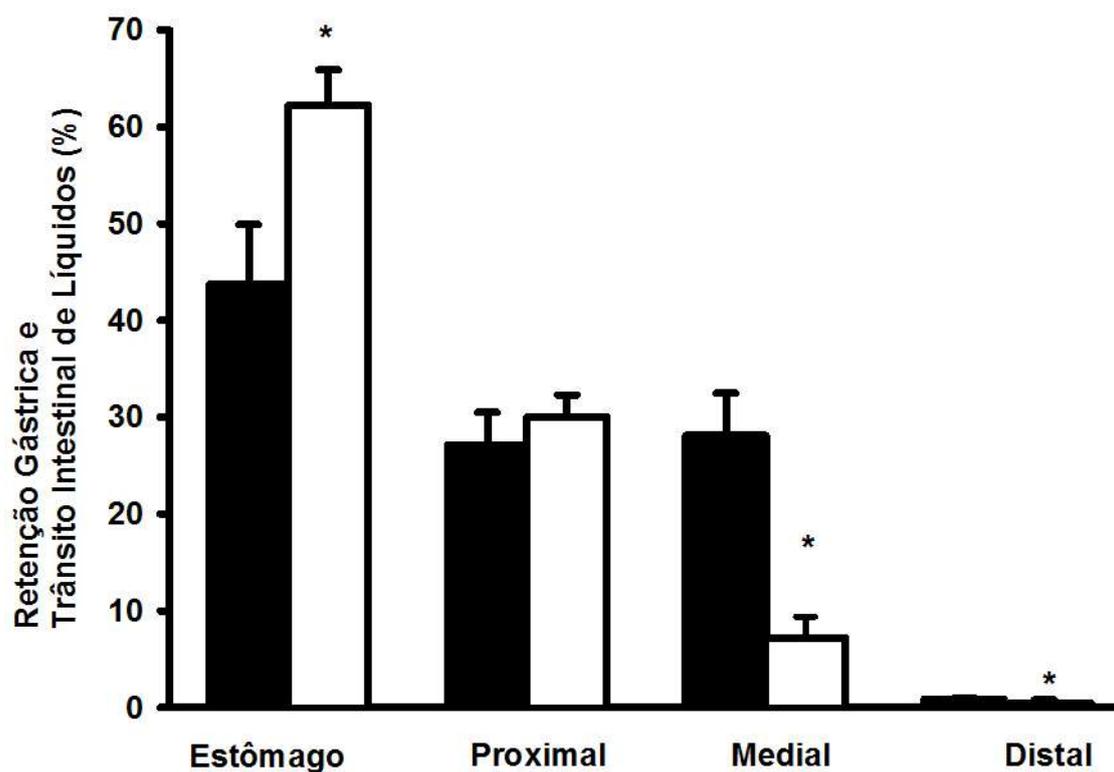
Retenção gástrica e dos segmentos do intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 50 µg/kg de vincristina (N=5) (□) ou solução salina (N=5) (■) intravenosa em dias alternados. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 10. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 2, 3, 4 e 5 doses de 100 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica em ratos acordados.



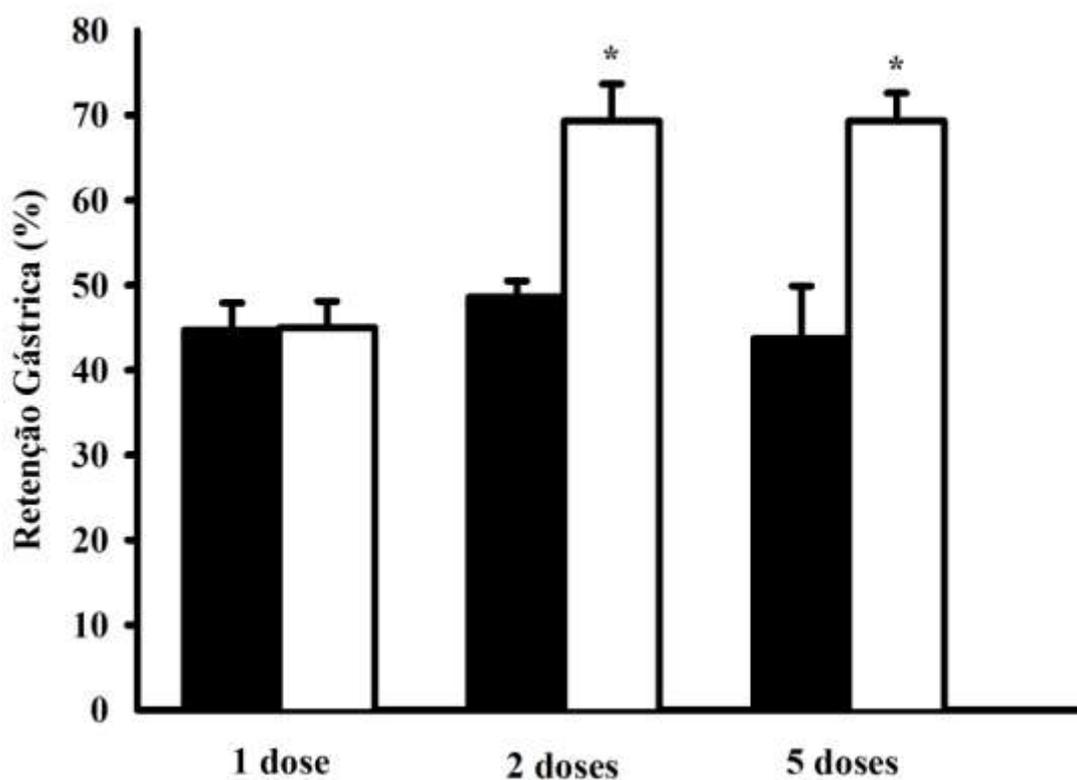
Retenção gástrica em ratos acordados submetidos ao tratamento com 2, 3, 4 e 5 doses de 100 µg/kg de vincristina (N=6, 6, 5 e 11) (□) ou solução salina (N=8, 5, 5 e 5) (■) intravenosa em dias alternados. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 11. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 100 µg/kg de vincristina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados.



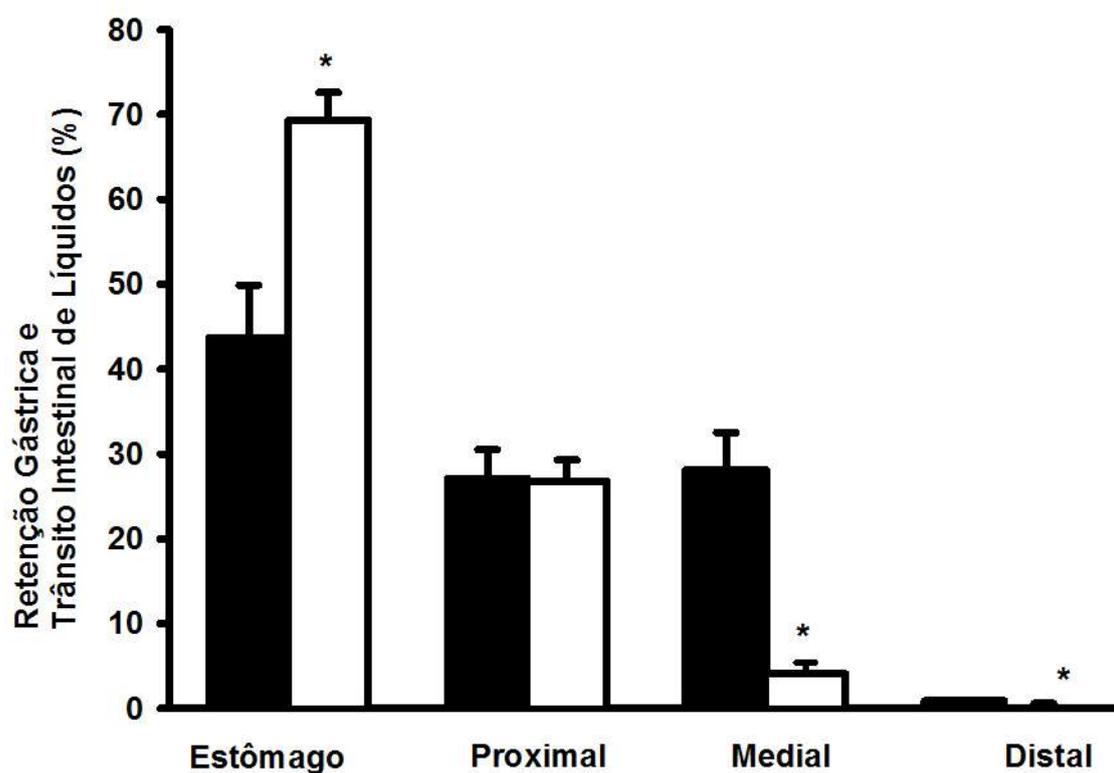
Retenção gástrica e do intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 100 µg/kg de vincristina (N=9) □) ou solução salina (N=5) ■) intravenosa em dias alternados. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 12. Efeito do tratamento crônico intravenosos com 1, 2 e 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina sobre a retenção gástrica em ratos acordados.



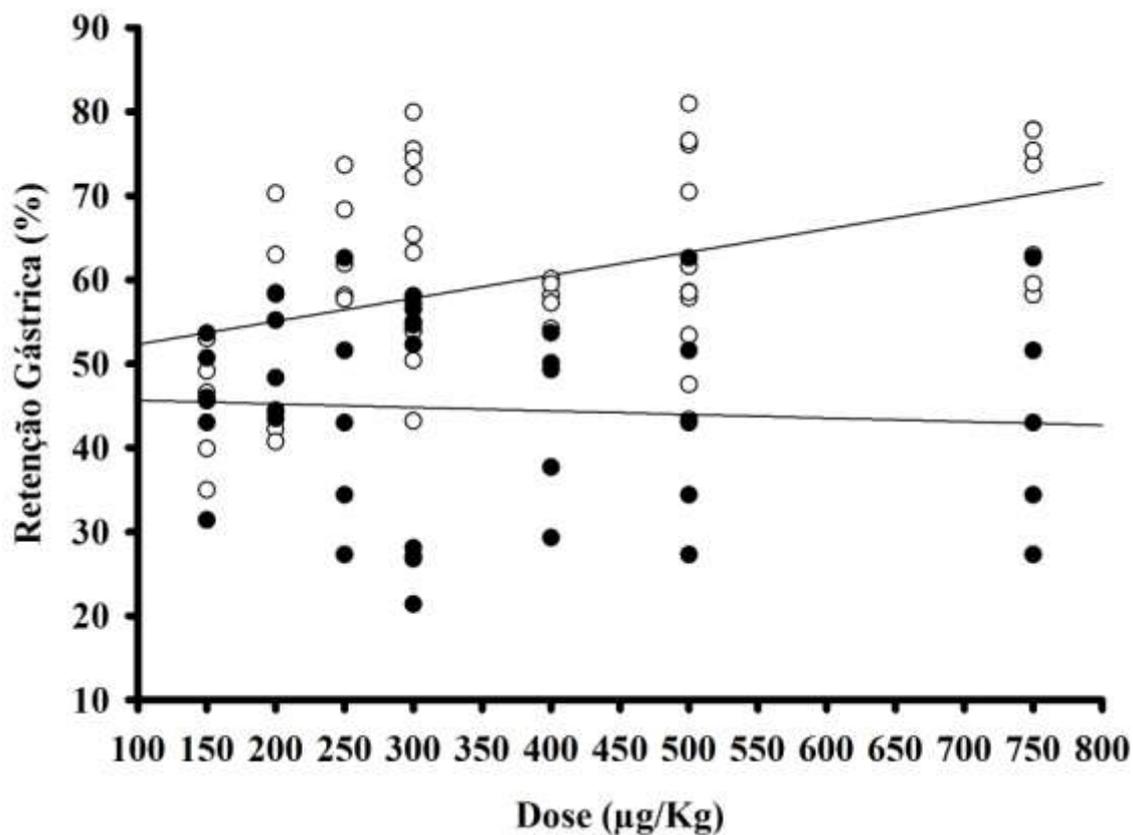
Retenção gástrica em ratos acordados submetidos ao tratamento com 1, 2, e 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (N=5, 6 e 7) (□) ou solução salina (N=6, 8 e 5) (■) intravenosa em dias alternados. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 13. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina sobre a retenção gástrica e o trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados.



Retenção gástrica e do intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (N=7) \square) ou solução salina (N=5) \blacksquare) intravenosa em dias alternados. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 14. Efeito dose-dependente do tratamento com vincristina na retenção gástrica de líquidos.



Análise da regressão linear do efeito de diferentes doses de vincristina intravenosa na recuperação gástrica do vermelho fenol, 1 dia após o tratamento com vincristina (150 – 750 µg/kg doses cumulativas) ($R=0,43$, $p=0,001$, teste de força=0,89) (○) ou salina ($R=0,07$, $p=0,673$, teste de força=0,06) (●). Para esta análise, os valores do percentual da recuperação do vermelho fenol (variável dependente) foi plotado versus as doses cumulativas de vincristina (variável independente).

Gráfico 15. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina sobre a retenção gástrica e o peso dos cólons em ratos acordados e sacrificados um dia, uma e duas semanas após o tratamento.

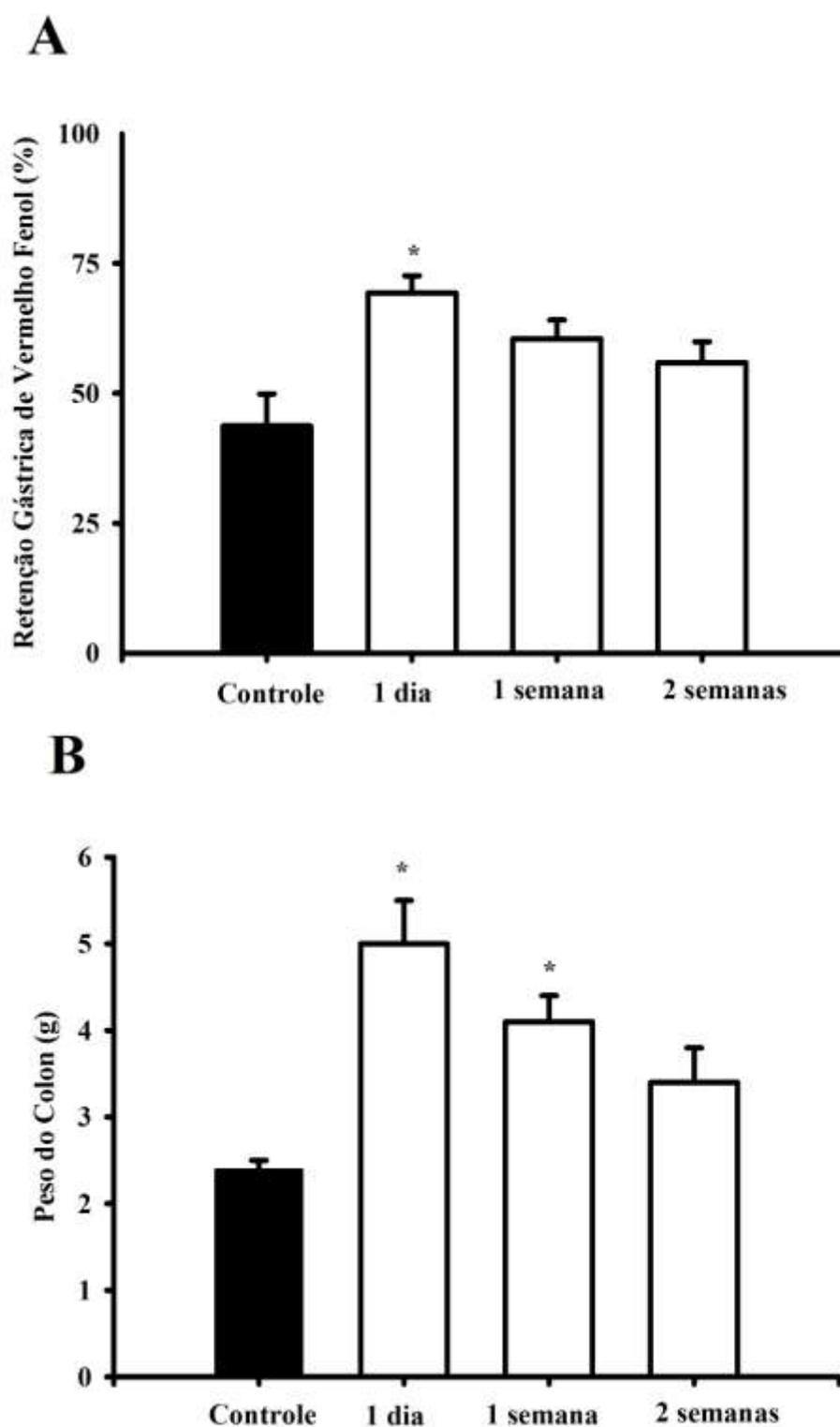
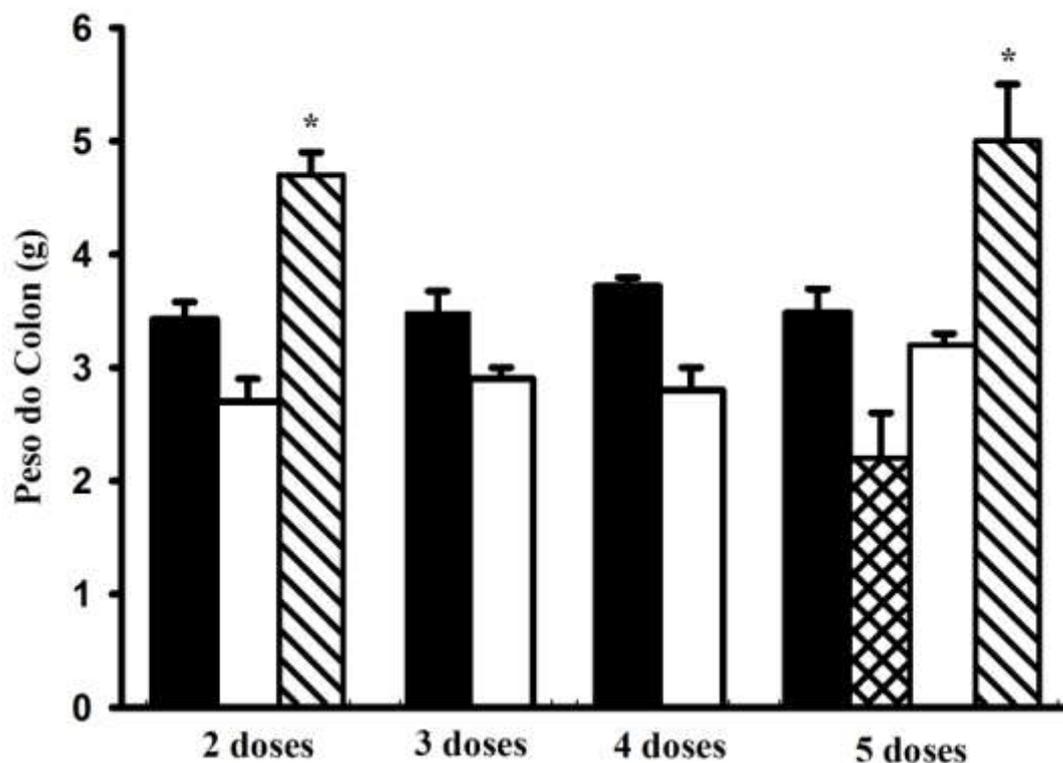


Gráfico 16. Efeito do tratamento crônico com 5 doses de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 2, 3, 4 e 5 doses de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 2 e 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina intravenosa sobre o peso dos cólons.



Peso do cólon em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (N=5) (\square); 2, 3, 4 e 5 doses de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (N=6, 6, 5 e 11) (\square); 2 e 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (N= 6 e 5) (\square) ou solução salina (N=6, 5, 8, 5 e 5) (\blacksquare) intravenosa em dias alternados. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de vincristina ou salina. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

1.2. Toxicidade do protocolo

1.2.1. Cisplatina

Na avaliação da toxicidade do protocolo, foi verificado que a avaliação diária do peso corpóreo, no grupo de animais que recebeu 5 doses de 0,5 mg/kg não apresentou perda de peso com significância estatística após a primeira ($203,8 \pm 3,0$ g) e terceira dose ($201,8 \pm 5,2$ g), porém após a quinta dose ($184,1 \pm 3,8$ g) de cisplatina apresentou perda de peso quando comparado ao peso basal pré-tratamento ($200,6 \pm 3,0$ g), ($p < 0,05$).

Dentre os animais tratados com 5 doses de 1 mg/kg, não houve redução significativa do peso após a primeira ($194,3 \pm 6,1$ g) e a terceira dose ($191,7 \pm 4,7$ g) ($p > 0,05$) de cisplatina acontecendo perda de peso significativa após a quinta dose ($178,2 \pm 6,5$ g) quando comparado com o peso basal ($202,8 \pm 3,5$ g) ($p < 0,05$).

Nos ratos tratados com 5 doses de 2 mg/kg, houve perda de peso significativa após a terceira ($214,0 \pm 5,3$ g) e quinta ($206,1 \pm 7,1$ g) dose de cisplatina ($p < 0,05$), não havendo diferença estatística entre o peso basal ($235,8 \pm 3,6$ g) e após a primeira dose ($222,1 \pm 4,0$ g) ($p > 0,05$).

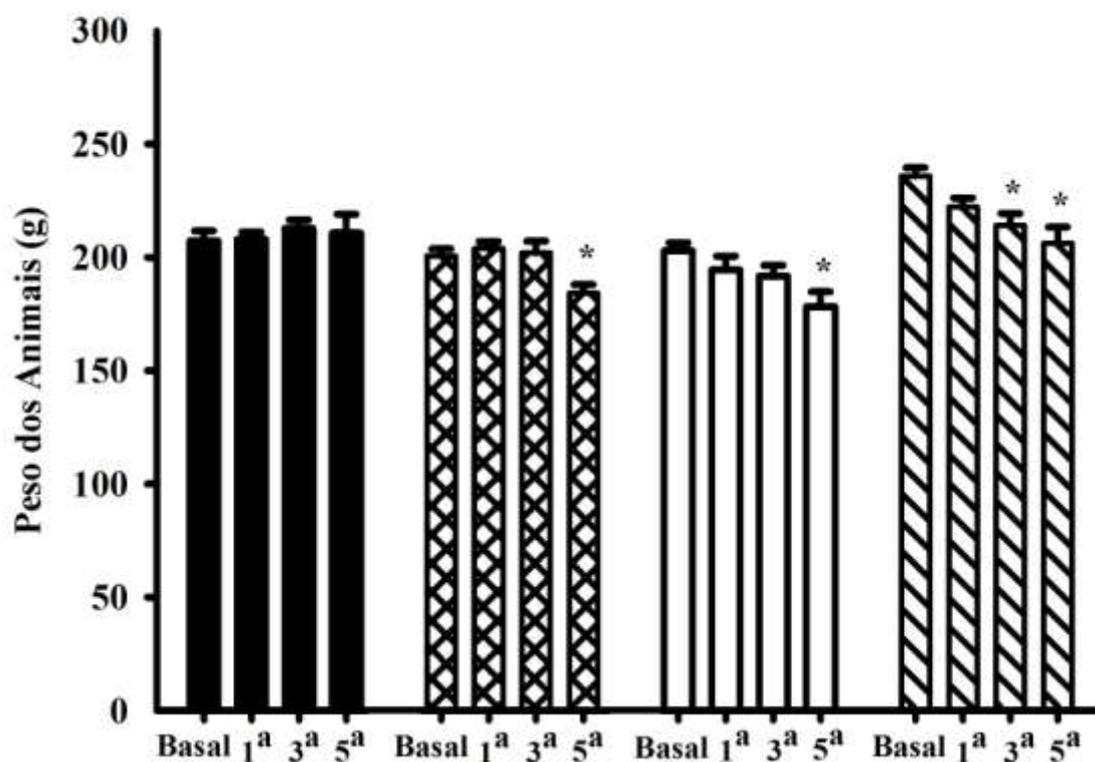
No subgrupo de animais controle, o peso dos animais após a primeira ($208,0 \pm 3,2$ g), terceira ($212,7 \pm 3,8$ g) e quinta dose ($210,7 \pm 8,3$ g) de solução salina não diferiram estatisticamente do peso pré-tratamento ($207,3 \pm 4,3$ g) ($p > 0,05$).

Todos os resultados acima citados estão ilustrados no gráfico 17.

A avaliação do peso corporal após uma e duas semanas de interrupção do tratamento diário com 5 doses de 1 mg/kg cisplatina intravenosa revelou que houve perda de peso significativa após 24 h após a quinta dose (não houve perda ponderal nos animais tratados ($200,6 \pm 4,6$ g e $197,1 \pm 8,4$ g) ($p > 0,05$), quando comparado aos valores basais ($204,2 \pm 1,3$) ($p > 0,05$). Estes resultados estão ilustrados no gráfico 18.

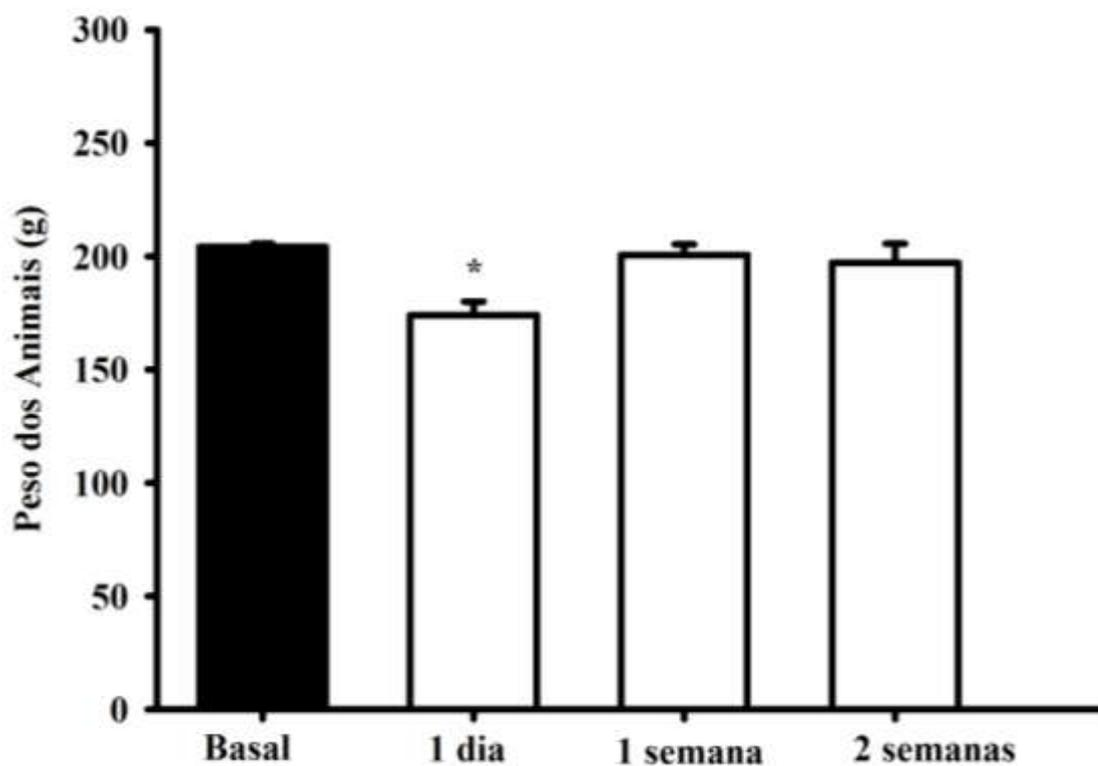
Quanto a outros parâmetros associados à toxicidade, foi verificada a incidência de neuropatia periférica com paralisia da pata traseira em um rato tratado com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina (N=5) e piloereção em dois animais deste mesmo subgrupo, como ilustrado pela figura 16.

Gráfico 17. Peso corporal em ratos avaliados 24 h após a 1^a, 3^a e 5^a dose de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg e 2 mg/kg de cisplatina ou salina intravenosa em ratos acordados.



Peso corporal em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 0,5 mg/kg (N=8) (⊠), 5 doses de 1 mg/kg (N=8) (□), 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina (N=6) (▨) ou de solução salina (N=7) (●) intravenosa em dias consecutivos. Os animais foram estudados antes do tratamento (basal), 24 h após a primeira, terceira e quinta dose de cisplatina. As barras representam as médias dos pesos corpóreo dos animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. pré-tratamento (basal) ao Teste One-Way ANOVA com Medidas Repetidas e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 18. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina sobre o peso corporal em ratos acordados um dia, uma e duas semanas após a última dose.



Peso corporal em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=16) intravenosa em dias consecutivos. Os animais foram estudados antes do tratamento (basal) (■), um dia, uma semana e duas semanas após a última dose de cisplatina (□). *, $p < 0,05$ vs. pré-tratamento (basal) ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

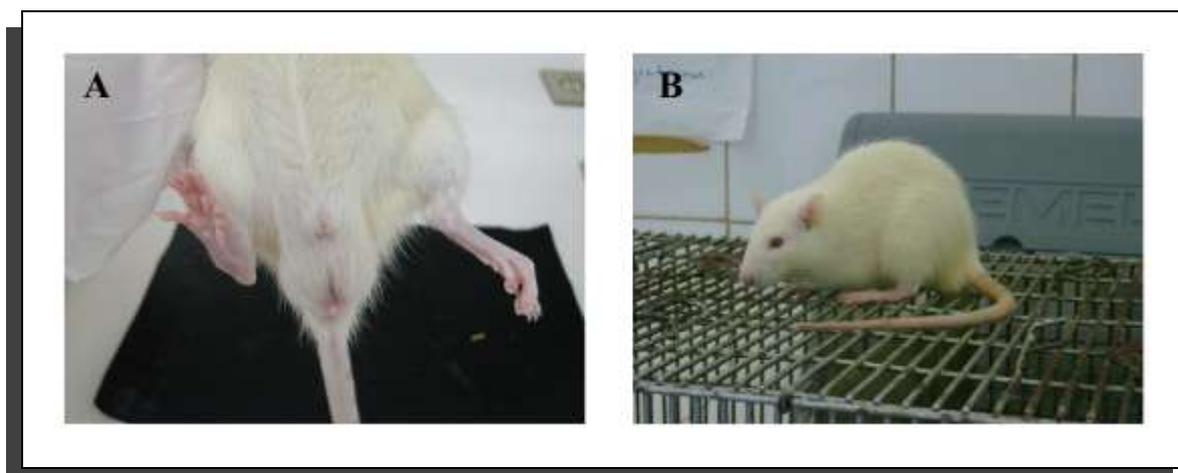


Figura 16. Parâmetros associados à toxicidade em ratos acordados tratados com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina intravenosa. (A) Paralisia da pata traseira. (B) Piloereção.

1.2.2. Vincristina

Durante a avaliação diária do peso corpóreo, o grupo de animais que recebeu 5 doses de 50 µg/kg não apresentou perda de peso com significância estatística após a primeira ($221,0 \pm 11,4$ g) e terceira dose ($221,8 \pm 11,8$ g) de vincristina ($p > 0,05$). Entretanto, o peso dos animais após a quinta dose ($207,6 \pm 12,3$ g) foi significativamente menor que o peso basal pré-tratamento ($216,8 \pm 11,1$ g) ($p < 0,05$).

Dentre os animais tratados com 5 doses de 100 µg/kg, não houve redução significativa do peso após primeira ($211,2 \pm 3,5$ g) e terceira dose ($207,2 \pm 2,7$ g) ($p > 0,05$), acontecendo perda de peso significativa após a quinta dose ($194,6 \pm 4,1$ g) quando comparado com o peso basal ($211,0 \pm 3,8$ g) ($p < 0,05$).

Nos ratos tratados com 5 doses de 150 µg/kg, houve perda de peso significativa após a terceira ($199,2 \pm 6,1$ g) e quinta ($175,4 \pm 7,1$ g) dose de vincristina ($p < 0,05$), não havendo diferença estatística entre o peso basal ($215,4 \pm 4,9$ g) e após a primeira dose ($210,4 \pm 5,1$ g) ($p > 0,05$).

No subgrupo de animais controle, o peso dos animais após a primeira ($208,0 \pm 3,2$ g), terceira ($212,0 \pm 3,8$ g) e quinta ($210,7 \pm 8,3$ g) doses de solução salina não diferiu estatisticamente do peso pré-tratamento ($207,3 \pm 4,3$ g) ($p > 0,05$).

No momento do sacrifício para o estudo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos, o peso dos animais tratados com 5 doses de 100 µg/kg ($194,6 \pm 4,1$ g) e 150 µg/kg ($175,4 \pm 7,1$ g) de vincristina eram estatisticamente inferiores ao peso do subgrupo controle ($238,0 \pm 3,9$ g) ($p < 0,05$). Entretanto nos animais do subgrupo tratado com 5 doses de 50 µg/kg, não houve diferença estatística do peso corpóreo quando comparado com o subgrupo controle ($207,6 \pm 12,3$ g vs. $238,0 \pm 3,9$ g) ($p > 0,05$).

Todos os resultados acima citados estão ilustrados no gráfico 19.

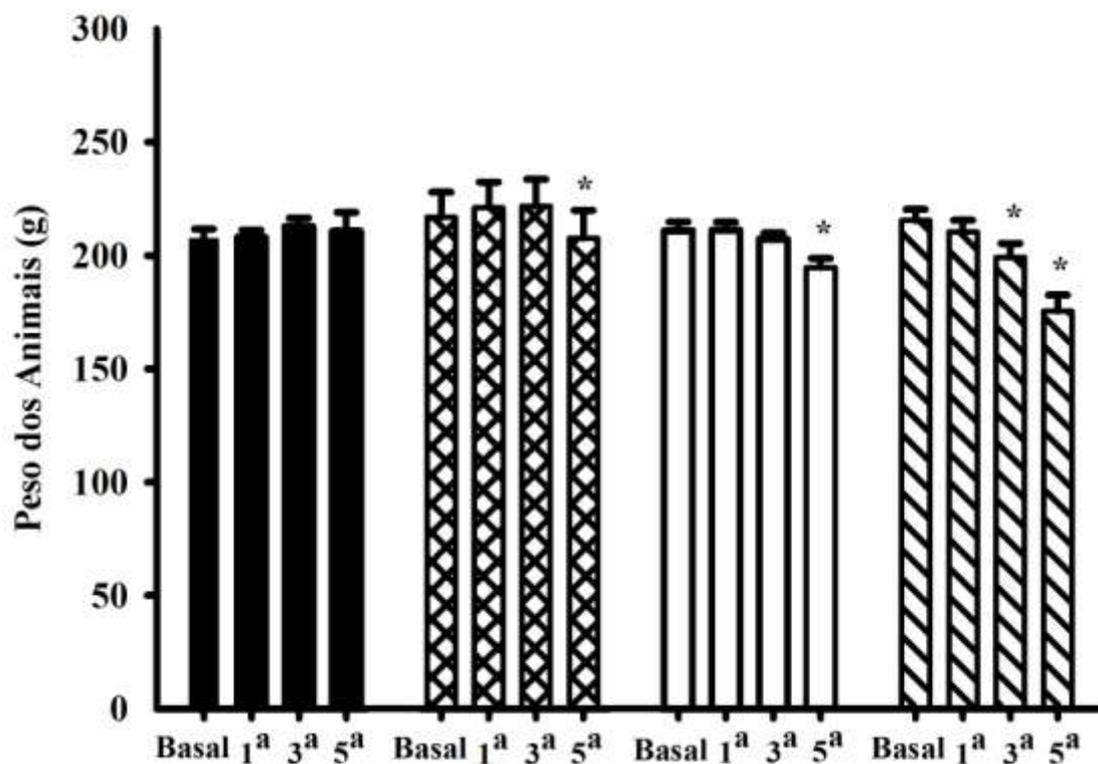
A avaliação do peso corporal mensurado diariamente revelou que a perda ponderal nos animais tratados com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina intravenosa persistiu após uma semana ($215,4 \pm 4,9$ g vs. $194,2 \pm 9,4$ g) ($p < 0,05$), porém foi revertida duas semanas após a última dose ($215,4 \pm 4,9$ g vs. $208,1 \pm 11,5$ g) quando comparado aos valores basais ($p > 0,05$). Estes resultados estão ilustrados no gráfico 20.

Quanto a outros parâmetros associados à toxicidade, foi verificada a incidência de dorso arqueado em dois ratos tratados com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina (N=7) e

piloereção em três animais deste mesmo subgrupo, como ilustrado na figura 17. Não houve diarreia ou piloereção no subgrupo de ratos tratados com solução salina.

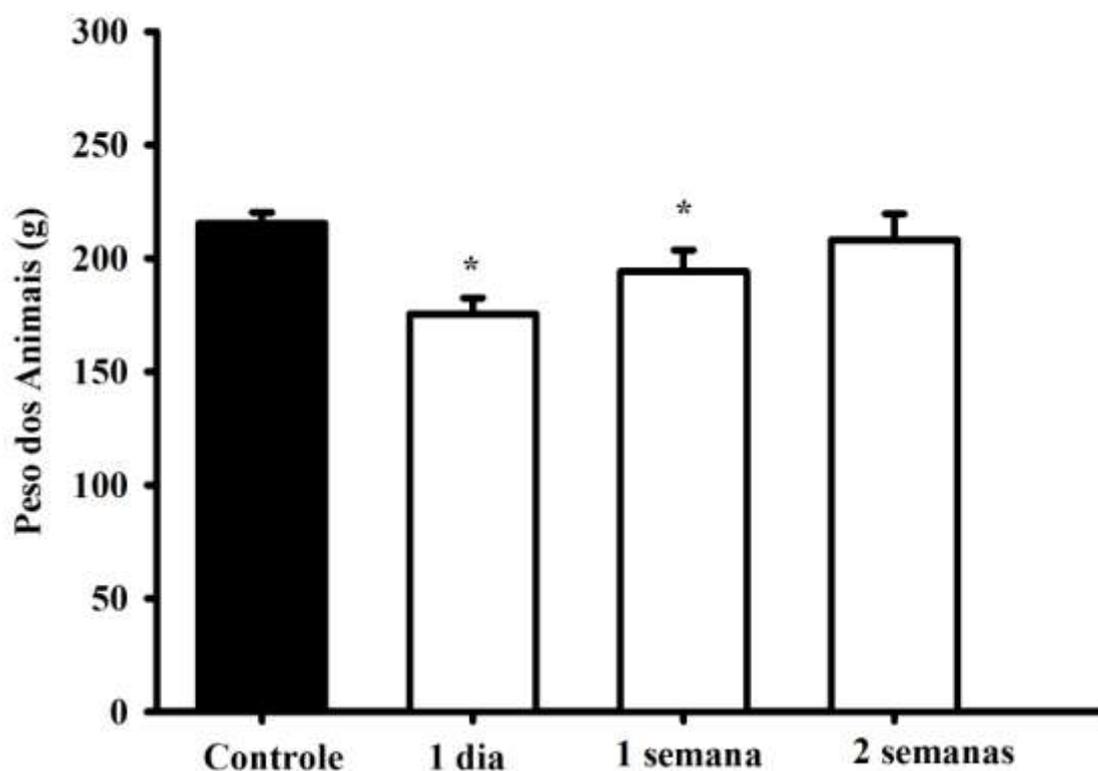
Marcha neuropática tipo *Toe-walking gait* (Gottschalk *et al.*, 1968) foi identificada em 5 animais tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg (N=7), não havendo nenhum caso no subgrupo controle. A marcha está ilustrada na figura 17.

Gráfico 19. Peso corporal em ratos avaliados 24 h após a 1^a, 3^a e 5^a dose de 50 µg/kg, 100 µg/kg e 150 µg/kg de vincristina ou salina intravenosa em ratos acordados.



Peso corporal em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 50 µg/kg (N=5) (⊠), 5 doses de 100 µg/kg (N=9) (□), 5 doses de 150 µg/kg de vincristina (N=7) (▨) ou de solução salina (N=5) (■) intravenosa em dias alternados. Os animais foram estudados antes do tratamento (basal), 24 h após a primeira, terceira e quinta dose de vincristina. As barras representam as médias dos pesos corpóreo dos animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. pré-tratamento (basal) ao Teste One-Way ANOVA com Medidas Repetidas e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 20. Efeito do tratamento crônico intravenoso com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina sobre o peso corporal em ratos acordados um dia, uma e duas semanas após a última dose.



Peso corporal em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (N=7) intravenosa em dias alternados. Os animais foram estudados antes do tratamento (basal) (■), um dia, uma semana e duas semanas após a última dose de vincristina (□). As barras representam as médias dos pesos corpóreo dos animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. pré-tratamento (basal) ao Teste One-Way ANOVA com Medidas Repetidas e Teste de Holm-Sidak.

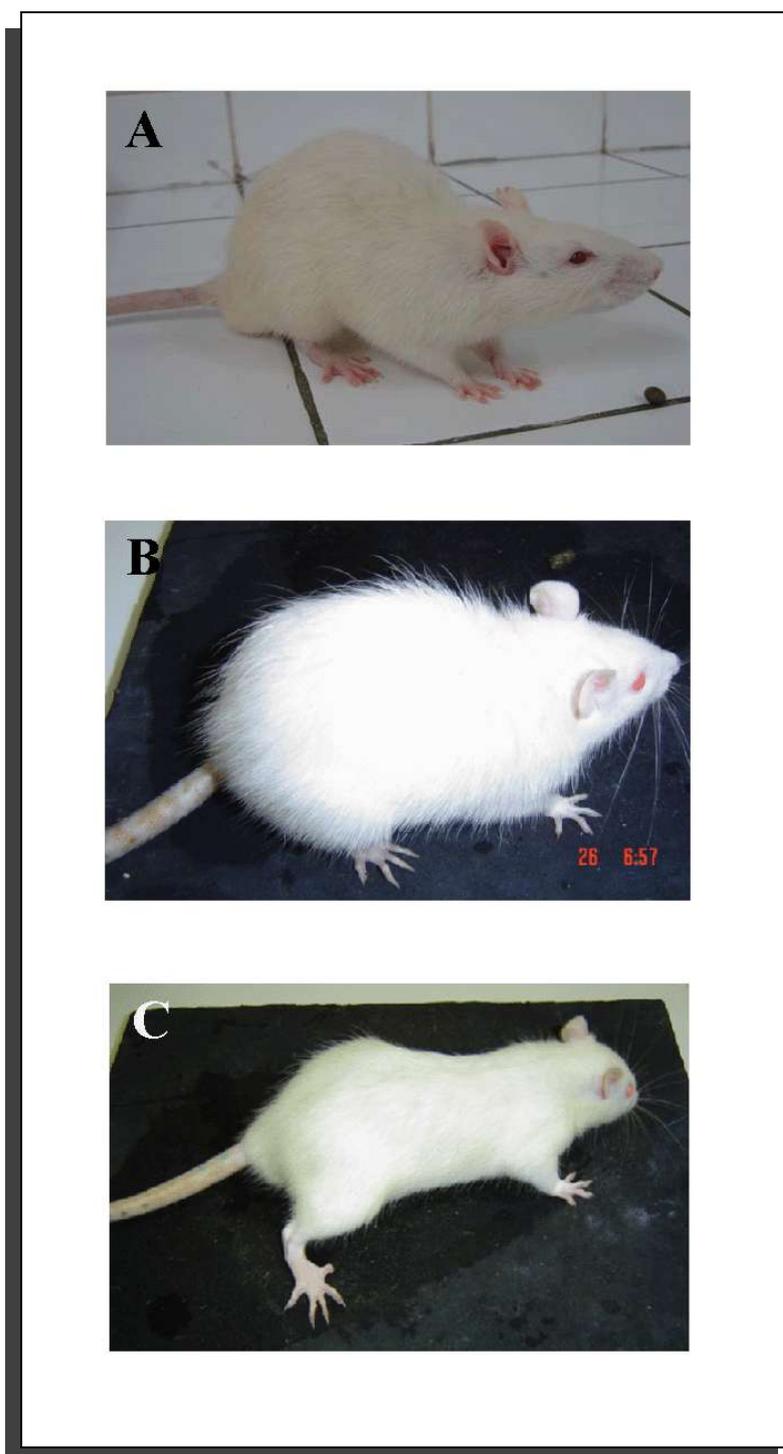


Figura 17. Parâmetros associados à toxicidade em ratos acordados tratados com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina intravenosa. (A) Dorso arqueado. (B) Piloereção. (C) Marcha neuropática tipo *toe-walking gait*.

Protocolo 2

2.1. Estudo da inibição farmacológica (com guanetidina) do sistema nervoso simpático sobre as alterações no esvaziamento gástrico e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados induzidas pelo tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

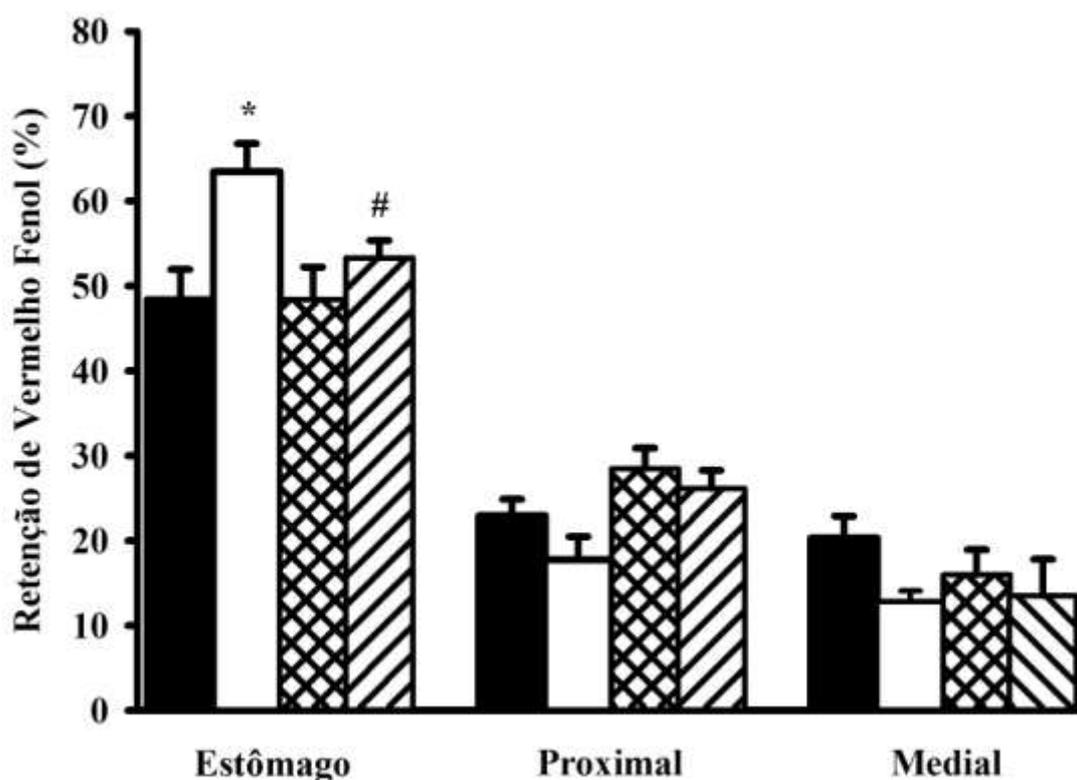
2.1.1. Cisplatina

Conforme pode ser observado no gráfico 21, houve diferença estatística entre a retenção gástrica de corante em ratos pré tratados com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina e submetidos ao bloqueio simpático com guanetidina 10 mg/kg intraperitoneal ($53,3 \pm 2,0\%$), quando comparada com a retenção em animais tratados com cisplatina ($63,5 \pm 3,3$) ($p > 0,05$). Não houve diferença entre os segmentos intestinais proximais ($26,1 \pm 2,1\%$ vs. $17,7 \pm 2,7\%$), mediais ($13,5 \pm 4,2$ vs. $12,8 \pm 1,3\%$) e distais ($6,3 \pm 2,0$ vs. $9,6 \pm 3,0\%$) ($p > 0,05$).

2.1.2. Vincristina

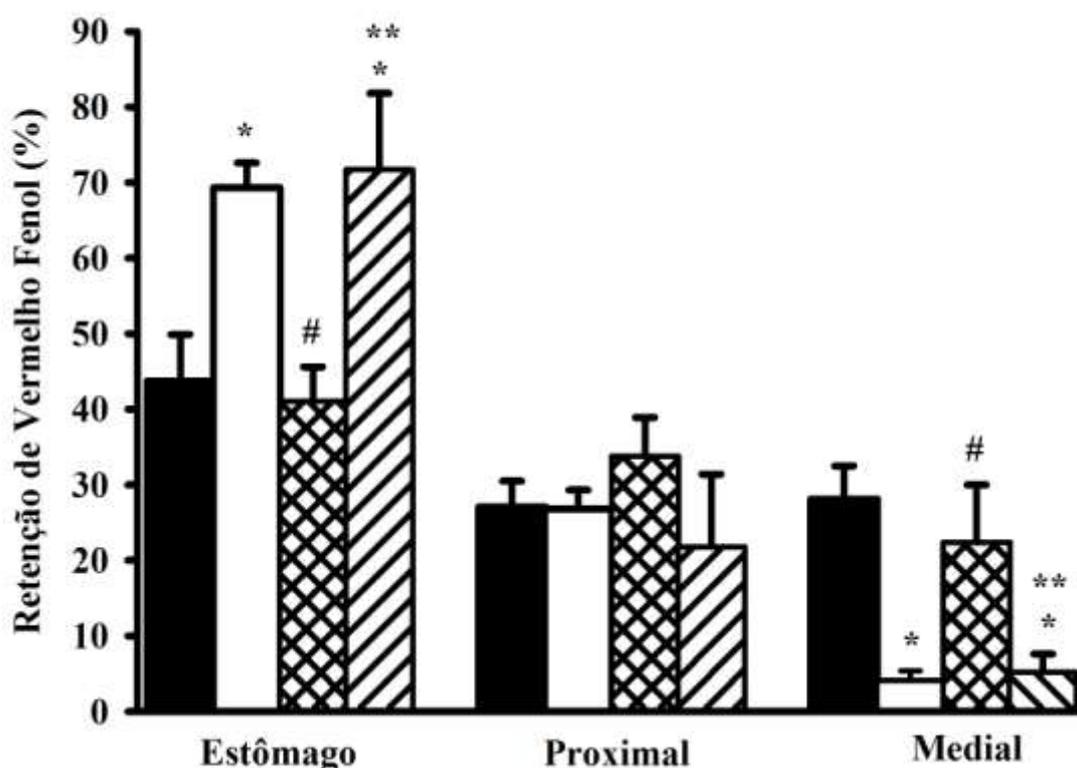
Conforme pode ser observado no gráfico 22, não houve diferença estatística entre a retenção gástrica de corante em ratos pré tratados com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina e submetidos ao bloqueio simpático com guanetidina 10 mg/kg intraperitoneal ($71,7 \pm 10,1\%$), quando comparada com a retenção em animais tratados com vincristina ($69,3 \pm 3,3\%$) ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os segmentos intestinais proximais ($21,8 \pm 9,6\%$ vs. $26,8 \pm 2,5\%$), mediais ($5,2 \pm 2,4\%$ vs. $4,1 \pm 1,3\%$) e distais ($1,1 \pm 0,8\%$ vs. $0,3 \pm 0,3\%$) ($p > 0,05$).

Gráfico 21. Efeito da depleção da função do sistema nervoso simpático com guanetidina sobre a retenção gástrica e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados, tratados com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina ou solução salina intravenosa em dias consecutivos.



Retenção gástrica e do intestino delgado (proximal, media) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=10) (□) ou solução salina (N=9) (■) intravenosa em dias consecutivos e bloqueio simpático com guanetidina 10 mg/kg intraperitoneal com (▨) ou sem (▩) tratamento prévio com cisplatina. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de cisplatina ou salina, 1 h após o bloqueio simpático com guanetidina e 10 min após a administração, mediante gavagem, da refeição-teste (1,5 mL de 0,5 mg/mL de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). As barras representam à média dos valores de retenção do corante de cada segmento do trato gastrointestinal e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo salina; #, $p < 0,05$ vs. subgrupo cisplatina ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Gráfico 22. Efeito da depleção da função do sistema nervoso simpático com guanetidina sobre a retenção gástrica e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados, tratados com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina ou solução salina intravenosa em dias alternados.



Retenção gástrica e do intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (N=12) (□) ou solução salina (N=10) (■) intravenosa em dias alternados e bloqueio simpático com guanetidina 10 mg/kg intraperitoneal com (▨) ou sem (▩) tratamento prévio com vincristina. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de vincristina ou salina, 1 h após o bloqueio simpático com guanetidina e 10 min após a administração, mediante gavagem, da refeição-teste (1,5 mL de 0,5 mg/mL de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). As barras representam a média dos valores de retenção do corante de cada segmento do trato gastrintestinal e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo salina; #, $p < 0,05$ vs. subgrupo vincristina; **, $p < 0,05$ vs. subgrupo guanetidina ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Protocolo 3

3.1. Estudo hemodinâmico em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

3.1.1. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de fenilefrina em animais tratados com cisplatina

3.1.1.1. Parâmetros cardiovasculares (pré-tratamento com fenilefrina)

Na avaliação dos parâmetros hemodinâmicos após o tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina ou solução salina, foi verificado que os níveis basais da PAM (Pressão Arterial Média) dos animais experimentais (N=4) não apresentavam diferença estatística quando comparados com os animais controles (N=4) ($117,8 \pm 7,9$ mmHg vs. $121,2 \pm 4,8$ mmHg) ($p > 0,05$). Também não houve diferença na FC (Frequência Cardíaca) basal entre o subgrupo de animais que recebeu cisplatina ($336,0 \pm 6,7$ b.p.m.) e o subgrupo de animais controle ($351,2 \pm 12,4$ b.p.m.) ($p > 0,05$) (Gráfico 23).

3.1.1.2. Tratamento com fenilefrina

Após a administração do agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$ intravenosa), houve diferença estatística nos níveis da PAM no grupo tratado com cisplatina ($117,8 \pm 7,9$ mmHg vs. $146,5 \pm 8,8$ mmHg) ($p > 0,05$) e no grupo controle ($121,2 \pm 4,8$ mmHg vs. $155,5 \pm 5,1$ mmHg) ($p < 0,05$).

Quanto à variação da PAM nestes dois subgrupos, após o estímulo adrenérgico com fenilefrina, houve semelhança estatística nos ratos tratados com cisplatina ($28,6 \pm 6,0$ mmHg) e nos tratados com salina ($34,2 \pm 5,5$ mmHg) ($p > 0,05$). Estes resultados estão ilustrados no gráfico 23.

3.1.1.3. Estudo do baroreflexo (após fenilefrina)

Conforme ilustrado no gráfico 23, a resposta autonômica caracterizada pela redução da FC induzida pelo agonista α_1 -adrenérgico com fenilefrina $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ intravenosa foi

identificada no subgrupo tratado com cisplatina ($336,0 \pm 6,7$ b.p.m. vs. $211,9 \pm 28,4$ b.p.m.) ($p > 0,05$), porém no subgrupo controle esta redução não foi significativa ($351,2 \pm 12,4$ b.p.m. vs. $307,3 \pm 12,4$ b.p.m.) ($p > 0,05$).

Entretanto, a redução média da FC nos animais experimentais foi de $-124,0 \pm 22,1$ b.p.m., superior à encontrada no subgrupo de ratos tratados com salina, que foi da ordem de $43,8 \pm 4,7$ b.p.m. ($p < 0,05$). Este resultado está ilustrado no gráfico 24.

O ganho (Gráfico 25), calculado como a razão entre a variação da FC e a variação da PAM após estímulo com α_1 -adrenérgico, foi superior nos animais submetidos ao tratamento com cisplatina ($-5,2 \pm 1,6$ b.p.m./mmHg), quando comparado com os animais controle ($-1,4 \pm 0,3$ b.p.m./mmHg) ($p < 0,05$).

Gráfico 23. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de fenilefrina 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina.

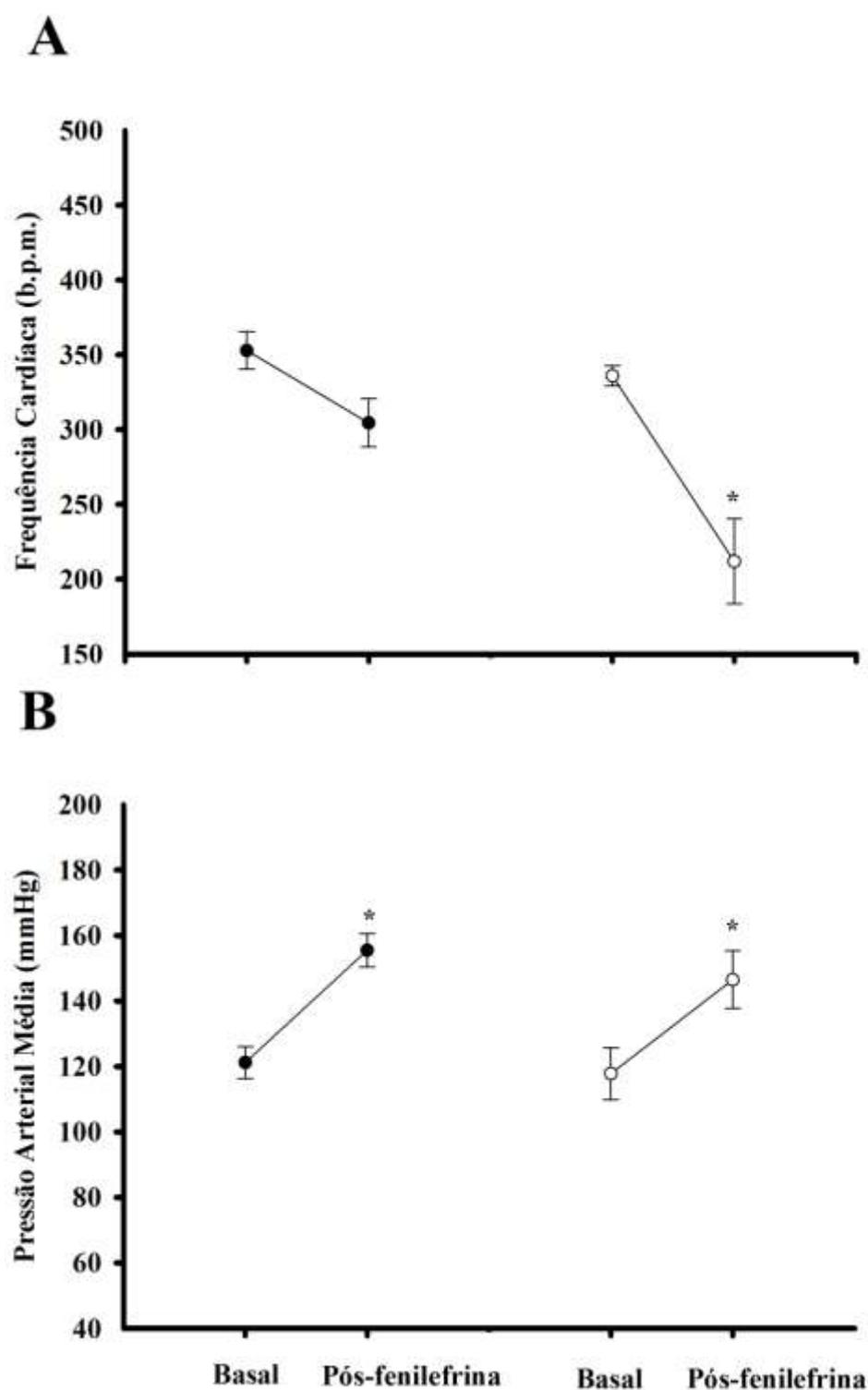
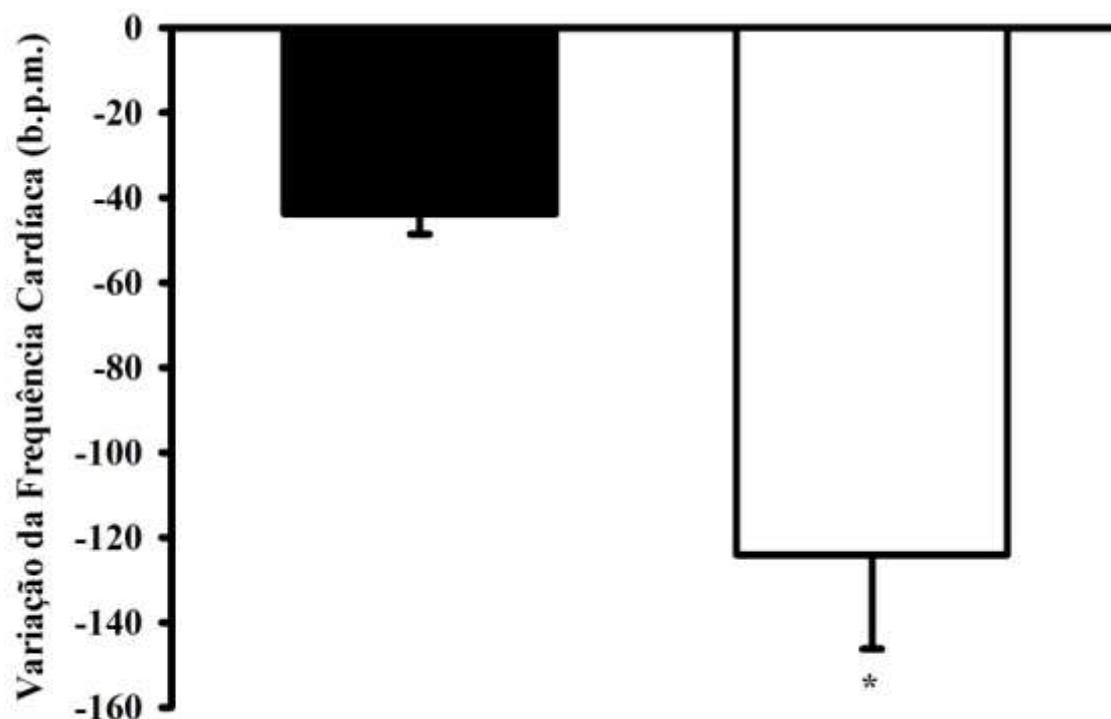
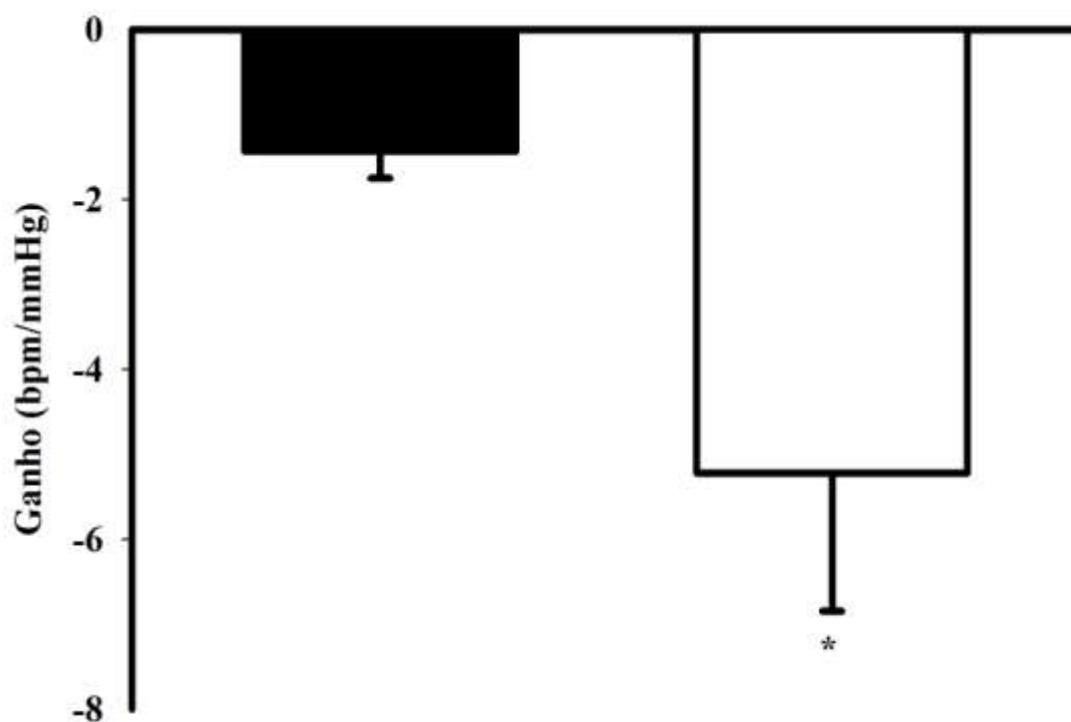


Gráfico 24. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina.



Variação da frequência cardíaca em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=4) (□) ou solução salina (N=4) (■) intravenosa em dias consecutivos e com agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina 5 µg/kg intravenosa. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de cisplatina ou salina. As frequências cardíacas foram mensuradas antes (basal) e após o estímulo simpático máximo induzido pela fenilefrina. As barras representam as médias das variações da frequência cardíaca e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste “t” de Student-Newman-Keuls.

Gráfico 25. Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a da pressão arterial) após a administração intravenosa de fenilefrina 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina.



Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a variação da pressão arterial média) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=4) (□) ou solução salina (N=4) (■) intravenosa em dias consecutivos e com agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intravenosa. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de cisplatina ou salina. As frequências cardíacas e as pressões arteriais médias foram mensuradas antes (basal) e após o estímulo simpático máximo induzido pela fenilefrina. As barras representam as médias dos ganhos e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste “*t*” de Student-Newman-Keuls.

3.1.2. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de atropina em ratos tratados com cisplatina.

3.1.2.1. Parâmetros cardiovasculares (pré-tratamento com atropina)

Os níveis da PAM e da FC basal, antes dos testes com atropina, eram semelhantes no subgrupo de animais tratados com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=5) ou salina (N=5) ($115,4 \pm 2,7$ vs. $110,1 \pm 4,0$ mmHg e $349,8 \pm 12,7$ b.p.m. vs. $335,3 \pm 22,7$ b.p.m., respectivamente) ($p > 0,05$) (Gráfico 26).

3.1.2.2. Tratamento com atropina

A comparação entre os níveis da PAM antes e após o tratamento com atropina 0,5 mg/kg intravenosa, ilustrada no gráfico 26, não revelou diferença significativa no subgrupo de animais experimentais ($115,4 \pm 2,7$ mmHg vs. $111,2 \pm 2,3$ mmHg) ou no subgrupo controle ($110,1 \pm 4,0$ mmHg vs. $102,6 \pm 7,2$ mmHg) ($p > 0,05$).

Quanto à variação da PAM mensurada antes e após o bloqueio parassimpático com atropina, houve uma tendência à redução nos níveis destas em ambos os subgrupos de animais. Entretanto, não houve diferença estatística entre a variação da PAM nos animais tratados com cisplatina ($-4,1 \pm 1,3$ mmHg) e nos que receberam salina ($-7,5 \pm 3,6$ mmHg) ($p > 0,05$).

3.1.2.3. Estudo do baroreflexo (após atropina)

O bloqueio parassimpático com atropina 0,5 mg/kg resultou em um aumento não significativo na FC basal em animais tratados com cisplatina ($349,8 \pm 12,7$ b.p.m. vs. $406,5 \pm 18,1$) e em animais tratados com salina ($335,3 \pm 22,7$ b.p.m. vs. $378,2 \pm 26,5$ b.p.m.) ($p > 0,05$). Estes resultados estão ilustrados no gráfico 26.

Entretanto, conforme ilustrado no gráfico 27, a variação da FC após o tratamento com atropina foi superior nos animais do subgrupo experimental ($56,6 \pm 13,7$ b.p.m.) quando comparada à do subgrupo controle ($42,9 \pm 6,5$ b.p.m.), porém este aumento não foi significativo ($p > 0,05$).

O ganho (Gráfico 28), calculado como a razão entre a variação da FC e a variação da PAM após estímulo com atropina, foi superior nos animais submetidos ao tratamento com cisplatina ($-15,4 \pm 2,4$ b.p.m/mmHg), quando comparado com os animais controle ($-3,8 \pm 3,7$ b.p.m/mmHg) ($p < 0,05$).

Gráfico 26. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina.

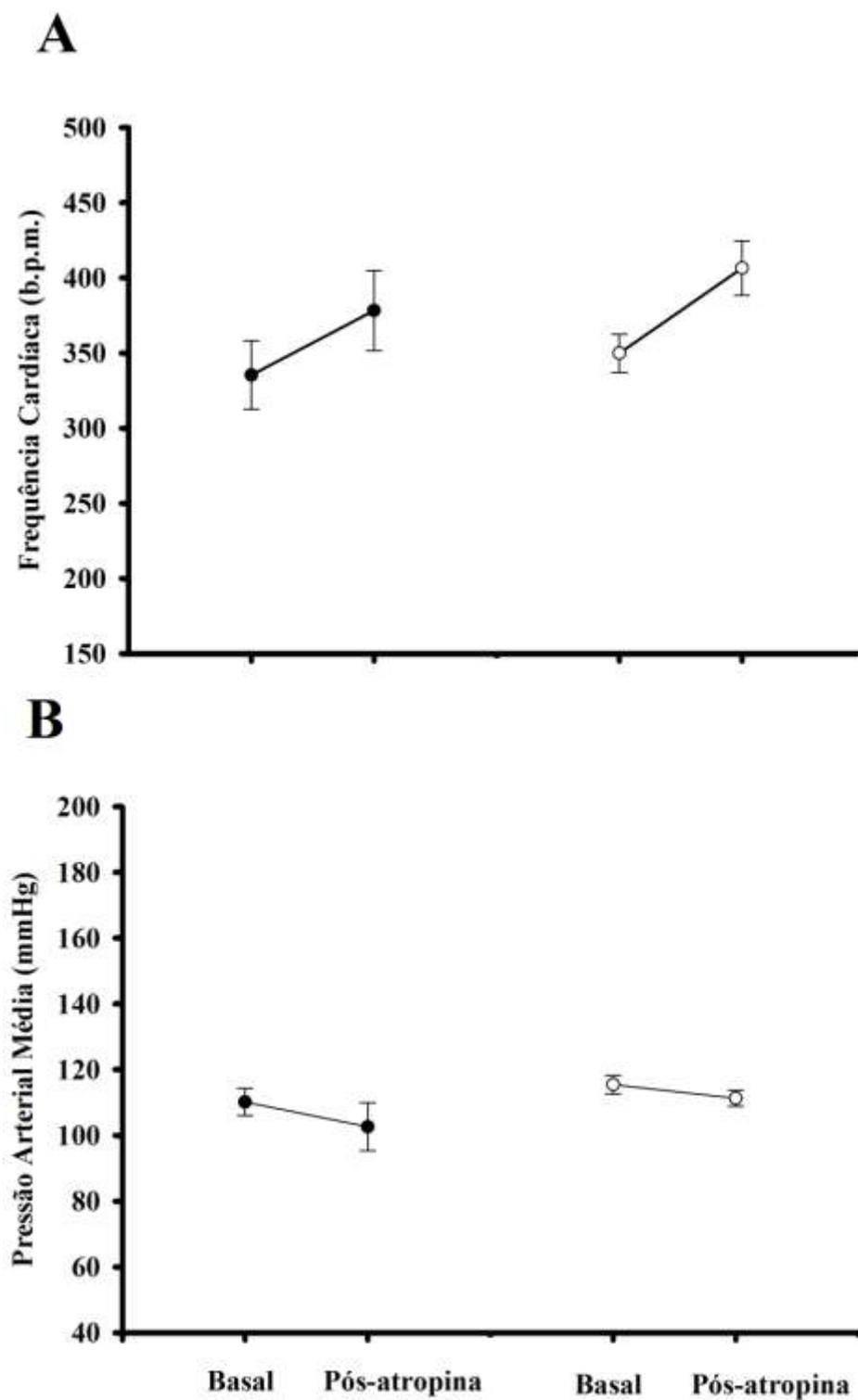
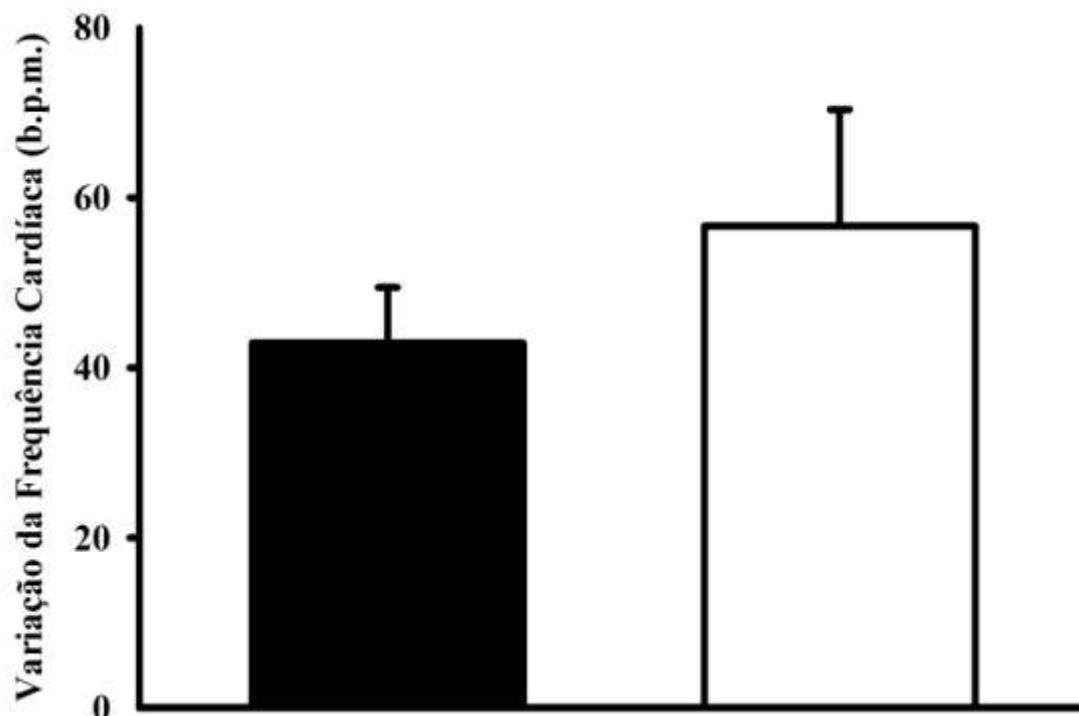
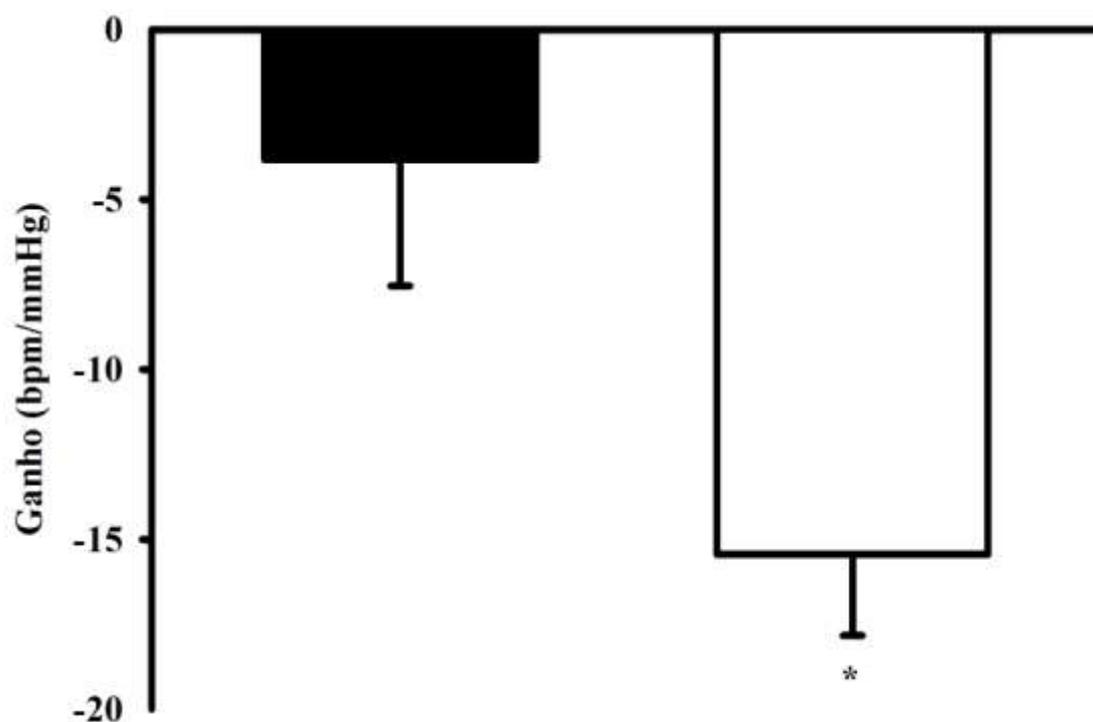


Gráfico 27. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina.



Variação da frequência cardíaca em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=5) (□) ou solução salina (N=5) (■) intravenosa em dias consecutivos e ao bloqueio parassimpático com atropina 0,5 mg/kg intravenosa. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de cisplatina ou salina. As frequências cardíacas foram mensuradas antes (basal) e após o bloqueio parassimpático e as variações destas calculadas durante o efeito máximo da atropina. As barras representam as médias das variações da frequência cardíaca e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste “*t*” de Student-Newman-Keuls.

Gráfico 28. Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a da pressão arterial) após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg ou salina.



Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a variação da pressão arterial média) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina (N=5) (□) ou solução salina (N=5) (■) intravenosa em dias consecutivos e com atropina 0,5 mg/kg intravenosa. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de cisplatina ou salina. As frequências cardíacas e as pressões arteriais médias foram mensuradas antes (basal) e após o estímulo parassimpático máximo induzido pela atropina. As barras representam as médias dos ganhos e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste “*t*” de Student-Newman-Keuls.

3.1.3. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de fenilefrina em animais tratados com vincristina

3.1.3.1. Parâmetros cardiovasculares (pré-tratamento com fenilefrina)

Na avaliação dos parâmetros hemodinâmicos após o tratamento com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina ou solução salina, foi verificado que os níveis basais da PAM dos animais experimentais (N=6) não apresentavam diferença estatística quando comparados com os animais controles (N=5) ($128,9 \pm 7,2$ mmHg vs. $112,9 \pm 12,4$ mmHg) ($p > 0,05$). Também não houve diferença na FC basal entre o subgrupo de animais que recebeu vincristina ($335,3 \pm 15,4$ b.p.m.) e o subgrupo de animais controle ($333,9 \pm 17,2$ b.p.m.) ($p > 0,05$).

3.1.3.2. Tratamento com fenilefrina

Após a administração do agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina (5 µg/kg intravenosa), houve um aumento significativo nos níveis da PAM no grupo tratado com vincristina ($128,9 \pm 7,2$ mmHg vs. $161,3 \pm 4,2$ mmHg) ($p < 0,05$), assim como também no grupo controle ($112,9 \pm 12,4$ mmHg vs. $154,3 \pm 4,0$ mmHg) ($p < 0,05$). Estes resultados estão ilustrados no gráfico 29.

Quanto à variação da PAM nestes dois subgrupos, após o estímulo adrenérgico com fenilefrina, houve semelhança estatística nos ratos tratados com vincristina ($32,3 \pm 5,8$ mmHg) e nos tratados com salina ($41,4 \pm 11,4$ mmHg) ($p > 0,05$).

3.1.3.3. Estudo do baroreflexo (após fenilefrina)

Conforme ilustrado no gráfico 27, a resposta autonômica caracterizada pela redução da FC induzida pelo agonista α_1 -adrenérgico com fenilefrina 5 µg/kg intravenosa foi identificada no subgrupo tratado com vincristina ($335,3 \pm 15,4$ b.p.m. vs. $262,7 \pm 14,4$ b.p.m.) e no subgrupo controle ($333,9 \pm 17,2$ b.p.m. vs. $306,1 \pm 12,3$ b.p.m.) ($p < 0,05$).

Entretanto, a redução média da FC nos animais experimentais foi de $72,5 \pm 14,2$ b.p.m., superior à encontrada no subgrupo de ratos tratados com salina, que foi da ordem de $27,7 \pm 9,6$ b.p.m. ($p < 0,05$). Este resultado está ilustrado no gráfico 30.

O ganho (Gráfico 31), calculado como a razão entre a variação da FC e a variação da PAM após estímulo com α_1 -adrenérgico, foi superior nos animais submetidos ao tratamento com vincristina ($-2,3 \pm 0,4$ b.p.m/mmHg), quando comparado com os animais controle ($-0,7 \pm 0,3$ b.p.m/mmHg) ($p < 0,05$).

Gráfico 29. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina.

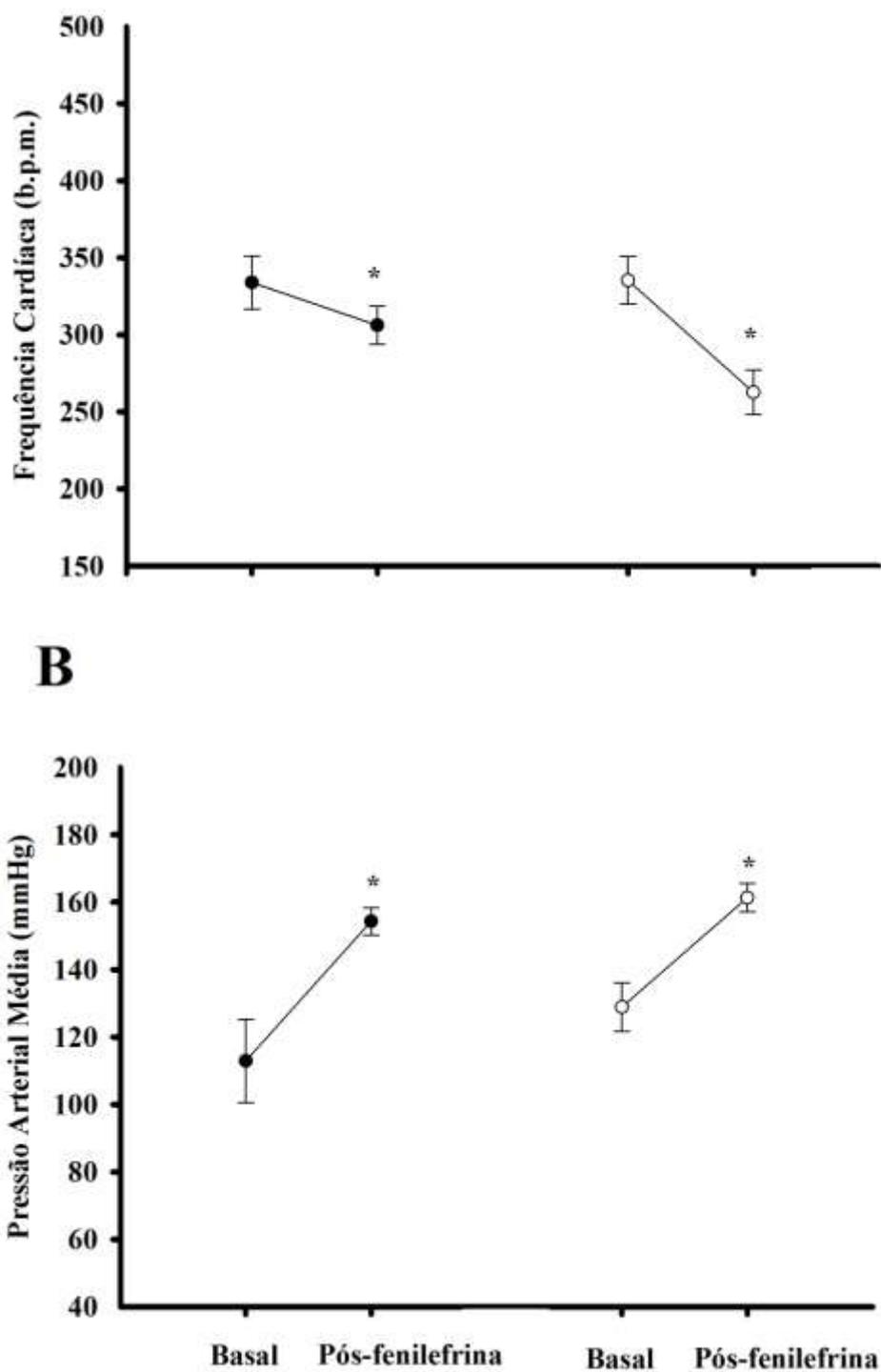
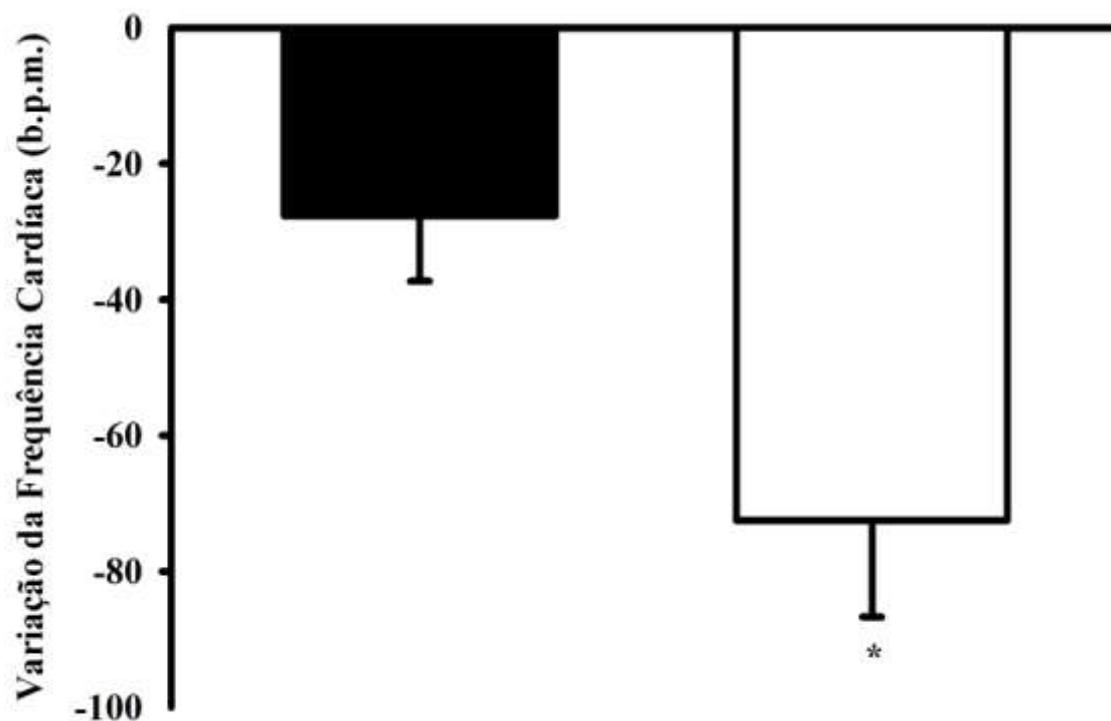
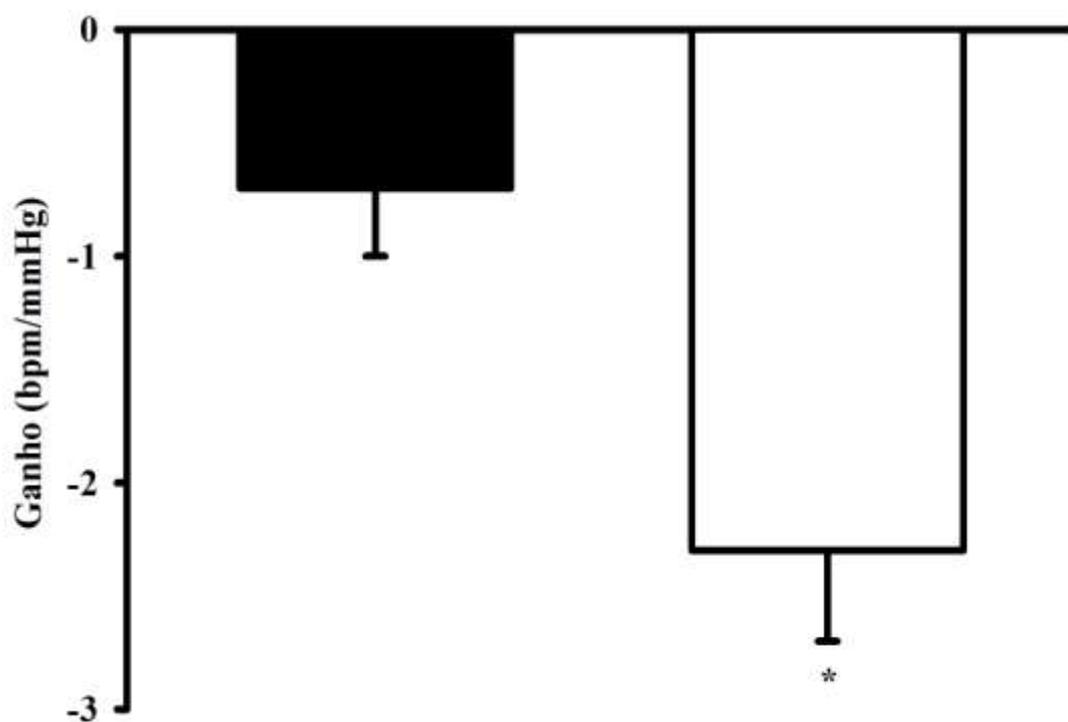


Gráfico 30. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de fenilefrina 5 µg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina.



Variação da frequência cardíaca em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina (N=6) (□) ou solução salina (N=5) (■) intravenosa em dias alternados e com agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina 5 µg/kg intravenosa. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de vincristina ou salina. As frequências cardíacas foram mensuradas antes (basal) e após o estímulo simpático máximo induzido pela fenilefrina. As barras representam as médias das variações da frequência cardíaca e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste “*t*” de Student-Newman-Keuls.

Gráfico 31. Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a da pressão arterial) após a administração intravenosa de fenilefrina 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou salina.



Ganho (razão entre a variação da frequência cardíaca e a variação da pressão arterial média) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (N=6) (\square) ou solução salina (N=5) (\blacksquare) intravenosa em dias alternados e com agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intravenosa. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de vincristina ou salina. As frequências cardíacas e as pressões arteriais médias foram mensuradas antes (basal) e após o estímulo simpático máximo induzido pela fenilefrina. As barras representam as médias dos ganhos e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste “*t*” de Student-Newman-Keuls.

3.1.4. Estudo da resposta cardiovascular ao desafio pela administração de atropina em ratos tratados com vincristina.

3.1.4.1. Parâmetros cardiovasculares (pré-tratamento com atropina)

Os níveis da PAM e a FC basal, antes dos testes com atropina, eram semelhantes no subgrupo de animais tratados com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina (N=7) ou salina (N=6) ($129,1 \pm 6,0$ mmHg vs. $113,1 \pm 9,8$ mmHg e $353,2 \pm 15,0$ b.p.m. vs. $322,1 \pm 21,6$ b.p.m., respectivamente) ($p > 0,05$).

3.1.4.2. Tratamento com atropina

A comparação entre os níveis da PAM antes e após o tratamento com atropina 0,5 mg/kg intravenosa, ilustrada no gráfico 32, não revelou diferença significativa no subgrupo de animais experimentais ($129,1 \pm 6,0$ mmHg vs. $126,9 \pm 7,9$ mmHg) ou no subgrupo controle ($113,1 \pm 9,8$ mmHg vs. $105,4 \pm 12,7$ mmHg) ($p > 0,05$).

Quanto à variação da PAM mensurada antes e após o bloqueio parassimpático com atropina, houve uma tendência à redução nos níveis destas em ambos os subgrupos de animais. Entretanto, não houve diferença estatística entre a variação da PAM nos animais tratados com vincristina ($-2,1 \pm 2,7$ mmHg) e nos que receberam salina ($-3,1 \pm 5,3$ mmHg) ($p > 0,05$) (Gráfico 32).

3.1.4.3. Estudo do baroreflexo (após atropina)

O bloqueio parassimpático com atropina 0,5 mg/kg resultou em um aumento significativo na FC basal em animais tratados com vincristina ($353,2 \pm 15,0$ b.p.m. vs. $466,4 \pm 16,4$ b.p.m.) e em animais tratados com salina ($322,1 \pm 21,6$ b.p.m. vs. $372,8 \pm 29,0$ b.p.m.) ($p < 0,05$). Estes resultados estão ilustrados no gráfico 32.

Entretanto, conforme ilustrado no gráfico 33, a variação da FC após o tratamento com atropina foi significativamente superior nos animais do subgrupo experimental ($113,2 \pm 19,6$ b.p.m.) quando comparada à do subgrupo controle ($44,1 \pm 17,8$ b.p.m.) ($p < 0,05$).

Gráfico 32. Pressão arterial média e frequência cardíaca antes (basal) e após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina.

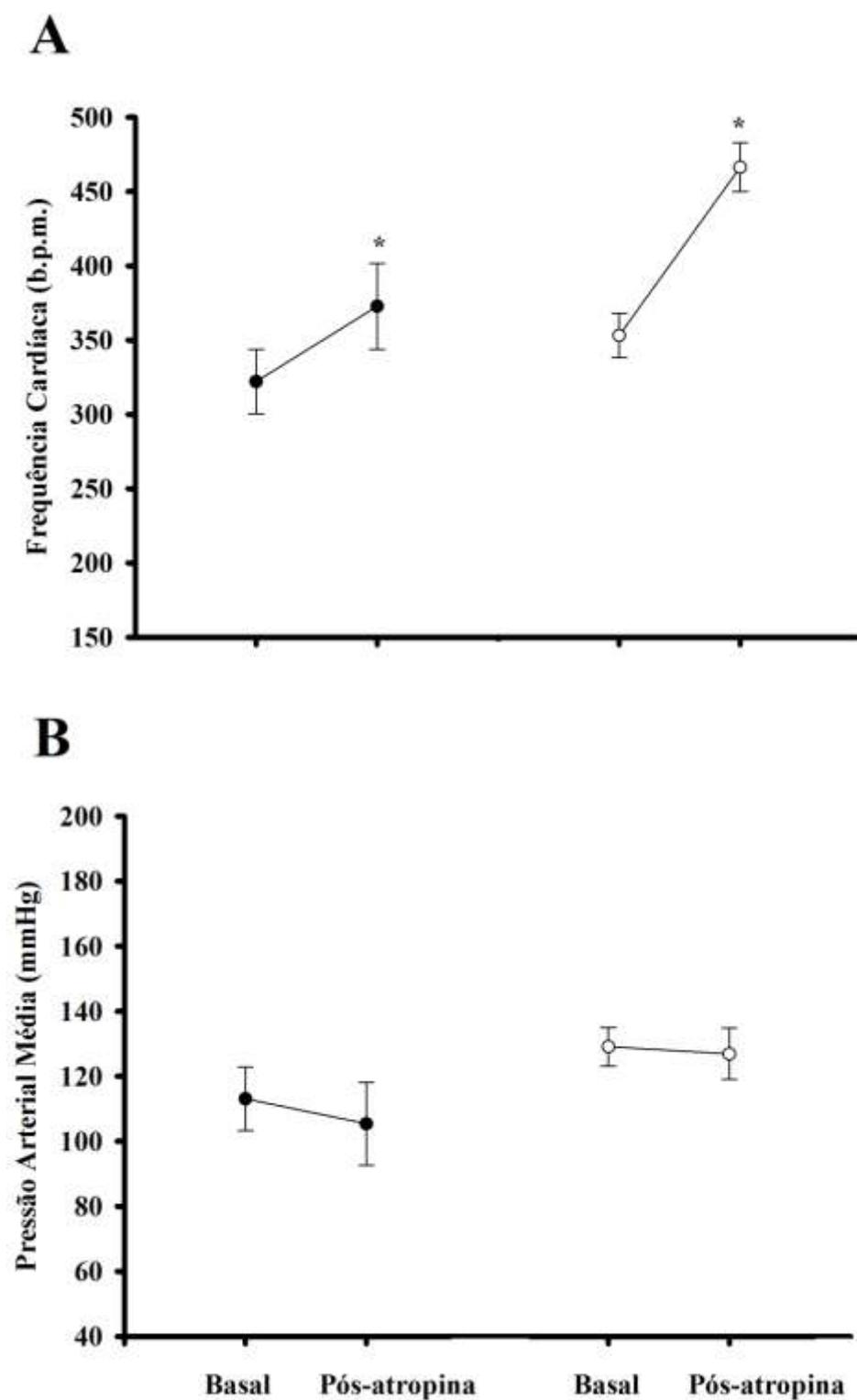
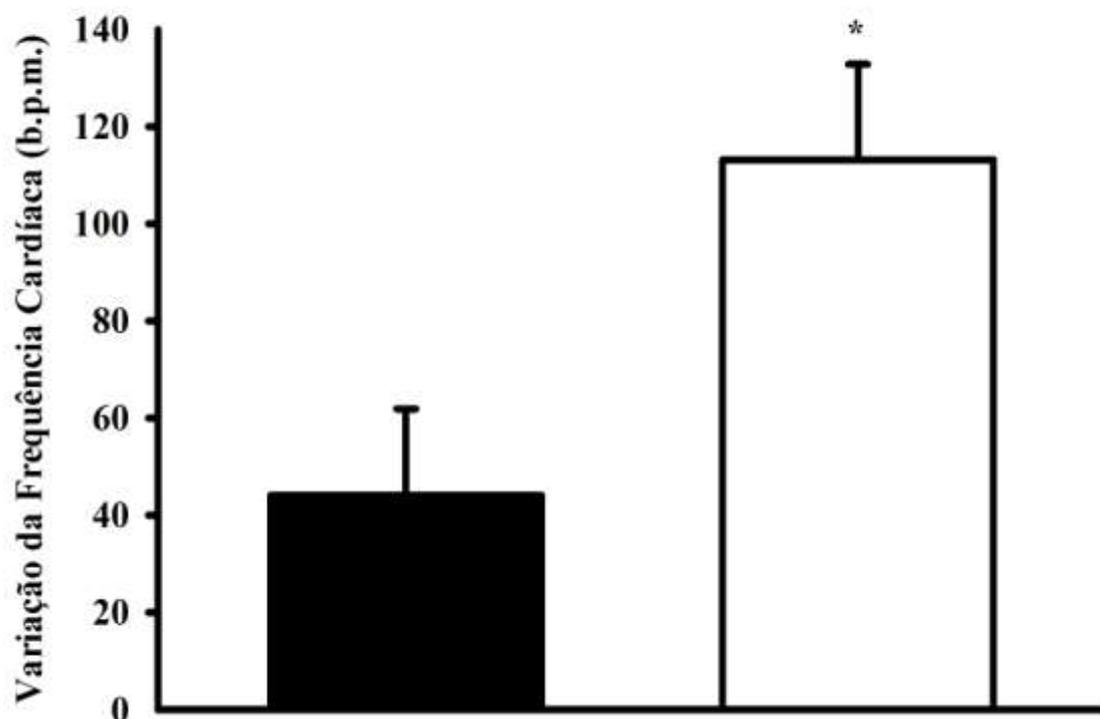


Gráfico 33. Variação da frequência cardíaca após a administração intravenosa de atropina 0,5 mg/kg em ratos acordados e tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg ou salina.



Variação da frequência cardíaca em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina (N=7) (□) ou solução salina (N=6) (■) intravenosa em dias alternados e ao bloqueio parassimpático com atropina 0,5 mg/kg intravenosa. Os animais foram estudados 24 h após a última dose de vincristina ou salina. As frequências cardíacas foram mensuradas antes (basal) e após o bloqueio parassimpático e as variações destas calculadas durante o efeito máximo da atropina. As barras representam as médias das variações da frequência cardíaca e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. subgrupo controle (salina) ao Teste “*t*” de Student-Newman-Keuls.

3.1.5. Volemia em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

Na avaliação da volemia após o tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina, foi verificado que o volume plasmático não apresentava diferença estatística quando comparado com os animais controles (N=4) ($13,9 \pm 2,8$ ml vs. $20,8 \pm 5,2$ ml) ($p>0,05$). Também não houve diferença no volume sanguíneo total entre o subgrupo de animais que recebeu cisplatina ($19,1 \pm 3,9$ ml) e o subgrupo de animais controle ($28,4 \pm 7,2$ ml) ($p>0,05$).

Nos animais tratados com 5 doses de 150 μ g/kg de vincristina também não houve diferença estatística no volume plasmático e volume sanguíneo ($17,3 \pm 7,0$ ml e $23,1 \pm 9,7$ ml, respectivamente) quando comparado ao grupo subcontrole (tabela 1).

Tabela 1. Volume plasmático e volume sanguíneo total após administração intravenosa de 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina em dias consecutivos, de 5 doses de 150 µg/kg de vincristina em dias alternados ou de salina (controle) em ratos.

| | Hematócrito | Volume Plasmático | Volume Sanguíneo |
|----------------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Controle | 37,33 ± 1,2 | 20,84 ± 5,2 | 28,44 ± 7,2 |
| Cisplatina 5 x 1 mg/kg | 38,05 ± 0,4 | 13,98 ± 2,8 | 19,18 ± 3,9 |
| Vincristina 5 x 150 µg/kg | 34,26 ± 2,7 | 17,31 ± 7,0 | 23,15 ± 9,7 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM para 4 ratos em cada grupo. One-way Repeated Measures Analysis of Variance (ANOVA RM).

Protocolo 4

4.1. Disfunção sensitiva periférica (somática e visceral) em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenoso com cisplatina ou vincristina.

4.1.1. Disfunção sensitiva somática em ratos submetidos ao tratamento com cisplatina

4.1.1.1. Latência térmica

O tempo de latência do reflexo de retirada da pata causado por estimulação térmica nociva no subgrupo de animais que receberam 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina, antes do tratamento foi $12,8 \pm 0,9$ s (N=5). Não houve alteração significativa deste tempo de latência 24 h após a quinta dose $12,0 \pm 0,8$ s ($p>0,05$), quando comparada aos resultados basais, apesar de os resultados mostrarem uma tendência à redução.

No subgrupo de animais tratados com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina, a latência térmica basal foi mensurada em cinco animais, sendo esta de $11,1 \pm 1,4$ s. Também não houve redução significativa desta, 24 h após a quinta dose ($10,3 \pm 1,0$ s), quando comparada com a latência térmica basal ($p>0,05$), persistindo a tendência à redução. Estes resultados estão ilustrados no gráfico 34.

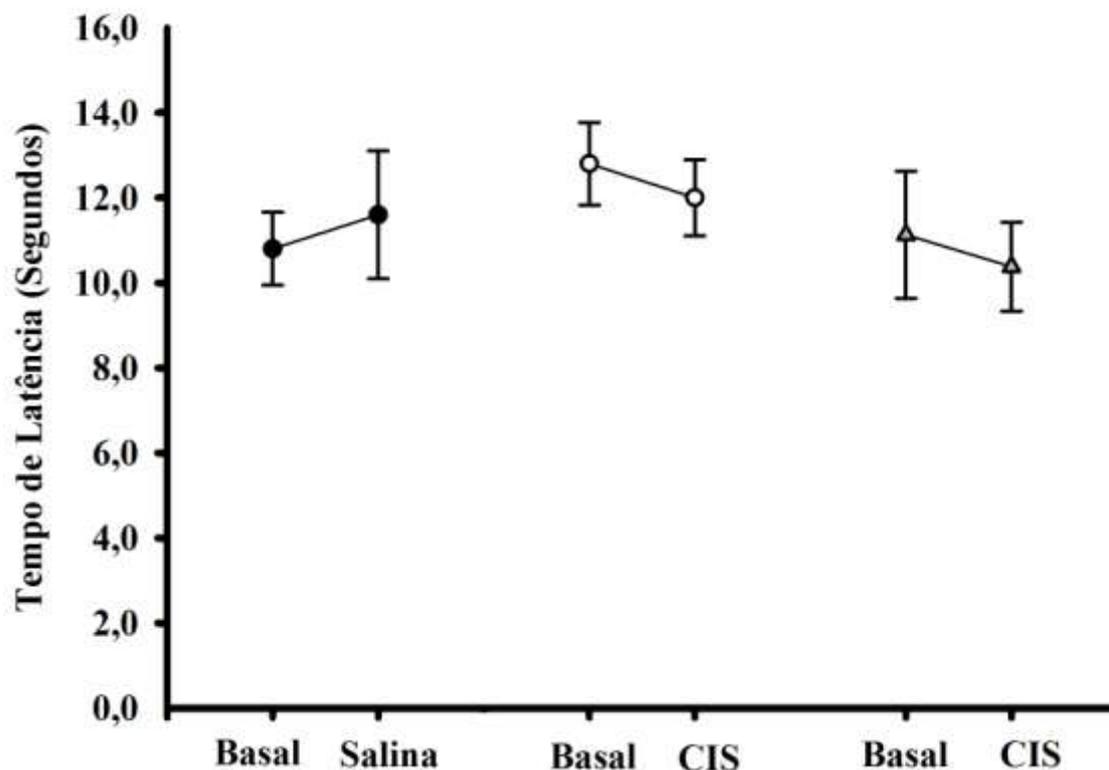
4.1.1.2. Latência mecânica

A reação ao estímulo de pressão, na pata traseira direita dos animais tratados com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina, foi menor que em condição basal. A pressão para a retirada da pata direita no subgrupo de animais que receberam 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina, antes do tratamento foi $56,2 \pm 0,97$ g (N=7). Não houve alteração significativa deste limiar para estímulo mecânico 24 h após a quinta dose ($45,8 \pm 3,60$ g) ($p>0,05$), quando comparada aos resultados basais, apesar de os resultados mostrarem uma tendência à redução. Contudo, em animais avaliados uma semana após a última dose do tratamento com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina, a pressão para a retirada da pata direita reduziu significativamente para $35,8 \pm 3,07$ g, quando comparado aos valores basais (Gráfico 35A).

Na pata traseira esquerda dos animais tratados com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina, não houve alteração significativa deste limiar para estímulo mecânico 24 h após a quinta dose

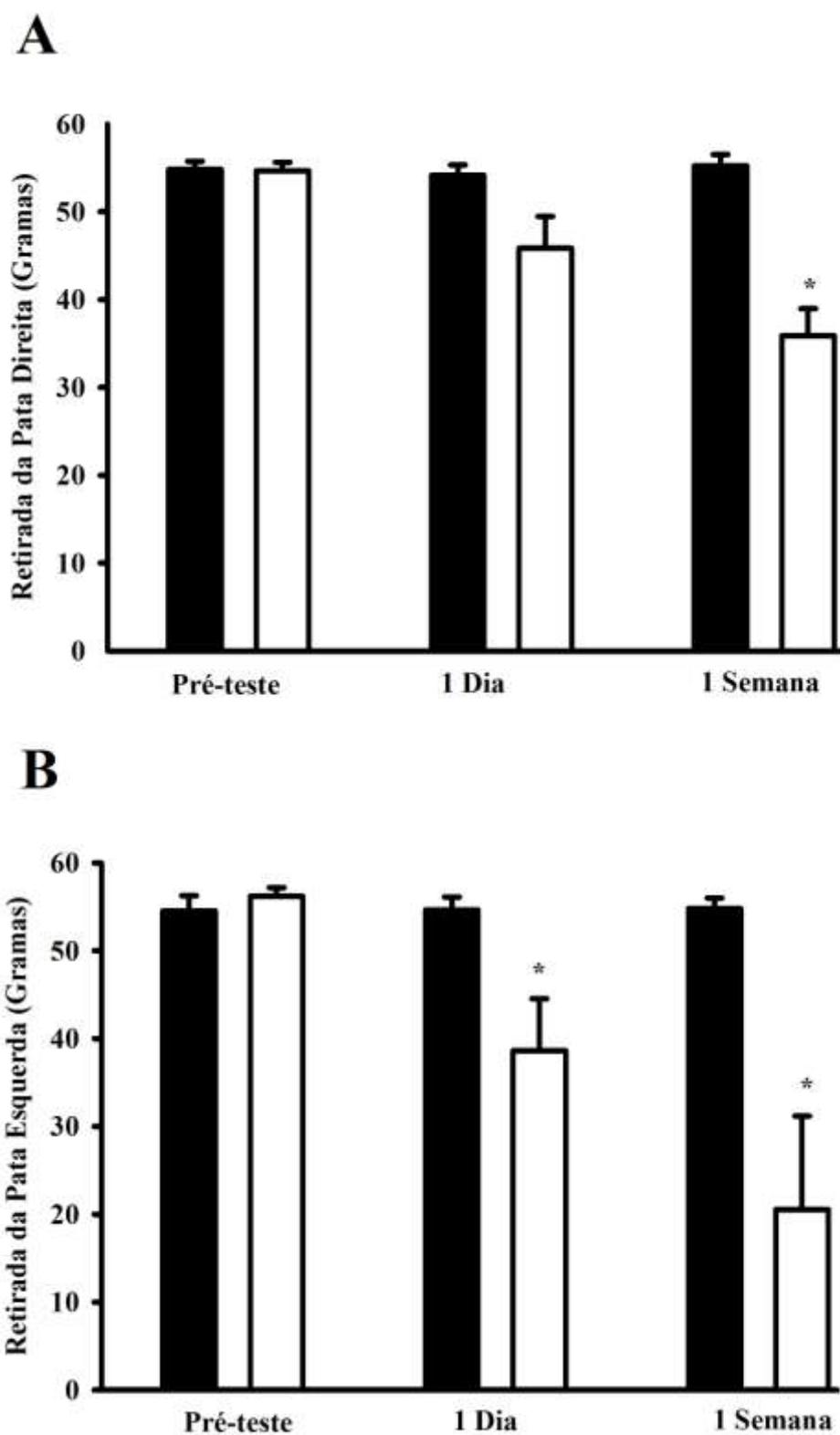
($38,6 \pm 5,90\text{g}$) ($p>0,05$), quando comparada aos resultados basais ($56,2 \pm 0,97\text{g}$), apesar de os resultados mostrarem uma tendência à redução. Contudo, em animais avaliados uma semana após a última dose do tratamento com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina, a pressão para a retirada da pata esquerda reduziu significativamente para $20,5 \pm 10,62\text{g}$, quando comparado aos valores basais (Gráfico 35B).

Gráfico 34. Tempo de latência térmica avaliada 24 h após 5ª dose de 1 mg/kg e 2 mg/kg de cisplatina intravenosa em ratos acordados.



Latência térmica mensurada através do teste da placa quente ($51\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 1 mg/kg ($N=5$) (\circ), 5 doses de 2 mg/kg ($N=5$) (\triangle) de cisplatina (CIS) ou salina (\bullet) intravenosa em dias consecutivos. Os animais foram estudados antes do tratamento (basal) e 24 h após a quinta dose de cisplatina. As barras representam as médias dos valores do tempo de latência térmica e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p<0,05$ vs. pré-tratamento (basal) ao Teste t pareado.

Gráfico 35. Latência da retirada da pata avaliada 1 dia e 1 semana após 5ª dose de 2 mg/kg de cisplatina intravenosa nas patas D e E em ratos acordados.



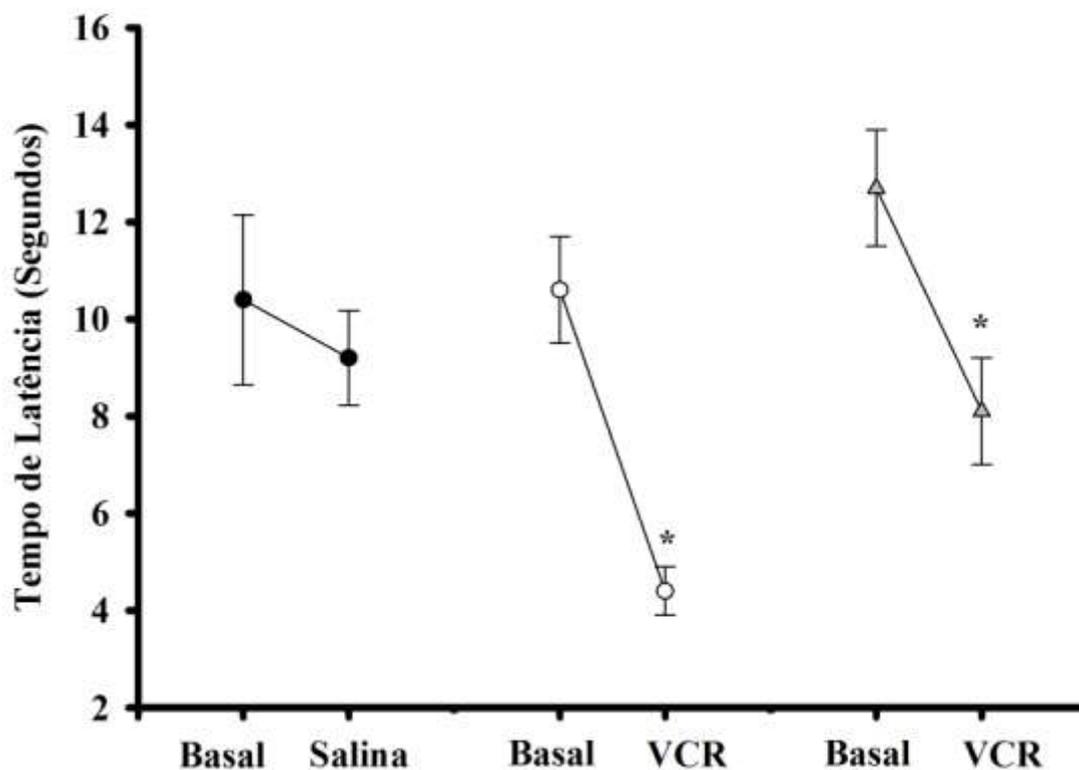
4.1.2. Disfunção sensitiva somática em ratos submetidos ao tratamento com vincristina

4.1.2.1. Latência térmica

O tempo de latência ao calor no subgrupo de animais que receberam 5 doses de 100 µg/kg de vincristina, a latência térmica basal encontrada foi mensurada em cinco animais, sendo esta de $10,6 \pm 1,1$ s. Houve redução significativa desta, 24 h após a primeira ($5,3 \pm 0,9$ s), terceira ($6,1 \pm 0,7$ s) e quinta dose ($4,4 \pm 0,5$ s), quando comparada com a latência térmica basal ($p < 0,05$).

Dentre os ratos que receberam 5 doses de 150 µg/kg, o tempo de latência antes do tratamento foi de $12,7 \pm 1,2$ s (N=6). A diminuição da latência térmica também ocorreu 24 h após a primeira dose de neste subgrupo ($9,7 \pm 0,6$ s) ($p < 0,05$), e persistiu após a terceira ($5,9 \pm 0,3$ s) e após a quinta dose ($8,1 \pm 1,1$ s) em relação à latência pré-tratamento com vincristina ($p < 0,05$). Um animal deste subgrupo foi excluído por apresentar tempo de latência basal superior a 20 s. Estes resultados estão ilustrados no gráfico 36.

Gráfico 36. Tempo de latência térmica avaliada 24 h após 5ª dose de 100 µg/kg e 150 µg/kg de vincristina intravenosa em ratos acordados.



Latência térmica mensurada através do teste da placa quente ($51 \pm 0,5^\circ\text{C}$) em ratos acordados submetidos ao tratamento com 5 doses de 100 µg/kg (N=5) (○), 5 doses de 150 µg/kg (▲) de vincristina (N=6) e salina (●) intravenosa em dias alternados. Os animais foram estudados antes do tratamento (basal), 24 h após a quinta dose de vincristina. As barras representam as médias dos valores do tempo de latência térmica e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ vs. pré-tratamento (basal) ao Teste One-Way ANOVA com Medidas Repetidas e Teste de Holm-Sidak.

4.1.3. Disfunção sensitiva somática em animais com colite induzida por ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS).

O gráfico 37 demonstra o efeito de 4 doses de 150 µg/kg de vincristina na latência térmica de ratos com colite induzida por administração de TNBS dissolvida em etanol. A latência térmica no subgrupo controle ($13,1 \pm 1,7s$ vs. $14,6 \pm 1,03s$) e no subgrupo com colite induzida por etanol ($13,2 \pm 1,21s$ vs. $13,11 \pm 1,19s$) não foi alterada ($p > 0,05$), no subgrupo com neuropatia induzida por vincristina a latência térmica foi reduzida ($8,4 \pm 1,29s$ vs. $14,2 \pm 0,98s$) ($p < 0,05$), a inflamação colônica induzida por TNBS diminuiu também a latência da retirada da pata a estímulo nociceptivo (placa quente) em 63 % quando comparada a respostas basais ($5,1 \pm 0,9s$ vs. $14,0 \pm 1,93s$) ($p < 0,05$) e o efeito da indução da colite, após indução de neuropatia periférica pela administração de vincristina, foi uma redução de 77 % comparada a respostas basais ($3,2 \pm 0,4s$ vs. $14,2 \pm 1,47s$) ($p < 0,05$).

4.1.3.1. Avaliação macroscópica do colon

As lesões macroscópicas de colon induzidas por administração de TNBS dissolvido em etanol em ratos foram avaliadas, o escore de Morris aumentou tanto no subgrupo de animais tratados somente com TNBS, quanto no subgrupo tratado com TNBS após indução de neuropatia por 600 µg/kg vincristina (Tabela 2).

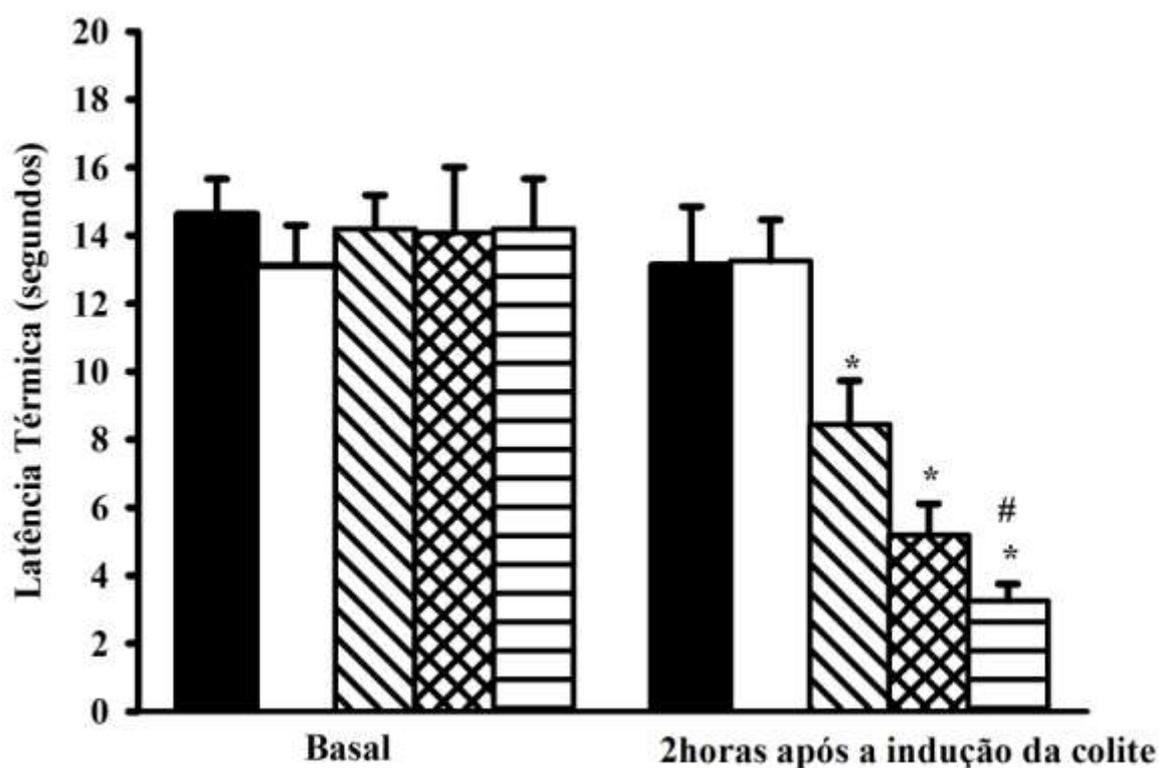
4.1.3.2. Avaliação microscópica do colon

Os escores histológicos também aumentaram no subgrupo de animais tratados somente com TNBS e no subgrupo tratado com TNBS após indução de neuropatia por 600 µg/kg vincristina (Tabela 2), como mostra as alterações estruturais nas secções longitudinais do segmento colorrectal visualizadas da figura 18.

4.1.3.3. Avaliação do peso do colon

Nos ratos com colite induzida por TNBS, o peso do colon foi avaliado, demonstrando que tanto no subgrupo de animais tratados com TNBS, quanto no subgrupo tratado com TNBS após indução de neuropatia por 600 µg/kg vincristina, o peso do colon aumentou significativamente (Tabela 2).

Gráfico 37. Efeito de 4 doses de 150 µg/kg de vincristina na latência térmica de ratos com colite induzida por administração de ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS) dissolvida em etanol.



Colite induzida por TNBS em ratos submetidos ao tratamento prévio com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina (N=6) (▤) ou solução salina (N=6) (▩) intravenosa em dias alternados, comparados aos grupos controle (N=6) (■), colite induzida por etanol (□) (N=5) e neuropatia periférica induzida por vincristina (N=6) (▨). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. *, $p < 0,05$ vs. respectivos subgrupos controles ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak e #, $p < 0,05$ vs. subgrupo salina após indução colite ao teste-t pareado.

Tabela 2. Lesões colônicas macroscópicas e microscópicas e peso colônico em dois modelos de colite em ratos tratados ou não com vincristina (4 doses de 150 µg/kg).

| | Latência térmica (s) | Escore Macroscópicos | Escore Histológicos | Peso colônico (g) |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Grupo Salina | 13,1 ± 1,7 | 0,0 ± 0,0 | 0,3 ± 0,3 | 0,01 ± 1,5 |
| Grupo VCR | 8,4 ± 1,3* | 0,25±0,25 | 0,66± 0,66 | 0,66 ± 0,03 |
| Grupo Etanol | 13,2 ± 1,21 | 1,4±0,50 | 1,1 ± 0,85 | 0,96 ± 0,08 |
| Grupo TNBS | 5,2±0,92* | 7,6 ± 0,8* ^{&} | 14,3 ± 1,8* ^{&} | 3,26 ± 0,31* ^{&} |
| TNBS pré-tratado com VCR | 3,2 ± 0,49* | 9,75 ± 0,25* ^{&} ‡ | 11,66 ± 1,45* ^{&} | 4,89 ± 0,27* ^{&} ‡ |
| Grupo OM | 16,7 ± 2,62* ^{&} | 6,4 ± 1,3* ^{&} | 15,6 ± 0,7* ^{&} | 1,17 ± 0,10 |
| OM pré-tratado com VCR | 14,8 ± 1,38 ^{&} | 2,4 ± 0,8* | 13,4 ± 2,0* ^{&} | 1,38 ± 0,10 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM em grupos de 6 animais. TNBS, 2, 4, 6 – Ácido Sulfônico Trinitrobenzeno; VCR, Vincristine; OM Óleo de Mostarda. *, p<0,05 vs. grupo salina, †, p<0,05 vs. Grupo TNBS, #, p< 0,05 vs. Grupo OM, &, p < 0,05 vs. Grupo Vincristina, ‡, p < 0,05 vs. Grupo Etanol. T- teste e Teste de Holm-Sidak.

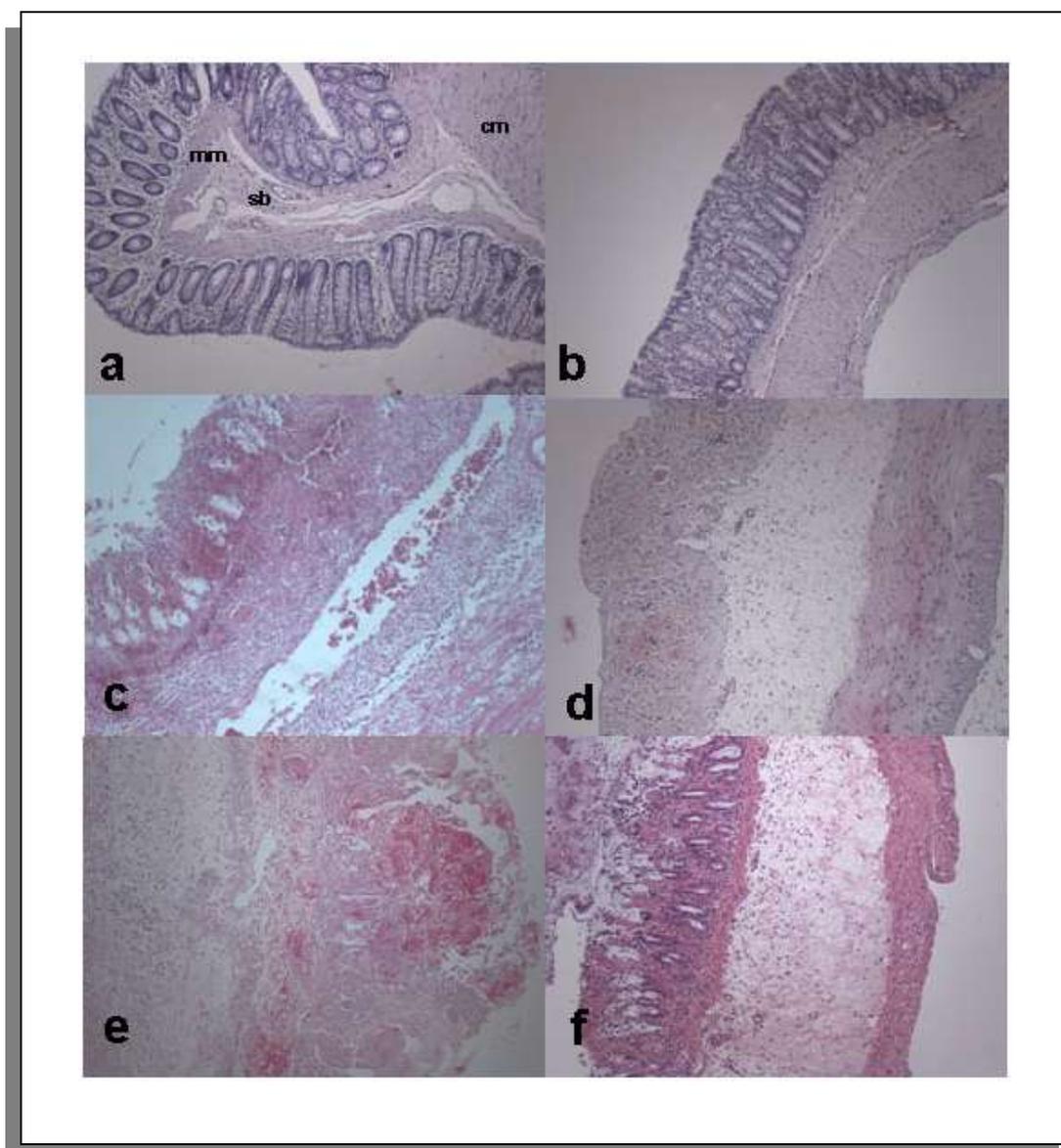


Figura 18. Avaliação Microscópica – Secções longitudinais de lesões do segmento colorectal induzido pela administração transretal de ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS) e óleo de mostarda dissolvido em etanol em ratos previamente tratados com quatro doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vincristina i.v. (A) Membrana da mucosa com criptas Lieberkühn intactas e abundantes células caliciformes. Muscular da mucosa (mm), submucosa (SB), músculo circular (cm). HE 100X (grupo salina). (B) Membrana da mucosa com criptas Lieberkühn intactas e abundantes células caliciformes. HE 100X. (Grupo vincristina). (C) Ulcerações, diminuição de células caliciformes, necrose e infiltrado inflamatório ao longo da parede do cólon inteiro após a indução com TNBS. HE 100X. (D) Ulcerações na mucosa, diminuição de células caliciformes, necrose e infiltrado inflamatório ao longo da parede do cólon inteiro após a indução com OM. HE 100X. (E) Ulcerações na mucosa, diminuição de células caliciformes, necrose e infiltrado inflamatório ao longo da parede do cólon inteiro após a indução com TNBS em ratos previamente tratados com vincristina. HE 100X. (F) O processo inflamatório ao longo da parede do cólon inteiro com destruição parcial das criptas de Lieberkühn após a indução com OM em ratos previamente tratados com vincristina. HE 100X.

4.1.4. Disfunção sensitiva somática em animais com colite induzida por óleo de mostarda.

O gráfico 38 demonstra o efeito de 4 doses de 150 µg/kg de vincristina na latência térmica de ratos com colite induzida por administração de óleo de mostarda. A latência térmica no subgrupo controle ($13,1 \pm 1,7s$ vs. $14,6 \pm 1,03s$) e no subgrupo de colite induzida por etanol ($13,2 \pm 1,21s$ vs. $13,11 \pm 1,19s$) não foi alterada ($p > 0,05$), no subgrupo com neuropatia induzida por vincristina a latência térmica foi reduzida ($8,4 \pm 1,29$ vs. $14,2 \pm 0,98s$) ($p < 0,05$), a inflamação colônica induzida por OM aumentou a latência da retirada da pata a estímulo nociceptivo (placa quente) em 30 % quando comparada a respostas basais ($16,73 \pm 2,62s$ vs. $12,85 \pm 1,93s$) ($p < 0,05$) e o efeito da indução da colite, após indução de neuropatia periférica pela administração de vincristina, foi um aumento de 14 % comparada a respostas basais ($14,8 \pm 1,38s$ vs. $12,95 \pm 1,76s$) ($p < 0,05$).

4.1.4.1. Avaliação macroscópica do colon

As lesões macroscópicas de colon induzidas por administração de OM em ratos foram avaliadas. No subgrupo de animais tratados com OM o escore de Morris aumentou, já no subgrupo tratado com TNBS após indução de neuropatia por 600 µg/kg vincristina, este aumento não foi significativo (Tabela 2).

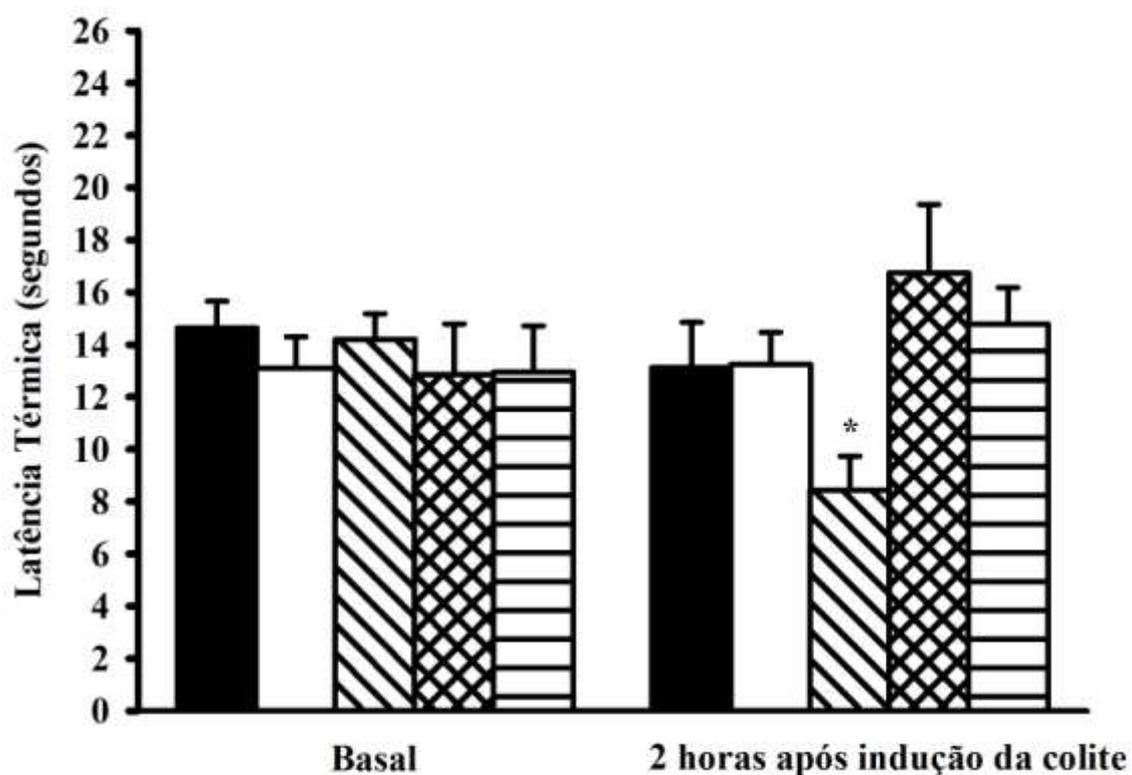
4.1.4.2. Avaliação microscópica do colon

Os escores histológicos também aumentaram no subgrupo de animais tratados somente com OM e no subgrupo tratado com OM após indução de neuropatia por 600 µg/kg vincristina (Tabela 2), como mostra as alterações estruturais nas secções longitudinais do segmento coloretal visualizadas da figura 18.

4.1.4.3. Avaliação do peso do colon

Nos ratos com colite induzida por OM, o peso do colon foi avaliado, demonstrando que tanto no subgrupo de animais tratados com OM, quanto no subgrupo tratado com OM após indução de neuropatia por 600 µg/kg vincristina, o aumento do peso do colon não foi significativo (Tabela 2).

Gráfico 38. Efeito de 4 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina na latência térmica de ratos com colite induzida por administração de óleo de mostarda.



Colite induzida por óleo de mostarda em ratos submetidos ao tratamento com 5 doses de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vincristina (N=6) (▨) ou solução salina (N=6) (▩) intravenosa em dias alternados, comparados aos grupos controle (N=6) (■), colite induzida por etanol (N=5) (□) e neuropatia periférica induzida por vincristina (N=6) (▤). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. *, $p < 0,05$ vs. respectivos subgrupos controles ao Teste One-Way ANOVA e Teste de Holm-Sidak.

Protocolo 5

5.1. Registros eletrofisiológicos de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) em ratos acordados submetidos ou não ao tratamento crônico intravenosa com cisplatina.

Nos neurônios do GCS, 5 mg/kg de cisplatina alterou o potencial de repouso, a resistência interna e o limiar de excitabilidade ($p < 0,05$) aumentando a resistência da membrana e alterando o potencial de repouso para valores mais positivos e diminuindo (cerca de 2 vezes) o limiar de corrente para evocar o potencial de ação (tabela 3). Ratos tratados com cisplatina apresentaram alteração dos parâmetros eletrofisiológicos relacionados à excitabilidade dos neurônios do GCS, contudo o tratamento com este quimioterápico não alterou a amplitude, duração, dV/dt ascendente e dV/dt descendente do PA ($p > 0,05$) (tabela 3).

Neurônios do GCS dos animais controles dispararam um único potencial de ação no início de um pulso de corrente despolarizante sustentado (500 ms). Aumento na amplitude da corrente não evocou outros potenciais. Nos neurônios de animais tratados com 5 mg/kg, 36% dos neurônios foram classificados como fásicos, ao passo que 64% dos neurônios dispararam dois ou mais potenciais ao longo da injeção de corrente despolarizante sustentada (tabela 3 e Figura 19).

Tabela 3. Efeitos do potencial transmembrana para restaurar artificialmente o controle do potencial de repouso (via injeção de corrente intracelular) em ratos tratados com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg na resistência de entrada, limiar de excitabilidade, amplitude, duração, inclinação máxima da voltagem em relação ao tempo ($dv/dt_{\text{máx}}$) do ramo ascendente e descendente do potencial de ação e amplitude e duração da hiperpolarização pós-potencial.

| Parâmetros | Controle | Cisplatina |
|---|---------------------|---------------------|
| Propriedades da membrana | | |
| Em, mV | -56,35 ± 3,0 (10) | -49,35 ± 1,5* (17) |
| Ri, MΩ | 55,50 ± 5,6 (10) | 89,68 ± 17,3* (17) |
| Limiar de excitabilidade | 280,00 ± 19,14 (10) | 122,35 ± 22,5*(17) |
| Propriedades do potencial de ação | | |
| Amplitude, mV | 73,05 ± 5,2(10) | 71,26 ± 3,1(17) |
| Duração, ms | 3,23 ± 0,3(10) | 2,85 ± 0,1 (17) |
| dV/dt asc, V/s | 68,56 ± 11,1 (10) | 73,25 ± 5,9 (17) |
| dV/dt desc, V/s | -37,8 ± 2,3 (10) | -42,50 ± 1,63 (17) |
| Propriedades da PPH | | |
| Amplitude, mV | -13,5 ± 1,5 (10) | -13,9 ± 0,81 (17) |
| Duração, ms | 303,35 ± 32,3 (10) | 293,96 ± 14,6 (17) |
| Despolarização sustentada (500 ms) | | |
| Step de corrente, pA | 885,00 ± 78,1 (10) | 521,42 ± 67,8* (17) |
| Número de potenciais evocados | 1,30 ± 0,2 (10) | 2,21 ± 0,2* (17) |

Dados mostram a média ± EPM com o número de neurônios entre parênteses. *, $p < 0,05$ comparado com o controle (t- test). Em, potencial de repouso, Ri, resistência de entrada, dV/dt asc, inclinação ascendente máxima; dV/dt desc, inclinação descendente máxima; PPH, potencial pós-hiperpolarização.

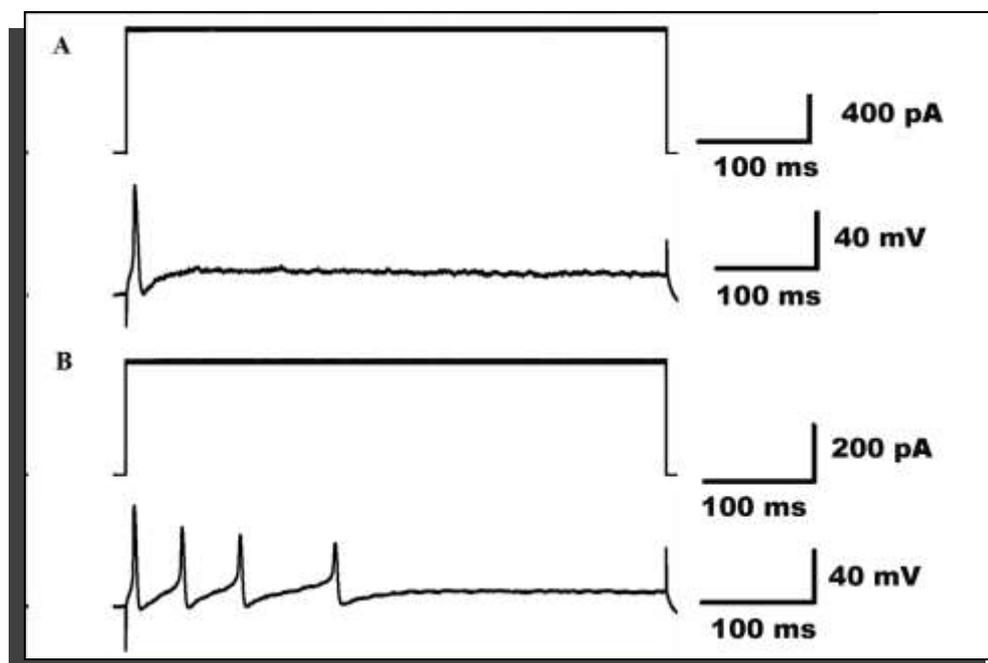


Figura 19. Potenciais de ação (PA) dos neurônios simpáticos do gânglio cervical superior em ratos tratados ou não com 5 mg/kg de cisplatina i.v. por meio de fixação do potencial transmembrana. (A) O traçado de cima mostra o largo pulso de corrente utilizado para evocar potenciais e o traçado de baixo mostra a resposta de voltagem em neurônio de animais tratados com salina. (B) O traçado de cima mostra o largo pulso de corrente utilizado para evocar potenciais e o traçado de baixo mostra a resposta de voltagem em neurônio de animais tratados com cisplatina.

Protocolo 6

6.1. Análise morfológica de amostras de tecidos de ratos submetidos ou não ao tratamento crônico intravenosa com cisplatina.

6.1.1. Tecidos Nervosos

A análise qualitativa dos gânglios coletados e analisados por microscopia eletrônica demonstrou que o GCS de animais tratados com 10 mg/kg de cisplatina, apresentou alterações na morfologia e tamanho do núcleo de células satélites, aumento da heterocromatina, com núcleo com aparência granulosa e segregação de nucléolos para a periferia nuclear (Figura 20B), diferente do GCS de animal tratado com salina (Figura 20A). O GM destes animais apresentou aumento do núcleo e nucléolos e alterações na morfologia e tamanho do núcleo de células satélites (Figura 20D), diferente do GM de animal do grupo controle (Figura 20C). O GRD apresentou também alterações na morfologia e tamanho do núcleo e a presença de vacúolos no interior do nucléolo (Figura 20F), diferente do controle (Figura 20E).

A análise qualitativa do nervo isquiático coletado de animais tratados ou não com 10 mg/kg de cisplatina vistos pela microscopia óptica, através de cortes semifinos transversais (500 nm) e coloração com azul de toluidina, demonstrou vacuolizações em células do sistema imunológico em nervo isquiático de animal tratado com cisplatina (Figura 21).

Na morfometria destas amostras do nervo isquiático de ratos os resultados da comparação quantitativa da área transversal da bainha de mielina não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os nervos de animais tratados com 10 mg/kg de cisplatina ($8930,99 \pm 621,4 \mu\text{m}^2$) e tratados com salina ($8094,12 \pm 19,6 \mu\text{m}^2$) ($P=0,084$) (Gráfico 39 A). Da mesma forma não houve diferença estatística entre as áreas transversais dos axônios ($2681,57 \pm 260,4 \mu\text{m}^2$ vs. $2630,68 \pm 63,5 \mu\text{m}^2$) ($P = 0,068$) (Gráfico 39 B) e do número de células mielinizadas contadas em área amostral de $210 \mu\text{m}^2$ do grupo tratado com cisplatina e do grupo tratado com salina, respectivamente ($468,00 \pm 66,8$ vs. $345,50 \pm 2,5$) ($P = 0,768$) (Gráfico 39 C).

A análise qualitativa do nervo vago coletado de animais tratados ou não com 10 mg/kg de cisplatina vistos pela microscopia óptica, através de cortes semifinos transversais (500 nm) e coloração com azul de toluidina, demonstrou a presença de vacuolizações na

bainha de mielina e ausencia de fibras amielínicas e pouco mielinizadas no nervo vago de animal tratado com cisplatina, diferente do grupo controle (Figura 22).

6.1.2. Tecidos Musculares

A análise qualitativa dos tecidos musculares do estômago, intestino delgado e grosso coletados de animais tratados com 5 mg/kg de cisplatina, corados por hematoxilina e eosina e analisados por microscopia óptica não demonstraram alterações morfológicas, a membrana da mucosa com criptas Lieberkühn intactas e abundantes células caliciformes, sem sinais de necrose e infiltrado inflamatório (Figura 23).

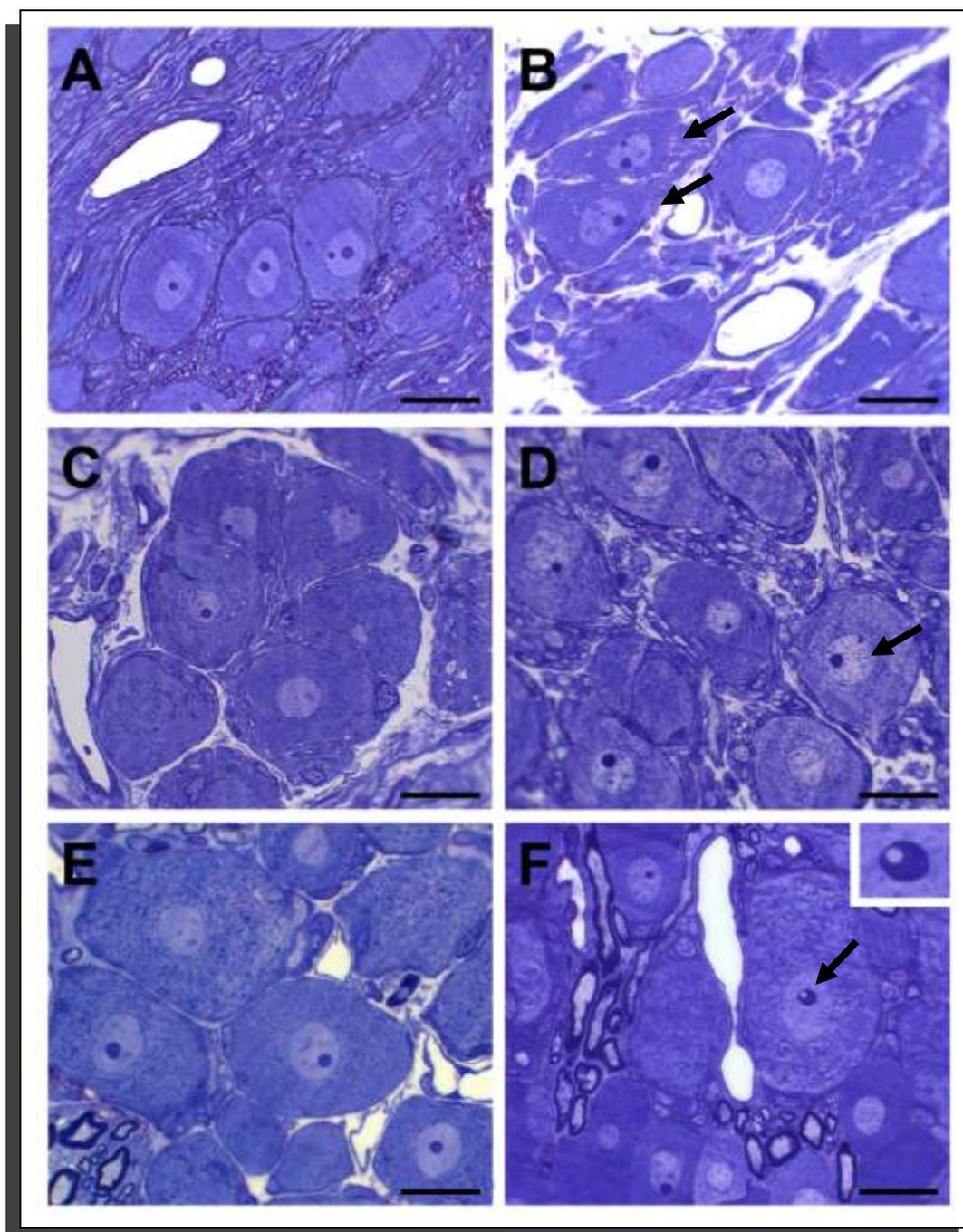


Figura 20. Análise morfológica de amostras de gânglios somáticos e autonômicos de ratos tratados ou não com 10 mg/kg de cisplatina i.v., através de cortes ultrafinos transversais (60-70 nm) e coloração com citrato de chumbo, contrastada em acetato de uranila para análise de microscopia eletrônica de transmissão. Barra de 20 μ m. (A) Gânglio cervical superior (GCS) de animais tratados com salina i.v. (B) GCS de animais tratados com 5 mg/kg de cisplatina i.v. (C) Gânglio mesentérico (GM) de animais tratados com salina i.v. (D) GM de animais tratados com 5 mg/kg de cisplatina i.v. (E) Gânglio da raiz dorsal (GRD) de animais tratados com salina i.v. (F) GRD de animais tratados com 10 mg/kg de cisplatina i.v. Setas mostrando alterações morfológicas das células, aumento da heterocromatina e alterações nucleares.

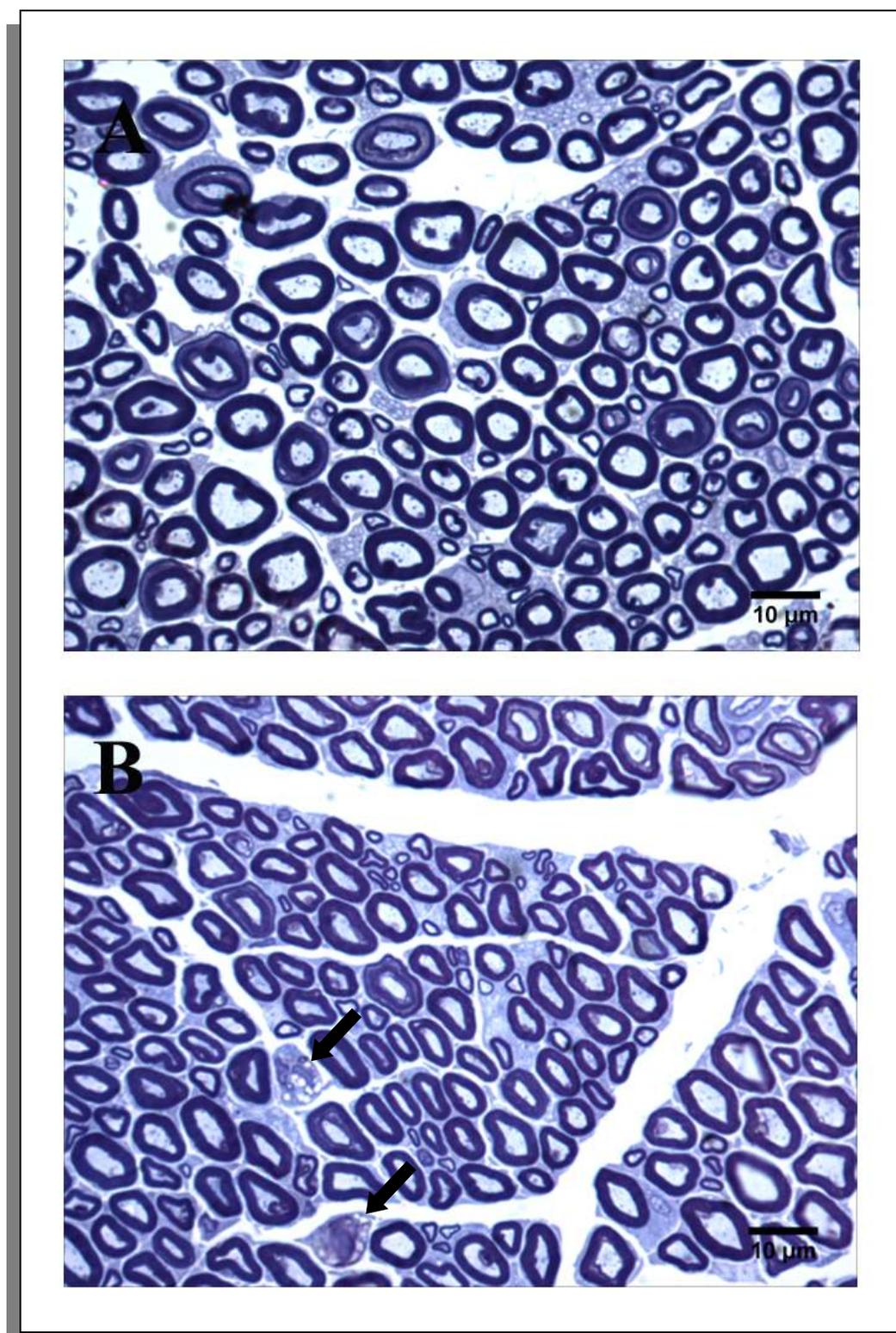
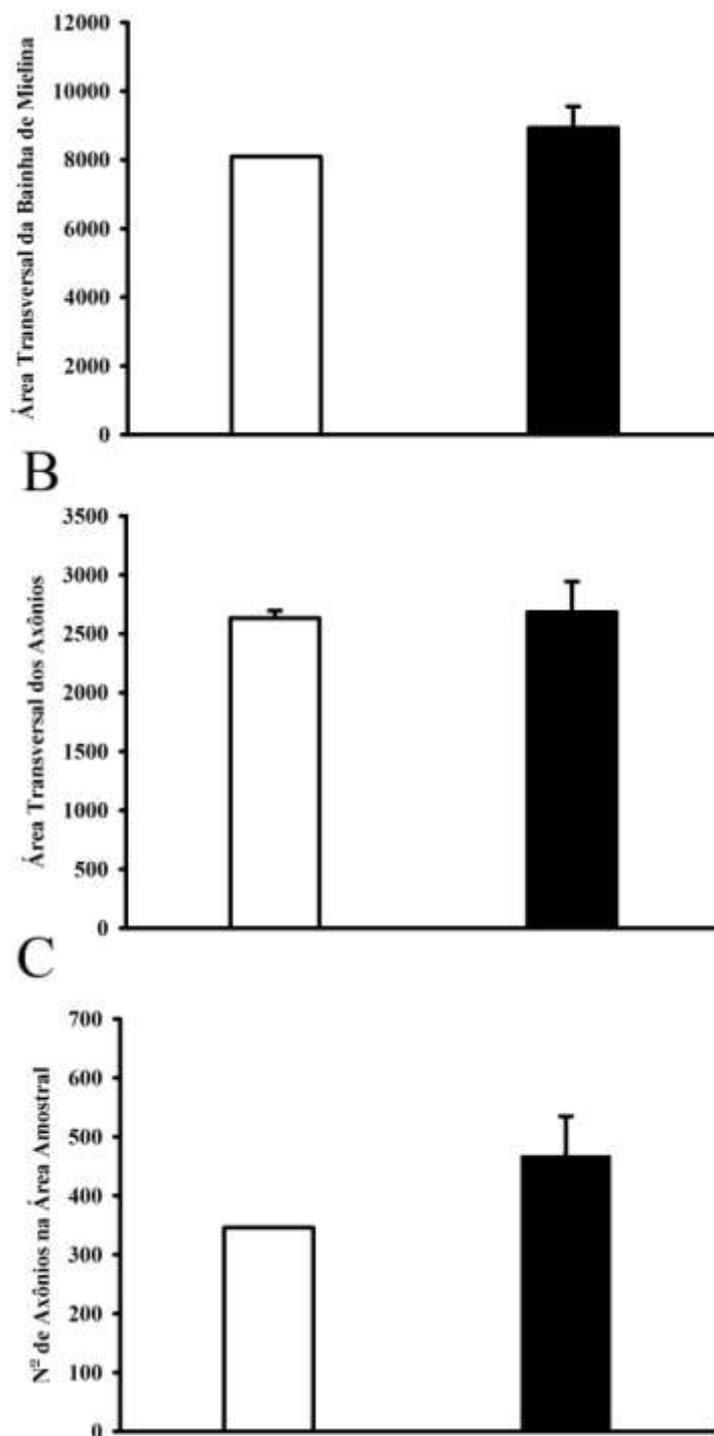


Figura 21. Análise qualitativa de amostra de nervo isquiático de rato, através de cortes semifinos transversais (500 nm) e coloração com azul de toluidina para análise de microscopia óptica. (A) Amostra de nervo isquiático de animal tratado com salina. (B) Amostra de nervo isquiático de animal tratado com 10 mg/kg de cisplatina i.v. Setas mostrando vacuolizações em células do sistema imunológico do nervo isquiático. Barra de 10 µm.

Gráfico 39. Morfometria de amostras do nervo isquiático de ratos tratados ou não com 5 mg/kg de cisplatina i.v.



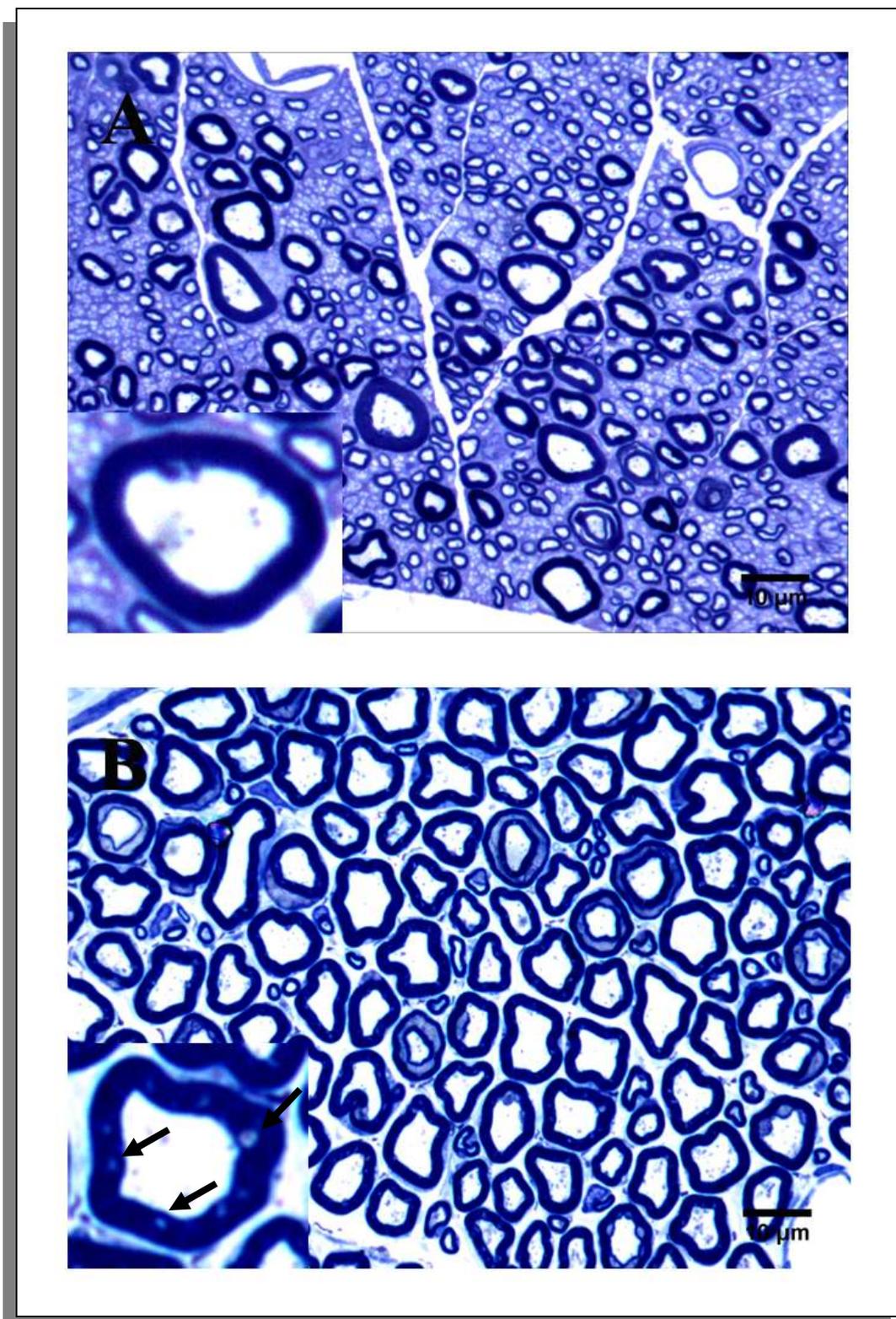


Figura 22. Análise qualitativa de amostra de nervo vago de rato, através de cortes semifinos transversais (500 nm) e coloração com azul de toluidina para análise de microscopia óptica. (A) Amostra de nervo vago de animal tratado com salina. (B) Amostra de nervo vago de animal tratado com 10 mg/kg de cisplatina i.v. Setas mostrando vacuolizações em bainha de mielina do nervo vago. Barra de 10 µm.

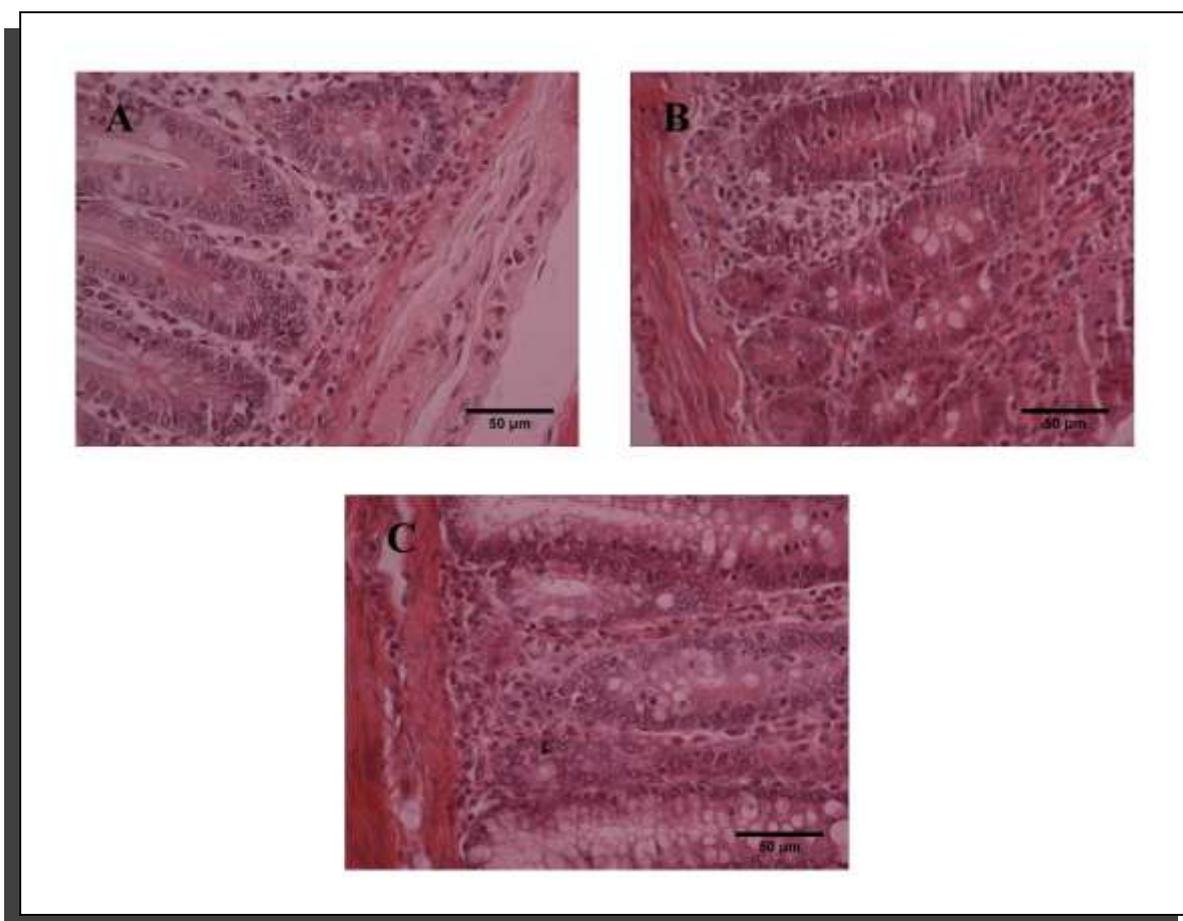


Figura 23. Análise qualitativa de amostras de tecido muscular do estômago, intestinos delgado e grosso de rato, fixadas por formol a 10% tamponado e em parafina, cortadas a 4 mm de espessura e tingidas com hematoxilina-eosina para análise de microscopia óptica. (A) Amostra de tecido muscular do estômago de animal tratado com 5 mg/kg de cisplatina (B) Amostra de tecido muscular do intestino delgado de animal tratado com 5 mg/kg de cisplatina. (C) Amostra de tecido muscular do intestino grosso de animal tratado com 5 mg/kg de cisplatina. Barra de 50 µm.

Discussão

Para o estudo funcional, eletrofisiológico e morfológico da neuropatia autonômica induzida por cisplatina e vincristina em ratos, foram utilizadas doses semelhantes às descritas na literatura por Joseph e Levine, 2009 e Authier *et al.*, 2003b, respectivamente. O tratamento crônico com estas drogas alteraram a ativação do barorreflexo, atrasaram o EG de líquidos e aumentaram o peso do cólon em ratos acordados, sugestivo de disautonomia, confirmada por alterações eletrofisiológicas dos neurônios simpáticos do gânglio cervical superior e alterações morfológicas de tecidos nervosos envolvidos no controle do barorreflexo e do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal.

1. Estudo funcional do esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de líquidos e barorreflexo de animais tratados com cisplatina ou vincristina i.v.

Foram utilizadas para a obtenção destes resultados técnicas simples, mas preconizadas pela literatura e muito utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa. Para mensuração do EG e TI, foi usada uma modificação da técnica previamente descrita por Reynell, Spray, 1956, onde os animais foram alimentados por gavagem contendo um marcador não absorvível e as amostras foram lidas por espectrofotometria e expressas em densidade óptica. Este método utilizado para avaliar o esvaziamento gástrico de líquidos é simples, versátil e confiável (Regô, *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 1999a; Gondim *et al.*, 1999b; Troncon *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001; Gondim *et al.*, 2001; Camurça *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2009; Jucá *et al.*, 2011).

Existe uma variedade de métodos para o estudo do esvaziamento gástrico, podemos classificá-los em não-invasivos diretos (radiológico por uso de Ba²⁺ ou partículas radiopacas; gamacintilografia, ultrassonografia, impedanciometria, tomografia de potencial aplicado, ressonância nuclear magnética) ou indiretos (absorção do paracetamol; testes respiratórios) e em métodos invasivos. Em contraste com estudos em humanos que, hoje em dia, praticamente só se usam métodos não-invasivos para o seu estudo, os estudos da motilidade do trato gastrointestinal em ratos utilizam métodos invasivos e são normalmente realizados em jejum, eliminando a interferência causada pela presença de alimentos (Chen *et al.*, 1997, Holzer *et al.*, 1986, Troncon, 2008).

Já foi demonstrado que refeições sólidas e líquidas têm perfis diferentes de esvaziamento gástrico (Hinder, Kelly, 1977), estas refeições são esvaziadas do estômago em

diferentes taxas (Wright *et al.*, 1984), o esvaziamento de líquidos é rápido em forma exponencial, enquanto que o esvaziamento de sólidos é relativamente lento em uma forma linear (Minami, McCallum, 1984). Esta diferença entre o esvaziamento gástrico de sólidos e de líquidos é observada em humanos e em ratos. Como os perfis do esvaziamento de sólido e de líquido são diferentes, são necessárias que sejam utilizadas refeições padronizadas nesses estudos. Assim, quando se fala em resultados do estudo do esvaziamento gástrico, é preciso particularizar o tipo de refeição usada e especificar os seus componentes (sólido ou líquido). A escolha da refeição a ser usada vai depender do tipo de problema fisiológico, fisiopatológico ou clínico que se deseja resolver com a realização do exame (Troncon, 2008).

O vermelho fenol, radiocromo e carvão, são exemplos de refeições testes líquidas, livres de calorias utilizadas como marcadores para estes estudos de trânsito. Estes marcadores convencionais são adequados e úteis para mensurar o trânsito intestinal em ratos (Chang *et al.*, 1994). Contudo, o emprego de marcadores sólidos, como grânulos de vidro, para a medição do trânsito gastrointestinal em ratos também pode ser utilizado (Wang *et al.*, 2001).

A associação do esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal pode simplesmente ser estimado após o tratamento do trânsito gastrointestinal como um todo, através da medição da ponta de carvão vegetal, mas apesar de fornecer dados úteis, este método pressupõe um processo linear de esvaziamento gástrico de líquidos já que as amostras são colhidas apenas uma vez. Com marcadores de fase líquida como o vermelho fenol ou o radiocromo, no entanto, tanto o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal podem ser simultaneamente e individualmente medidos porque o conteúdo intraluminal de vermelho fenol ou radiocromo pode ser determinada com precisão no estômago e nos segmentos intestinais (Chang *et al.*, 1994), por este motivo foi utilizado o vermelho fenol como marcador que permitiu uma análise quantitativa do EG e TGI. Todos os estudos de mobilidade devem ser executados em um determinado período de tempo fixado para evitar o efeito do ritmo circadiano (Triantaphyllidis, Bader, 1974).

Um marcador teste com ^{13}C ácido octanóico no ar expirado foi introduzido para avaliar indiretamente o esvaziamento gástrico (Ghoos *et al.*, 1993). Apesar de apresentar boa correlação com os dados de cintilografia, não é amplamente disponível e oferece apenas uma avaliação global da função gástrica, uma importante desvantagem é a distribuição anormal de comida entre o estômago proximal e distal de pacientes com dispepsia parece ser um método melhor para investigar sintomas de dismotilidade e não de estase gástrica (Troncon *et al.*, 1994).

Apesar de ser visto como o padrão ouro para avaliação do esvaziamento gástrico na prática médica, a cintilografia ainda não está disponível em todo o mundo e implica exposição à radiação. A técnica de diluição de corante, cuja segurança, simplicidade e precisão são bem conhecidas (Reynell, Spray, 1956) pode comparar seus dados com os resultados obtidos pela cintilografia, com a vantagem do baixo custo para sua execução, outro motivo que nos fez optar pelo vermelho fenol como marcador do EG e TI.

Com o intuito de estudar a participação das vias simpáticas sobre o aumento da retenção gástrica de corante induzido pela cisplatina e vincristina, os animais foram submetidos ao bloqueio simpático com sulfato de guanetidina, aplicada uma hora antes do sacrifício para medição do EG e do TI de líquidos.

Os resultados comprovam que a cisplatina retarda de maneira dose dependente o esvaziamento gastrintestinal de líquidos em ratos. O atraso transitório do EG de líquidos surgiu a partir de 3 doses de 1 mg/kg de cisplatina e este atraso foi revertido duas semanas após a interrupção do tratamento com 5 doses de 1 mg/kg de cisplatina. Também houve reversão nos animais tratados após o bloqueio simpático com guanetidina.

Vários estudos demonstram alterações gastrintestinais associadas ao uso da cisplatina. Em humanos, Pezzuolo *et al.*, 2010 relataram que pacientes idosos que fizeram uso de 20 mg/m², nos 3 primeiros dias de um ciclo de 21 dias deste quimioterápico, tiveram como efeito colateral a toxicidade gastrintestinal. Nelson *et al.*, 1993 afirmaram que o retarde do esvaziamento gástrico induzido por cisplatina pode ser responsável, em parte, por anorexia, saciedade precoce e náuseas associadas ao tratamento do câncer. Punushapai *et al.*, 2010 relataram que os principais sinais de toxicidade gastrintestinal, em pacientes tratados com 20-40 mg/m², uma vez por semana, durante 6 ciclos ou 75 mg/m², uma vez a cada duas semanas, por 9 ciclos de cisplatina, são diarreia, vômito e náusea acompanhados de desconforto abdominal. Estes problemas podem estar relacionados à disfunção do sistema nervoso autônomo (Nelson *et al.*, 2002).

Nos estudos sobre a neuropatia autonômica induzida por cisplatina em animais, Cabezos *et al.*, 2008 relatam a inibição dose-dependente no esvaziamento gástrico, refletida por acúmulo de alimento no estômago, anorexia e dismotilidade gastrintestinal, em ratos tratados com 3 ou 6 mg/kg⁻¹ de cisplatina i.p., avaliados por métodos radiológicos. Estes efeitos colaterais da cisplatina no sistema gastrintestinal podem ser alterados pelos antagonistas da metoclopramida (Roos *et al.*, 1981), do receptor 5-HT₃ (5-hidroxitriptamina

ou serotonina) (Yoshida *et al.*, 1992; Kishibayashi *et al.*, 1993) e os antioxidantes (Sharma, Gupta, 1998).

Cisplatina também aumentou o peso do cólon, o que demonstra a retenção fecal, semelhante à constipação induzida pela cisplatina em seres humanos (Morgan *et al.*, 2010). Esse efeito foi encontrado em doses mais baixas (1 e 2 doses de 2 mg/kg de cisplatina) e persistiu pelo menos até duas semanas depois do tratamento com 5 doses de cisplatina 1 mg/kg.

Para o tratamento com vincristina foram utilizadas doses entre 150 e 750 µg/kg que foram capazes de alterar a ativação do barorreflexo, atraso do EG de líquidos de maneira dose dependente e aumento do peso do cólon em ratos acordados. Neste estudo, o tratamento crônico com vincristina atrasou transitoriamente o EG de líquidos em ratos acordados e este atraso no EG não foi demonstrado uma semana após a interrupção do tratamento com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina, mas persistiu após bloqueio simpático com guanetidina em animais tratados.

Em humanos, sintomas gastrintestinais ocorrem comumente, com constipação, dor abdominal e íleo paralítico como as principais manifestações (Evans *et al.*, 1963; Evans, 1968; Haggard *et al.*, 1968). Sandler *et al.*, 1969 reportaram que pacientes tratados com vincristina, relataram que apresentavam dor abdominal ou constipação e/ou íleo adinâmico.

Em modelos animais, foram encontrados poucos relatos do efeito da vincristina no trato gastrintestinal. A retenção gástrica induzida por vincristina em ratos foi relatada por pesquisadores do nosso grupo, onde vincristina reteve o corante no estômago dos animais tratados e esta retenção foi reversível somente após duas semanas de interrupção do tratamento (Peixoto Júnior *et al.*, 2009). Kaneko *et al.* 2001, ao pesquisarem o efeito de 750 µg/kg de vincristina na motilidade gástrica em ratos conscientes, relatou que vincristina altera a motilidade gástrica, ao evidenciarem que há aumento dose-dependente do número e amplitude média das contrações gástricas de ratos imediatamente após a ingestão, enquanto posteriormente, causa diminuição de ambos os parâmetros.

Vincristina também aumentou o peso do cólon somente em animais tratados com 2 e 5 doses de 150 µg/kg de vincristina. Esse efeito reverteu somente após duas semanas de interrupção do tratamento com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina.

A fim de se evidenciar a presença de neuropatia autonômica induzida pela cisplatina ou vincristina ao nível da regulação das respostas cardiovasculares, foi utilizado o protocolo de Dunlap *et al.*, 1987, onde os animais foram canulados para ser realizada a mensuração dos

níveis de pressão arterial média (PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (FC, bpm) através de registro contínuo em um sistema de aquisição digital (PowerLab; AD Instruments, Austrália) e o barorreflexo foi avaliado através dos testes com fenilefrina e atropina.

Neste estudo observou-se também que a administração de cisplatina crônica afetou a função barorreflexa em ratos conscientes, mas não reduziu significativamente o volume sanguíneo. Gondim *et al.*, 1998 comprovaram os efeitos da volemia sobre as funções cardiovasculares e gastrintestinais e evidenciaram que a redução do volume sanguíneo aumenta o esvaziamento gástrico e diminui a pressão venosa central e a pressão arterial média, a manutenção da volemia dos animais tratados com este quimioterápico descarta esta influência nas alterações encontradas. Estes resultados demonstraram que a resposta autonômica caracterizada pela redução da FC induzida pelo agonista α_1 -adrenérgico com fenilefrina e o ganho do barorreflexo foram superiores no subgrupo tratado com cisplatina que no subgrupo controle, mas o bloqueio parassimpático com atropina não revelou diferença significativa entre os grupos.

Autores relatam efeitos da cisplatina no sistema cardiovascular. Richardson, Cantwell, 1990 evidenciaram a presença de hipotensão postural, palpitações e dispnéia aos esforços em pacientes tratados com esta droga.

Estudos comprovaram que, em indivíduos que em média fizeram uso de 400 mg/m² de cisplatina, os testes de função autonômica podem indicar anormalidades no sistema nervoso simpático com a queda da pressão arterial sistólica ou anormalidades no sistema nervoso parassimpático, em pacientes submetidos à manobra de Valsalva, cujo resultado foi expresso em taxa de Valsalva anormal, que é a razão entre as durações do maior intervalo R-R no eletrocardiograma após a manobra (bradicardia) e do menor intervalo R-R durante o esforço (taquicardia do esforço) ou resposta anormal a respiração profunda, como o aumento da frequência cardíaca (Earl *et al.*, 1998).

Neste estudo observou-se também que a administração de vincristina crônica afetou a função barorreflexa em ratos conscientes, mas não reduziu significativamente o volume sanguíneo. Os resultados demonstraram que a redução média da FC induzida por agonista α_1 -adrenérgico (fenilefrina) e o ganho do barorreflexo nos animais experimentais foram superiores ao encontrado no subgrupo controle. Demonstrou-se também que variação da FC após o bloqueio parassimpático com atropina foi significativamente superior nos animais tratados com vincristina.

Nestes resultados a não reversão do esvaziamento gástrico pelo bloqueio simpático com guanetidina e a alteração barorreflexa são indicativos de neuropatia vagal induzida por vincristina. Estes dados são consistentes com os resultados de Hirvonen *et al.*, 1989 em que o tratamento de humanos com vincristina reduziu a arritmia sinusal respiratória, medida como variabilidade da frequência cardíaca que é um indicador confiável de disfunção do sistema nervoso autônomo, o que reflete um dano no controle cardíaco vagal, indicativo de cardioneuropatia autonômica transitória. Weissman-Fogel *et al.*, 2008 descreveu um modelo de neuropatia vagal em ratos induzida por vincristina que causou uma diminuição dose-dependente da atividade vagal expressa pela diminuição de parâmetros parassimpáticos da variabilidade da frequência cardíaca, sem manifestação de danos à inervação simpática cardíaca.

2. Estudo funcional da sensibilidade periférica de animais tratados com cisplatina ou vincristina.

Neste modelo a disfunção somática induzida por cisplatina não causou alterações no tempo de latência da retirada da pata após estímulo térmico, mas ocasionou alodinia mecânica verificada somente uma semana após a interrupção do tratamento com 10 mg/kg de cisplatina, sugestivo de ganglionopatia.

Vincristina causou disfunção somática, sugestiva de neuropatia sensitiva, ao induzir hiperalgesia térmica com doses a partir de 100 µg/kg.

Para a avaliação da dor neuropática induzida por cisplatina e vincristina foram utilizadas o teste da placa quente e o teste de pressão plantar. A dor não pode ser monitorada diretamente em animais, mas só pode ser estimada através da análise de respostas aos estímulos nociceptivos, no entanto, tais respostas não significam necessariamente que há uma sensação concomitante. Os tipos de estímulos nociceptivos (elétrico, térmico, mecânico ou químico) que têm sido utilizados em vários modelos de dor foram revisados com a conclusão de que nenhum é ideal (Le Bars *et al.*, 2001). As reações monitoradas são quase sempre respostas motoras que vão desde reflexos espinais a comportamentos complexos. A maioria tem a limitação que podem ser associados, ou são modulados por outras funções fisiológicas.

Para a avaliação da nocicepção térmica, foi utilizado o teste da placa quente, de acordo com o protocolo descrito por Eddy, Leimbach, 1953 e modificado por O' Callaghan, Holzman, 1975. Este teste utiliza o calor para evocar nocicepção em ratos. O calor é a forma

mais seletiva para estimular os receptores cutâneos e, por conseguinte, categorias específicas dos axônios periféricos, incluindo fibras termossensíveis e nociceptivas. No entanto, este método tem limitações, pois estão em contato com a pele (transferência de calor por condução). Como resultado, quando eles ativam nociceptores, concomitantemente, eles podem ativar receptores sensoriais não nociceptores de baixo limiar que exercem uma influência inibitória sobre os mecanismos da dor (Nathan *et al.*, 1986).

O teste da placa quente consta de um prato aquecido a uma temperatura constante que produz dois componentes comportamentais que podem ser medidos em termos de seus tempos de reação, ou seja, lambar a pata e pular. Ambos são considerados respostas integradas supraespinhais. Além disso, este teste é muito suscetível a fenômenos de aprendizagem, o que resulta em um progressivo encurtamento do tempo de reação de salto acompanhado pelo desaparecimento do comportamento de lambar. Apesar das limitações este teste é um dos mais comumente utilizados (Le Bars *et al.*, 2001) e para minimizar suas limitações, sempre foram comparados os resultados com animais tratados somente com salina, optou-se por poucas repetições do teste para evitar a aprendizagem e os animais foram tratados com doses de quimioterápicos que os mantivessem em boas condições de saúde.

Para a avaliação da alodinia mecânica, foi utilizado um estesiômetro dinâmico plantar da Insight, baseado no princípio dos filamentos de Von Frey (El Maarouf *et al.*, 2005). Os locais preferidos para a aplicação dos estímulos nociceptivos mecânicos são a pata e a cauda. Os ensaios que utilizam pressão constante têm sido abandonados progressivamente e substituídos por aqueles que aplicam de forma gradual o aumento das pressões. Uma pressão progressivamente maior é aplicada a uma área pontual na pata (Le Bars *et al.*, 2001). O parâmetro medido é o limiar (peso em gramas) para o aparecimento de um determinado comportamento (reflexo de retirada da pata). Este tipo de estimulação mecânica tem algumas desvantagens (Fennessy, Lee, 1975): 1) às vezes é difícil medir a intensidade do estímulo com precisão, 2) a repetição do estímulo mecânico pode produzir uma diminuição ou vice-versa um aumento na sensibilidade da pata estimulada; 3) a necessidade de aplicação de pressões altas, o que explica a fraca sensibilidade do método. Porém este é um método bastante utilizado e quando realizado por um pesquisador experiente, estas desvantagens são minimizadas.

Os procedimentos para induzir colite por TNBS (ácido 2,4,6-trinitro benzeno sulfônico, Sigma- Aldrich-Brasil) estão de acordo com o protocolo de Latella *et al.*, 2008 e o para indução da colite por OM (óleo de mostarda) foi adaptado do protocolo de Kimball *et al.*,

2005. A avaliação macroscópica e microscópica do colon foi baseada na aplicação dos escores de inflamação descritos por Morris *et al.*, 1989 e os escores dados às lâminas de microscopia, de acordo como os critérios descritos por Appleyard, Wallace, 1995. Este protocolo teve como objetivos avaliar o efeito da vincristina na sensibilidade somática e da mucosa colônica e sobre o curso das alterações somestésicas associadas com a colite induzida por TNBS ou por OM em ratos acordados.

A literatura refere que drogas utilizadas para o tratamento do câncer, como a cisplatina e a vincristina, causam neurotoxicidade, resultando em sofrimento do paciente e limitando o tratamento com drogas antineoplásicas. Esta neurotoxicidade pode levar a diminuição da dose da droga ou interrupção do tratamento anti-câncer, conseqüentemente diminuindo a efetividade da terapia (Forman, 1990 a,b; Quasthoff, Hartung, 2002; Velasco, Bruna, 2010).

As diferenças nas propriedades estruturais entre os quimioterápicos podem contribuir para as variações na apresentação clínica das neuropatias e em seus possíveis mecanismos (Park *et al.*, 2008).

A cisplatina é um composto inorgânico, de coordenação planar, que contém um átomo central de platina rodeado por átomos de cloro, hidrogênio e nitrogênio. Este composto causa neuropatia predominantemente sensitiva (Mollman *et al.*, 1988; Van Der Hoop *et al.*, 1990; Lomonaco *et al.*, 1992; Bahl *et al.*, 2006), onde há degeneração de neurônios sensitivos, sem evidências de degeneração axonal distal (Krarup-Hansen *et al.*, 1999); esta droga é então conhecida por causar ganglionopatia, graças a sua afinidade por neurônios do GRD (McDonald, Windebank, 2002).

O quadro clínico em humanos pode apresentar alteração do limiar de percepção vibratória, redução dos reflexos tendinosos profundos, parestesia começando nas extremidades inferiores, que pode ir desde um leve formigamento à dor intensa. O paciente tratado com cisplatina pode ainda apresentar ataxia com distúrbio de marcha, devido a alteração da propriocepção, além de sintomas como: câibras musculares e sinal de Lhermitte (Thompson *et al.*, 1984; Siegal, Haim, 1990, Inbar *et al.*, 1995; Earl *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999; Brydoy *et al.*, 2009).

Em modelos animais, a cisplatina induz neuropatia periférica em ratos (Pisano *et al.*, 2003; Umapathi, Chaudhry, 2005; Lauria *et al.*, 2005; Carozzi *et al.*, 2010, De Grandis, 2007). As alterações na função sensitiva incluem diminuição do limiar para dor, hiperalgesia e alodinia mecânicas, hiperalgesia e alodinia ao frio e hiperalgesia térmica, além de

diminuição no ganho de peso e déficit motor incluindo diminuição de força muscular e atividade motora (Authier *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a, Hori *et al.*, 2010, Ta *et al.*, 2010).

Altas doses cumulativas de cisplatina alteram a propriocepção em animais e podem causar hipoalgesia, diminuição da velocidade de condução nervosa sensitiva e déficits anatômicos, que inclui diminuição da inervação periférica (Gao *et al.*, 1995; Boyle *et al.*, 1999; Aloe *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a; Chattopadhyay *et al.*, 2004).

A neuropatia somática induzida por cisplatina encontra-se bem descrita na literatura, segundo Authier *et al.*, 2003a esta neuropatia foi descrita em doses baixas (2,5 – 10 mg/kg) e em diferentes esquemas de dosagem: 2 mg/kg de cisplatina, 2 vezes por semana por 8 vezes, i.p. (Pisano *et al.*, 2003; Lauria *et al.*, 2005), 2 mg/kg de cisplatina, 2 vezes por semana por 4 vezes, i.p. (Cavalleti *et al.*, 1992), 1 e 2 mg/kg de cisplatina alternadamente a cada 3 dias por 10 vezes, i.p. (Authier *et al.*, 2000), uma (3 mg/kg), duas (2 mg/kg), ou três (1 mg/kg) vezes semanalmente até doses cumulativas de 15 ou 20 mg/kg, i.p. (Authier *et al.*, 2003a) e 2 mg/kg de cisplatina via veia da cauda (Joseph e Levine, 2009), optou-se pelo modelo animal descrito por Joseph e Levine, 2009 que utilizou a via de administração i.v. e as doses descritas por Authier *et al.*, 2003a.

Nas doses por nós utilizadas cisplatina não causou alterações no tempo de latência da retirada da pata após estímulo térmico e a alodinia mecânica foi verificada somente na dose cumulativa de 10 mg/kg de cisplatina, uma semana após a última dose do tratamento, dados indicativos de drogas que induzem ganglionopatia, a literatura relata que cisplatina tem afinidade pelos neurônios do GRD (McDonald e Windebank, 2002).

No que diz respeito à avaliação da sensibilidade térmica, autores como Hori *et al.*, 2010 relataram que, em contraste com a hiperalgesia mecânica, as alterações na sensibilidade térmica não foram significativas com dose de cisplatina superior à utilizada nestes estudos; relataram também o papel de canais iônicos em neurônios sensitivos na hiperalgesia mecânica induzida por cisplatina. Authier *et al.*, 2003a encontraram ligeiras alterações do limiar para o calor, mas estas alterações não foram significativas, diferente do encontrado para estímulo mecânico que produziu alodinia em animais tratados com esquema de doses superiores às aqui utilizadas (15 e 20 mg/kg) (Authier *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a).

Estudo em camundongos tratados com doses de 23 mg/kg de cisplatina, i.v. relatou hiperalgesia térmica e alodinia mecânica e forneceu evidências de que a regulação de canais iônicos no nível transcricional está envolvida no mecanismo destas alterações de

sensibilidade (Ta *et al.*, 2010). Em estudos com ratos Sprague–Dawley tratados com cisplatina estes apresentaram hiperalgesia e alodinia térmica e mecânica onde foi também relatado o papel de segundos mensageiros (Cata *et al.*, 2008; Joseph, Levine, 2009). Os estudos que relataram alteração da sensibilidade térmica em animais tratados com cisplatina, diferentes dos resultados por nós encontrados, utilizaram esquema de dosagem diferentes deste, espécie diferente de roedores e/ou estimulação térmica por irradiação e não por condução.

O quimioterápico denominado vincristina, é uma substância de caráter básico derivada da Vinca e que contém em sua fórmula, basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Este composto causa neuropatia sensitivo motora, começando com parestesia nas mãos e pés e a sensibilidade tátil e a temperatura são mais afetadas que a vibração (Kaplan, Wiernick, 1982).

A desorganização do transporte axonal é um provável fator causador destes efeitos neuropáticos induzidos pela vincristina, pois esta afeta a estrutura e função das fibras nervosas periféricas ao ligar-se às subunidades da tubulina, proteína dos microtúbulos, causando a dissolução dos microtúbulos axonais, a proliferação de neurofilamentos e a mudanças no fluxo no axoplasma (Green *et al.*, 1977; Topp *et al.*, 2000).

Existe um longo debate sobre a localização do sítio primário que resulta na degeneração axonal distal. Para responder a essa questão, Silva *et al.*, 2006 criaram um modelo de neuropatia induzida por vincristina *in vitro* em ratos. Exposição de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) a dose de 0,05 μM de vincristina mostrou efeitos diferenciais sobre a morte celular, vincristina administrada sobre os corpos dos neurônios do GRD não teve efeito sobre o crescimento de axônios, enquanto a adição de vincristina para o compartimento axonal causa encurtamento axonal sem afetar o crescimento dos axônios vizinhos não expostos. Esses dados apóiam a toxicidade axonal localizada como causa de degeneração axonal distal devido a vincristina, como ilustração sugerida por nós na Figura 2.

Em animais tratados com vincristina, estes podem apresentar neuropatia sensitiva periférica revelada por hiperalgesia mecânica e térmica, como também alodinia térmica e mecânica ou hipoalgesia térmica, associados com significativas alterações histológicas e eletrofisiológicas (Aley *et al.*, 1996; Authier *et al.*, 1999; Nozaki-Taguchi *et al.*, 2001; Aley, Levine, 2002; Authier *et al.*, 2003b, Kaur *et al.*, 2010).

Vincristina causa neuropatia dolorosa em ratos e camundongos verificados por hiperalgesia mecânica e alodinia mecânica (Joseph, Levine, 2003; Saika *et al.*, 2009). Em

ratos a hiperalgesia mecânica foi induzida de maneira dose-dependente por única administração i.v. de 50, 100 ou 200 µg/kg de vincristina e esta persistiu por um período de pelo menos 15 dias, já alodinia mecânica foi induzida somente em animais tratados com dose única de 200 µg/kg de vincristina (Joseph, Levine, 2003). Em camundongos, 7 doses diárias de 100 µg/kg de vincristina intraperitonealmente (i.p.) induziu alodinia mecânica (Saika *et al.*, 2009). Ratos Sprague-Dawley que receberam diariamente (de segunda a sexta-feira) por um período de duas semanas, 20, 100 ou 200 µg de vincristina i.v., não mostraram sinais de neuropatia dolorosa (isto é, inatividade na gaiola, marcha ou postura antálgica, irritabilidade).

Nas doses utilizadas neste modelo, vincristina causou hiperalgesia térmica com doses a partir da primeira dose de 100 µg/kg e 150 µg/kg. Aley *et al.*, 1996, utilizaram doses superiores as nossas (10 doses de 20, 100 ou 200 µg/kg de vincristina) i.v. em ratos de espécie diferente (Sprague-Dawley), mesmo após a última dose estes animais não desenvolveram alteração na sensibilidade térmica. Porém, com o esquema de dose semelhante ao por nós utilizado, vários autores relataram resultados semelhantes. Kaur *et al.*, 2010 relataram que a administração de 10 doses de 50 µg/kg de vincristina i.p. está associada com o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, alodinia ao frio e hiperalgesia ao calor e frio em ratos Wistar. Muthuraman *et al.*, 2008 evidenciaram hiperalgesia térmica refletida por uma redução significativa no limiar de retirada da cauda em ratos albinos tratados com 50 µg/kg de vincristina i.p. Mesmo em espécies diferentes de roedores (camundongos) e/ou estimulação térmica por irradiação a literatura relata hiperalgesia térmica induzida por 12 doses de 125 µg/kg de vincristina i.p. (Kamei *et al.*, 2005; Kamei *et al.*, 2006).

Autores como Aley, Levine, 2002 relataram que vincristina em doses superiores as aqui estudadas, mas por mesma via de administração (10 doses de 100 µg/kg de vincristina, i.v.) causaram hiperalgesia e alodinia mecânica em ratos de espécie diferente (ratos Sprague Dawley) que envolve vias de segundo mensageiro como a proteína quinase A, a proteína quinase C e o óxido nítrico.

A hiperalgesia térmica induzida por vincristina foi investigada associada a dois modelos de colite que induzem hiperalgesia visceral; estes modelos apresentam mecanismos de ação distintos e diferentes padrões de ativação do sistema nervoso periférico e central, pois, a hipersensibilidade somática associada à colite induzida por TNBS envolve fibras aferentes periféricas e a hipossensibilidade somática associada à colite induzida por OM envolvem vias descendentes modulatórias.

Nestes experimentos, doses de vincristina não foram suficientes para causar colite. Estes modelos animais de colite causam alterações somáticas e viscerais induzidas pela inflamação da mucosa do cólon. Neste estudo, demonstrou-se que a colite aguda induzida por TNBS induziu reação de hipersensibilidade somática. Estes resultados estão de acordo com outros autores que também demonstraram aumento da sensibilidade somática induzida por TNBS (Zhou *et al.*, 2008).

Em um modelo de colite aguda induzida por óleo de mostarda, Traub e Wang, 2004 observaram hipossensibilidade somática. Os resultados deste estudo sugerem que os efeitos imediatos da estimulação nociva visceral sobre a sensibilidade somática pode ser inibitória ou excitatória, uma vez que diferentes tipos de retocolite modulam diferentemente o limiar de dor térmica. Estes resultados contraditórios podem ser devidos a mecanismos de ação distintos e diferentes padrões de ativação do sistema nervoso periférico e central.

Vários modelos animais de colite têm sido utilizados para imitar os resultados da doença inflamatória do intestino humano (Hawkins *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 2001; Dieleman *et al.*, 1994). Estudos também têm demonstrado que a colite infecciosa aguda evoca a hiperexcitabilidade de neurônios do GRD que persiste após a resolução da infecção. Esses autores sugerem que os mecanismos de dor periférica podem contribuir para os sintomas pós-infecciosos em doenças como síndrome do intestino irritável pós-infecciosa (Ibeakanma *et al.*, 2009). Efeitos locais ou sistêmicos de mediadores inflamatórios podem contribuir para a aparente discrepância entre os resultados obtidos após a lesão aguda, que pode afetar aferentes periféricos, bem como as vias descendentes moduladoras (Aloe *et al.*, 1997; Cunha *et al.*, 2005; Lamb *et al.*, 2003; Lamb *et al.*, 2004; Lamb *et al.*, 2006).

Muitos autores sugerem que os limiares baixos, em resposta à estimulação mecânica e térmica das patas traseiras, ocorrem por causa do envolvimento dos sítios supra-espinais (Chandler *et al.*, 2002; Ness, Gebhart, 1991; Pezzone *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2005; Traub, Wang, 2004). Aumento do “input” periférico, talvez juntamente com a liberação de fatores como as neurotrofinas, pode alterar as propriedades de neurônios espinais de segunda ordem (sensibilização central). (Bielefeldt *et al.*, 2005; Chen, Sandkuhler, 2000; Kerr *et al.*, 1999).

Curiosamente, os estímulos agudos, tais como a distensão visceral luminal ou a aplicação de substâncias irritantes, podem provocar resultados opostos, tais como as maiores latências e os limiares mais elevados para a estimulação mecânica em áreas distantes dos sítios de convergência somáticos (Chandler *et al.*, 2002; Ness, Gebhart, 1991; Qin *et al.*,

2003; Qin *et al.*, 2005; Traub, Wang, 2004). Esta hipossensibilidade tem sido atribuída ao aumento da inibição da modulação descendente da nocicepção (Ness, Gebhart, 1991; Qin *et al.*, 2003).

Os resultados também revelam que a vincristina também é conhecida por induzir a neuropatia periférica (Authier *et al.*, 2003b; Peixoto Junior *et al.*, 2009) aumentou a hipersensibilidade somática da colite aguda induzida por TNBS, diminuindo ainda mais a latência térmica da retirada da pata. Estes resultados sugerem que a colite aguda induzida por TNBS envolve alterações no sistema nervoso periférico. No entanto, no modelo de colite aguda induzida pelo óleo de mostarda, vincristina reverteu causando hipossensibilidade somática, sugerindo mudanças na modulação do sistema nervoso central (tanto ao nível da medula espinal ou supra-espinal).

Evidências recentes sugerem uma influência inibitória da aferência vagal nas vias centrais da dor através de vias inibitórias descendentes (Chen, Sandkuhler, 2000; Gondim *et al.*, 2005; Kerr *et al.*, 1999). Por conseguinte, é razoável supor que o “input” vagal alterado podem estar envolvido no mecanismo de dor da polineuropatia, uma vez que o nervo vago é afetado em muitas neuropatias periféricas (Ko *et al.*, 2001), incluindo a neuropatia devido a vincristina (Ibeakanma *et al.*, 2009; Lamb *et al.*, 2006). Além disso, a injeção de vincristina em animais causou alterações morfológicas vagal, semelhantes aos dos nervos sensitivos (Peles *et al.*, 2004).

O cruzamento entre as vias aferentes viscerais e somáticas podem contribuir para a coexistência das síndromes de dor. Mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos de alterações sensitivas, devido aos diferentes tipos de colite.

3. Toxicidade dos protocolos

Quanto a parâmetros associados à toxicidade, foi verificada a perda de peso após o tratamento com doses cumulativas de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg de cisplatina, a paralisia da pata traseira em um rato e a piloereção em dois animais tratados com 5 doses de 2 mg/kg de cisplatina.

Vários autores relataram a diminuição no ganho de peso e no déficit motor incluindo diminuição de força muscular e atividade motora em animais tratados com cisplatina (Authier *et al.*, 2000; Authier *et al.*, 2003a; Pisano *et al.*, 2003; Bardos *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2010, Ta *et al.*, 2010).

Quanto aos parâmetros associados à toxicidade, foi verificado dorso arqueado em dois ratos tratados com 5 doses de 150 µg/kg de vincristina e pilo ereção em três animais deste mesmo subgrupo. Marcha neuropática tipo *Toe-walking gait* (Gottschalk *et al.*, 1968) foi identificada em cinco animais tratados com 5 doses de vincristina 150 µg/kg.

Aley *et al.*, 1996 relataram que ratos tratados com vincristina ganham peso em menor razão que ratos controles, mas não há diferença na aparência geral. Ratos que receberam 10 doses de 100 µg/kg de vincristina não ganharam peso durante o período de administração da droga, mas ganharam peso novamente quando o tratamento foi interrompido. O tratamento com 10 doses de 200 µg/kg de vincristina resultam em perda de peso corporal (12,5%), que foi recuperado após interrupção do tratamento.

Não há déficit motor em ratos tratados com única dose, porém modelo em que a neuropatia é induzida por doses múltiplas de vincristina, produz severos efeitos na saúde geral e déficit motor em muitos estudos (Aley *et al.*, 1996; Authier *et al.*, 1999; Nozaki-Taguchi *et al.*, 2001).

4. Estudo eletrofisiológico e morfológico da função autonômica induzida por cisplatina em ratos.

A hipótese de neuropatia autonômica induzida por estes quimioterápicos pode ser comprovada com os resultados eletrofisiológicos e morfológicos, um aumento da atividade elétrica de neurônios simpáticos do gânglio cervical superior foi encontrado em animais tratados com cisplatina, alterações morfológicas em gânglios autonômicos e somáticos e vacuolizações na bainha de mielina e ausência de fibras amielínicas e pouco mielinizadas no nervo vago de animal tratado com esta droga. Não foram encontradas alterações morfológicas nas fibras nervosas que compõem o nervo isquiático de animais tratados com este quimioterápico, mas alterações foram encontradas em neurônios do GRD.

A neurotoxicidade induzida por quimioterápicos pode apresentar-se como neuropatia somática e/ou autonômica e os mecanismos envolvidos ainda não estão estabelecidos (Park *et al.*, 2008). A neuropatia somática induzida por cisplatina está relacionada a lesões neuronais no GRD (Yoon *et al.*, 2010) e o mecanismo da neuropatia induzida por vincristina está relacionada à toxicidade axonal (Green *et al.*, 1977).

Ação da cisplatina em pequenas fibras nervosas vegetativas (mielinizadas ou não), através de possíveis mecanismos diretos, toxicidade nas fibras nervosas, e indiretos, devido a perturbações imunológicas de desordens metabólicas foram relatadas com o uso desta droga (Keime-Guibert *et al.*, 1998; Lebrun *et al.*, 1999; Tuailon *et al.*, 2004). Argyriou *et al.*, 2005, sugeriram que a neuropatia periférica induzida por cisplatina age em fibras pequenas, distais e não mielinizadas, antes de danificar fibras simpáticas ou parassimpáticas para causar sintomas de disautonomia. Condições que afetam as fibras nervosas de pequeno diâmetro, como a neurotoxicidade induzida por cisplatina, são mais susceptíveis a causar disfunção autonômica.

Os resultados são consistentes com De Jonghe e Horn, 2009, que observaram que o vômito, as náuseas, as perturbações da função gastrointestinal, ou a menor ingestão de alimentos induzida por cisplatina pode ter como mecanismo a ativação do rombencéfalo e regiões cerebrais posteriores e rostrais responsáveis pelo circuito emético, possivelmente por via vagal.

As alterações morfológicas das fibras aferentes vagais e dos neurônios ganglionares encontradas nos resultados, confirmam nossa hipótese de neuropatia autonômica induzida por cisplatina em ratos, como o mecanismo para as alterações fisiológicas encontradas na motilidade gastrointestinal e o controle barorreflexo.

A inervação do trato gastrointestinal tem dois componentes: intrínseco e extrínseco. O elemento intrínseco é o sistema nervoso entérico (SNE), que é capaz de controlar os comportamentos entéricos na ausência de comando do cérebro ou da medula espinal. Embora o SNE seja capaz de funcionar independente, este sistema normalmente opera em coordenação com a inervação extrínseca através da qual o intestino e o sistema nervoso central (SNC) interagem (Ratcliffe *et al.*, 2011).

A inervação extrínseca é composta pelos nervos vago e sensitivos espinhais, axônios pré-ganglionares sacral e vagal e “input” simpático dos gânglios pre- e paravertebrais. Dos componentes extrínsecos, o maior número de axônios são sensitivos, além disso, a maioria dos axônios vagais transportam sinais a partir do intestino para o cérebro (Powley, Phillips, 2002).

O nervo vago é um nervo misto e sua morfologia, na porção cervical, consiste de um único fascículo, delimitado por cinco camadas de células achatadas que constituem o perineuro. O endoneuro contém fibras mielinizadas de vários diâmetros, misturadas com as não-mielinizadas, com 75% de fibras aferentes e 25% de fibras eferentes. É possível

identificar a presença de paragânglios de tamanhos diferentes entre a extensão longitudinal da porção cervical deste nervo (Schiavoni, Fazan, 2006).

As fibras aferentes estão envolvidas em reflexos vitais cardiovasculares (barorreflexo) e pulmonares, sua ativação resulta em inibição da ingestão alimentar, do esvaziamento gástrico e estimulação da secreção pancreática e é a entrada gastrointestinal para o sistema nervoso central (Alcântara, 2008). O estômago recebe extensiva inervação sensitiva do nervo vago e aferências espinais via inervação esplânica. E exame topográfico de ratos sugere que o estômago é o órgão visceral mais innervado e o principal candidato para o monitoramento GI da ingestão (Ritter, 2004).

A morfologia da inervação sensitiva vagal gástrica tem sido estudada por Berthoud, Powley (Berthoud e Powley, 1992). Eles descreveram que as terminações vagais sensitivas gástricas apresentam várias morfologias distintas. Terminações laminares intraganglionares (TLI) constituem as terminações que são intimamente intercaladas com os neurônios dos gânglios mioentéricos, enquanto matrizes intramusculares (MI) são terminações extraganglionares embutidas na musculatura lisa de órgãos gastrintestinais inclusive no estômago. Baseado na distribuição e estrutura, estes autores sugerem que TLI devem ser receptores de tensão com função similar ao órgão de Golgi no músculo esquelético e MI devem ser receptores sensíveis ao estiramento muscular similar ao fuso do músculo esquelético. Pouco se sabe sobre a anatomia destas aferências, contudo, estas fibras vagais aferentes também foram encontradas na submucosa gástrica e provavelmente podem ser responsáveis pela estimulação física e química da mucosa pela ingesta (Berthoud e Powley, 1992; Ritter, 2004).

O estudo eletrofisiológico de um gânglio autonômico com neurônios simpáticos em animais tratados com cisplatina está de acordo com os resultados encontrados no estudo do esvaziamento gástrico que sugere hiperatividade simpática, pois a retenção do corante foi revertida pelo bloqueio simpático por guanetidina. Nestes neurônios alteração dos parâmetros relacionados a excitabilidade nervosa foi encontrada, sugerindo ação da cisplatina em canais iônicos para potássio.

Os resultados estão de acordo com achados anteriores pois autores relatam que os mecanismos subjacentes a neurotoxicidade induzida por quimioterapia são diversos e incluem danos aos corpos celulares dos neurônios no gânglio da raiz dorsal e toxicidade axonal através de déficits de transporte ou falha de energia. Identificaram também disfunção do

canal de íons da membrana axonal, incluindo estudos em pacientes tratados com oxaliplatina que revelaram alterações em canais para Na^+ (Park *et al.*, 2008).

Cisplatina se liga preferencialmente a proteínas da membrana mitocondrial, particularmente a canais iônicos dependentes de voltagem (Yang *et al.*, 2006). Muitos autores também reportam esta afinidade da cisplatina por proteínas de membrana. Milosavljevic *et al.*, 2010 evidenciaram que esta droga anti neoplásica é um inibidor de transportadores e canais mecanossensíveis, como o trocador Na^+/H^+ e canais de Cl^- e K^+ , envolvidos no programa de destino celular e/ou expressão em órgãos mecanossensíveis, causando fortes efeitos secundários no ouvido interno ou sistema nervoso periférico, Hori *et al.*, 2010 em seus estudos revelaram que a cisplatina altera a expressão de canais para cátions, envolvidos na nocicepção e termosensibilidade em neurônios do GRD e gânglio trigeminal (GT) e Ta *et al.*, 2010 encontraram que este quimioterápico aumenta canais envolvidos na dor induzida por inflamação e lesão nervosa, no GRD e GT em camundongos.

A investigação eletrofisiológica dos efeitos da cisplatina revelou uma redução de correntes de K^+ e Ca^{+2} ativadas por voltagem, de maneira concentração dependente, em neurônios pequenos do GRD (Scott *et al.*, 1995; Tomaszewski, Busselberga, 2007).

A compreensão da fisiopatologia da neurotoxicidade induzida por quimioterapia, inevitavelmente, auxilia no desenvolvimento de futuras estratégias de neuroproteção e na concepção de novos quimioterápicos com perfis de toxicidade melhorado, sugerindo que as terapias farmacológicas preventivas destinadas a modulação da atividade do canal iônico pode ser útil na redução da neurotoxicidade. Uma investigação dos mecanismos pelos quais cisplatina e vincristina agem em canais iônicos e alteram a excitabilidade nervosa do sistema autonômico, além do estudo morfológico e imunohistoquímico mais detalhados destes tecidos, devem contribuir ainda mais para elucidar a ação destes quimioterápicos no sistema nervoso autônomo.

Considerações finais

Como principais conclusões, o presente estudo mostra que:

1. O tratamento crônico com cisplatina ou vincristina causa retarde transitório na motilidade gastrointestinal alta e baixa.
2. A hiperalgesia térmica é induzida por doses mais baixas de vincristina quando comparadas com as doses que inibem a motilidade gastrointestinal, enquanto que cisplatina não induz alteração da sensibilidade térmica em doses que causam retenção gástrica, indicando que a vincristina induz melhor modelo de neuropatia somática, enquanto o modelo de neuropatia autonômica é reproduzido melhor por cisplatina.
3. A depleção da função do sistema nervoso simpático pela guanetidina não reverte o efeito da vincristina sobre a motilidade gastrointestinal, diferente da cisplatina em que o efeito sobre a motilidade gastrointestinal é revertida pela depleção da função do sistema nervoso simpático, indicando que as alterações na motilidade induzidas por vincristina não são causadas por aumento do tônus simpático, enquanto que estas alterações induzidas por cisplatina estão relacionadas à disfunção simpática.
4. O tratamento crônico com cisplatina ou vincristina causa uma resposta exacerbada ao desafio com fenilefrina e ao bloqueio parassimpático com atropina, indicando que estes quimioterápicos induzem uma disautonomia cardiovascular com alterações de barorreflexos.
5. A disautonomia cardiovascular induzida por cisplatina ou vincristina reforça a idéia de que alterações autonômicas podem ser responsáveis pelo retarde no esvaziamento gástrico, na motilidade do intestino delgado e constipação que surgem durante o tratamento com estes quimioterápicos.
6. As alterações dos parâmetros eletrofisiológicos relacionados à excitabilidade de neurônios simpáticos, em gânglio autonômico de ratos tratados com cisplatina e as alterações morfológicas do nervo vago e gânglios autonômicos nestes animais sugerem que a ação da cisplatina sobre estes tecidos possa ser o mecanismo pelo qual este quimioterápico causa neuropatia autonômica.

Referências bibliográficas

Akbayram, S., Akgun, C., Doğan, M., Sayin, R., Caksen, H., Oner, A.F. 2010. Use of pyridoxine and pyridostigmine in children with vincristine-induced neuropathy. *Indian J. Pediatr.*, 77, 6, 681-683.

Alaedini, A.; Xiang, Z.; Kim, H.; Sung, Y.J.; Latov, N. 2008. Up-regulation of apoptosis and regeneration genes in the dorsal root ganglia during cisplatin treatment. *Exp. Neurol.*, 210, 2, 368 - 374.

Alberts, D.S., Noel, J.K. 1995. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? *Anticancer Drugs*, 6, 3, 369-383.

Alcântara, A.C.L. de, Salgado, H.C., Fazanc, V.P.S. 2008. Morphology and morphometry of the vagus nerve in male and female spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, 4, 1197, 170.

Allerton, R., 1996. Acute mesenteric ischaemia associated with 5-FU, cisplatin and vincristine chemotherapy. *Clin. Oncol.*, 8, 2, 116-117.

Alessandri-Haber, N., Dina, O.A., Joseph, E.K., Reichling, D.B., Levine, J.D. 2008. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J. Neurosci.*, 28, 5, 1046-1057.

Aley, K.O., Levine, J.D. 2002. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience*, 111, 2, 389-397.

Aley, K.O., Reichling, D. B., Levine, J. D. 1996. Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience*, 73, 1, 259–265.

Aloe, L., Manni, L., Properzi, F., De Santis, S., Fiore, M. 2000. Evidence that nerve growth factor promotes the recovery of peripheral neuropathy induced in mice by cisplatin: behavioral, structural and biochemical analysis. *Auton. Neurosci.*, 86, 1-2, 84-93.

Aloe, L., Moroni, R., Angelucci, F., Fiore, M. 1997. Role of TNF-alpha but not NGF in murine hyperalgesia induced by parasitic infection. *Psychopharmacol.*, 134, 3, 287-292.

Andrews, P.L., Davis, C.J., Bingham, S., Davidson, H.I., Hawthorn, J., Maskell, L. 1990. The abdominal visceral innervation and the emetic reflex: pathways, pharmacology, and plasticity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 68, 2, 325-345.

Appleyard, C.B., Wallace, J.L. 1995. Reactivation of of hapteninduced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am. J. Physiol.*, 32, 119-125.

Argyriou, A.A., Koutras, A., Polychronopoulos, P., Papapetropoulos, S., Iconomou, G., Katsoulas, G., Makatsoris, T., Kalofonos, H. P., Chroni, E. 2005. The impact of paclitaxel or cisplatin-based chemotherapy on sympathetic skin response: a prospective study. *Eur. J. Neurol.*, 12, 11, 858-861.

Ashburn, M.A., Lipman, A.G. 1993. Management of pain in the cancer patient. *Anesth. Analg.*, 76, 2, 402 - 416.

Authier, N., Coudore, F., Eschalier, A., Fialip, J. 1999. Pain related behaviour during vincristine-induced neuropathy in rats. *Neuroreport.*, 10, 5, 965-968.

Authier, N., Fialip, J., Eschalier, A., Coudoré, F. 2000. Assessment of allodynia and hyperalgesia after cisplatin administration to rats. *Neurosci. Lett.*, 15, 291, 2, 73-76.

Authier, N., Gillet, J.P., Fialip, J., Eschalier, A., Coudore, F. 2003a. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Exp. Neurol.*, 182, 1, 12-20.

Authier, N., Gillet, J. P., Fialip, J., Eschalier, A., Coudore, F. 2003b. A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. *Neurotoxicology*, 24, 6, 797-805.

Badary, O. A., Awad, A. S., Sherief, M. A., Hamada, F. M. 2006. *In vitro* and *in vivo* effects of ferulic acid on gastrointestinal motility: Inhibition of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats. *World J. Gastroenterol.*, 12, 33, 5363-5367.

Bahl, A., Chakrabarty, B., Gulati, S., Raju, K.N., Raja, A., Bakhshi, S. 2010. Acute onset flaccid quadriplegia in pediatric non-Hodgkin lymphoma: Vincristine induced or Guillain-Barré syndrome? *Pediatr. Blood Cancer*, 1, 55, 6, 1234-1235.

Bahl, A., Sharma, D.N., Julka, P.K., Rath, G.K. 2006. Chemotherapy related toxicity in locally advanced non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Ther.*, 2, 1, 14-16.

Barajon, I., Bersani, M., Quartu, M., Del Fiacco, M., Cavaletti, G., Holst, J. J., Tredici, G. 1996. Neuropeptides and morphological changes in cisplatin-induced dorsal root ganglion neuropathy. *Exp. Neurol.*, 138, 1, 93-104.

Bardos, G., Moricz, K., Jaszlits, L., Rabloczky, G., Tory, K., Racz, I., Bernath, S., Sumegi, B., Farkas, B., Literati-Nagy, B., Literati-Nagy, P. 2003. BGP-15, a hydroximic acid derivative, protects against cisplatin- or taxol-induced peripheral neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 190, 1, 9-16.

Bergman, I., Jakacki, R.I., Heller, G., Finlay, J. 1997. Treatment of standard risk medulloblastoma with craniospinal irradiation, carboplatin, and vincristine. *Med. Pediatr. Oncol.*, 1997. 29, 6, 563-567.

Berthoud, H.R., Powley, T.L. 1992. Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. *J. Comp. Neurol.*, 319:261- 76

Bianchi, G., Vitali, G., Caraceni, A., Ravaglia, S., Capri, G., Cundari, S., Zanna, C., Gianni, L. 2005. Symptomatic and neurophysiological responses of paclitaxel- or cisplatin-induced neuropathy to oral acetyl-L-carnitine. *Eur. J. Cancer.*, 41, 12, 1746-1750.

Bielefeldt, K., Lamb, K., Gebhart, G.F., 2005. Convergence of sensory pathways in the development of somatic and visceral hypersensitivity. *Gastroenterol.* 128, A-125.

Boogerd, W., Ten Bokkel Huinink, W.W., Dalesio, O., Hoppenbrouwers, W.J., Van Der Sande, J.J. 1990. Cisplatin induced neuropathy: central, peripheral and autonomic nerve involvement. *J. Neuro-Oncol.*, 9, 3, 255–263.

Boyle, F.M., Wheeler, H.R., Shenfield, G.M. 1999. Amelioration of experimental cisplatin and paclitaxel neuropathy with glutamate. *J. Neuro-Oncol.*, 41, 2, 107–116.

Bradner, W.T., Schurig, J.E. 1981. Toxicology screening in small animals. *Cancer Treat. Rev.*, 8, 2, 93-102.

Brydoy M., Oldenburg J., Klepp O., Bremnes R.M., Wist E.A., Wentzel-Larsen T., Hauge E.R., Dahl O., Fossa S.D. 2009. Observational study of prevalence of long-term Raynaud-like phenomena and neurological side effects in testicular cancer survivors. *J. Natl. Cancer Inst.* 16, 101, 24, 1682-1695.

Bujalska, M., Makulska-Nowak, H., Gumułka, S.W. 2009. Magnesium ions and opioid agonists in vincristine-induced neuropathy. *Pharmacol. Rep.* 61, 6, 1096-1104.

Bujalska, M., Tatarkiewicz, J., Gumułka, S.W. 2008. Effect of bradykinin receptor antagonists on vincristine- and streptozotocin-induced hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced and diabetic neuropathy. *Pharmacol.* 81, 2, 158-163.

Burns, B.V., Shotton. J.C. 1998. Vocal fold palsy following vinca alkaloid treatment. *J. Laryngol. Otol.* 112, 5, 485-487.

Cabezos, P.A.; Vera, G.; Castillo, M.; Fernández-Pujol, R.; Martín, M.I.; Abalo R. 2008. Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica. *Auton. Neurosci.*, 141, 1-2, 54 - 65.

Cabezos, P.A.; Vera, G.; Martin-Fontelles, M.I.; Fernandez-Pujol, R.; Abalo, R. 2010. Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica. *Neurogastroenterol. Motil.*, 22, 7, 797-805.

Callizot, N., Andriambelason, E., Glass, J., Revel, M., Ferro, P., Cirillo, R., Vitte, P.A., Dreano, M. 2008. Interleukin-6 protects against paclitaxel, cisplatin and vincristine-induced neuropathies without impairing chemotherapeutic activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62, 6, 995-1007.

Camurça, F.D., De Queiroz, D.A., Leal, P.R., Rodrigues, C.L., Gondim, F.A., Da Graça, J.R., Rola, F.H., Nobre e Souza, M.A., dos Santos, A.A. 2004. Gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats is delayed after acute myocardial infarction. *Dig. Dis. Sci.* 49, 5, 757-762.

Cano, J.R.; Catalán, B.; Jará, C. 1998. Neuronopathy due to cisplatin. *Ver. Neurol.*, 27, 158, 606-610.

Cardoso, L.M., Pedrosa, M.L., Silva, M.E., Moraes, M.F.D., Colombari, E., Chianca-Jr, D.A., 2005. Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 205-214.

Carozzi, V.A., Chiorazzi, A., Canta, A., Lapidus, R.G., Slusher, B.S., Wozniak, K.M., Cavaletti, G. 2010. Glutamate carboxypeptidase inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. *Neurotox. Res.* 17, 4, 380-391.

Cata, J.P., Weng, H.R., Dougherty, P.M. 2008. Behavioral and electrophysiological studies in rats with cisplatin-induced chemoneuropathy. *Brain Res.* 1230, 91-98.

Cavaletti, G., Petruccioli, M.G., Tredici, G., Marmioli, P., Barajon, I., Fabbrica, D., Di Francesco, A. 1991. Effects of repeated administration of low doses of cisplatin on the rat nervous system. *Int. J. Tissue React.* 13, 3, 151-157.

Cavaletti, G., Tredici, G., Braga, M., Tazzari, S. 1995. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol. *Exp. Neurol.*, 133, 1, 64-72.

Cece, R., Petruccioli, M.G., Pizzini, G., Cavaletti, G., Tredici, G. 1995. Ultrastructural aspects of DRG satellite cell involvement in experimental cisplatin neuronopathy. *J Submicrosc Cytol. Pathol.* 27, 4, 417-425.

Chabner, B.A., Allegra, C.J.; Curt, G.A.; Calabresi, P. Agentes Antineoplásicos. *In: Goodman, L.S.; Gilman, A.; Hardman, J.G.; Limbird, L.E.* 1996. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 909-949.

Chae, L., Moon, H.S., Kim, S.C., 1998. Overdose of vincristine: experience with a patient. *J. Korean Med. Sci.* 13, 3, 334-338.

Chandler M. J., Qin C., Zhang J., Foreman R.D., 2002. Differential effects of urinary bladder distension on high cervical projection neurons in primates. *Brain Res.*, 949, 97-104.

Chang, F.Y., Lee, S.D., Yeh, G.H., Wang, P.S. 1994. Comparison of two orogastric feeding markers for measuring gastrointestinal motor functions in rats. *Pharmacology.* 49, 151-158.

Chattopadhyay, M., Goss, J., Wolfe, D., Goins, W.C., Huang, S., Glorioso, J.C., Mata, M., Fink, D.J. 2004. Protective effect of herpes simplex virus-mediated neurotrophin gene transfer in cisplatin neuropathy. *Brain.* 127, 929-939.

Chen, J., Sandkuhler, J., 2000. Induction of homosynaptic long-term depression at spinal synapses of sensory A-fibers requires activation of metabotropic glutamate receptors. *Neuroscience*, 98, 141-148.

Chen, T.S., Doong, M.L., Wang, S.W., Tsai, S.C., Lu, C.C., Shih, H.C., Chen, Y.H., Chang, F.Y., Lee, S.D. and Wang, P.S. 1997. Gastric emptying and gastrointestinal transit during lactation in rats. *Am. J. Physiol.* 272, G626-G631.

Chey, R.D., Lee, K.Y., Asbury, R., Chey, W.Y. 1988. Effect of cisplatin on myoelectric activity of the stomach and small intestine in dogs. *Dig Dis Sci*, 33, 3, 338-344.

Citak, E.C., Oguz, A., Karadeniz, C., Karaoglan, B., Tan, M.O., Okur, V., Cansu, A. 2008. Vincristine-induced peripheral neuropathy and urinary bladder paralysis in a child with rhabdomyosarcoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 30, 1, 61-62.

Cornelison, T.L.; Reed, E. 1993. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecol. Oncol.* 50, 2, 147-158.

Cunha, T.M., Verri, W.A. Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5, 1755-1760.

Pabla, N.; Kidney, Z.D. 2008. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* 73, 994 -1007.

Decatris, M.P.; Sundar, S.; O'Byrne, K.J. 2004. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treat. Rev.* 30, 1, 53-81.

De Grandis, D. 2007. Acetyl-L-carnitine for the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a short review. *CNS Drugs*. 21 Suppl. 1:39-43; discussion 45-46.

DeVita Jr., V.T., Chu, E. 2008. A History of Cancer Chemotherapy. (AACR Centennial series). *Cancer Res*; 68, 21.

De Jonghe, B.C.; Horn, C.C. 2009. Chemotherapy agent cisplatin induces 48-h Fos expression in the brain of a vomiting species, the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 296, 4, R902-R911.

Dieleman, L.A., Ridwan, B.U., Tennyson, G.S., Beagley, K.W., Bucy, R.P., Elson, C.O. 1994. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 107, 6, 1643-1652.

Djaldetti, R., Hart, J., Alexandrova, S., Cohen, S., Beilin, B.Z., Djaldetti, M., Bessler, H. 1996. Vincristine-induced alterations in Schwann cells of mouse peripheral nerve. *Am. J. Hematol.*, 52, 4, 254–257.

Dougherty, P.M., Cata, J.P., Burton, A.W., Vu, K., Weng, H.R. 2007. Dysfunction in multiple primary afferent fiber subtypes revealed by quantitative sensory testing in patients with chronic vincristine-induced pain. *J. Pain Symptom Manage.* 33, 2, 166-179.

Dumontet, C., Sikic, B.I. 1999. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J. Clin. Oncol.*, 17, 3, 1061-1070.

Dunlap, E.D., Samols, E., Waite, L.C., Pfeifer, M.A. 1987. Development of a method to determine autonomic nervous system function in the rat. *Metabolism.* 36, 2, 193-197.

Earl, H.M.; Connolly, S.; Latoufis, C.; Eagle, K.; Ash, C.M.; Fowler, C.; Souhami, R.L. 1998. Long-term neurotoxicity of chemotherapy in adolescents and young adults treated for bone and soft tissue sarcomas. *Sarcoma*, 2, 97–105.

Eddy, N.B.; Leimbach, D. 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 107, 385 - 393.

Eglen, R.M., Sharif, N.A., To, Z.P. 1993. Muscarinic M3 receptors mediate total inositol phosphates accumulation in murine HSDM1C1 fibrosarcoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 4, 244, 1, 49-55.

El Maarouf, A.; Kolesnikov, Y.; Pasternak, G.; Rutishauser, U. 2005. Polysialic acid-induced plasticity reduces neuropathic insult to the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 102, 32, 11516 - 11520.

Evans, A.E. 1968. Vincristine (NSC-67574) in the treatment of children with acute leukemia. *Cancer Chemother. Rep.*, 52, 4, 469-471.

Evans, A.E., Farber, S., Brunet, S., Mariano, P.J. 1963. Vincristine in the treatment of acute leukemia in children. *Cancer*, 16, 1302-1306.

Favaro, G., Di Gregorio, F., Panozzo, C., Fiori, M.G. 1988. Ganglioside treatment of vincristine-induced neuropathy. An electrophysiological study. *Toxicology*, 49, 2-3, 325-329.

Fennessy, M.R., Lee, J.R. 1975. The assessment of and the problems involved in the experimental evaluation of narcotic analgesics. *Methods in Narcotic Research*. 73-99.

Flatters, S.J., Bennett, G.J. 2004. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*. 109, 1-2, 150-161.

Forman, A. 1990a. Peripheral neuropathy in cancer patients: incidence, features, and pathophysiology (errata aparece em *Oncology (Huntingt)*, 4, 4, 16, 1990). *Oncology (Williston Park)*, 4,1,57-62.

Forman, A. 1990b. Peripheral neuropathy in cancer patients: clinical types, etiology, and presentation. Part 2. *Oncology (Williston Park)*, 4, 2, 85-89.

Gandara, D.R., Perez, E.A., Weibe, V., De Gregorio, M.W. 1991. Cisplatin chemoprotection and rescue: pharmacologic modulation of toxicity. *Semin. Oncol.* 18 (1 Suppl 3), 49-55.

Gao, W.Q., Dybdal, N., Shinsky, N., Murnane, A., Schmelzer, C., Siegel, M., Keller, G., Hefti, F., Phillips, H.S., Winslow, J.W. 1995. Neurotrophin-3 reverses experimental cisplatin-induced peripheral sensory neuropathy. *Ann. Neurol.* 38, 1, 30-37.

Ghoos, Y., Maes, B., Geypens, B., Mys, G., Hiele, M., Rutgeerts, P., Vantrappen, G. 1993. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology* 104, 1640-1647.

Ghose, A., Tariq, Z., Taj, A., Chaudhary, R. 2011. Acute Dyspnea From Treatment of AL Amyloidosis With Bortezomib. *Am. J. Ther.* 18,4, 123-125.

Gill, J.S., Windebank, A.J. 1998. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J. Clin. Invest.* 101, 12, 2842-2850.

Glendenning, J.L.; Barbachano, Y.; Norman, A. R.; Dearnaley, D.P.; Horwich, A.; Huddart, R.A. 2010. Long-Term Neurologic and Peripheral Vascular Toxicity After Chemotherapy Treatment of Testicular. *Cancer*, 116, 10, 2322 - 2331.

Gomber, S., Dewan, P., Chhonker, D. 2010. Vincristine induced neurotoxicity in cancer patients. *Indian J. Pediatr.* 77, 1, 97-100.

Gondim, F.A.A, de-Oliveira, G.R., Graça, J.R., Cavalcante, D.I., Souza, M.A., Santos, A.A., Rola, F.H. 1998. Variations in gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume changes in awake rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 7, 967-973.

Gondim, F.A.A, Alencar, H.M., Rodrigues, C.L., da Graça, J.R., dos Santos, A.A., Rola, F.H. 1999a. Complete cervical or thoracic spinal cord transections delay gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats. *Spinal Cord.* 37, 11, 793-799.

Gondim, F.A.A., Brannagan, T.H., Sander, H.W., Chin, R.L. Latov, N., 2005. Peripheral neuropathy in patients with inflammatory bowel disease. *Brain*, 128, 867-879.

Gondim, F.A.A.; Oliveira, G.R.; Graça, J.R.; Gondim, R.B.; Alencar, H.M.; Dantas, R.P.; Rola, F.H. 1999b. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume expansion in awake rats. *Neurogastroenterol. Motil.*, 11, 93 - 99.

Gondim, F.A.A., Rodrigues, C.L., Graça, J.R.V., Santos, A.A., Rola, F.H., 2001. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid after thoracic spinal cord transection in awake rats. *Autonomic Neuroscience.* 87, 52-58.

Gondim, F.A.A, Rodrigues, C.L., Lopes, A.C., Jr., Leal, P.R., Camurca, F.L., Freire, C.C., Dos Santos, A.A., Rola, F.H., 2003. Effect of preinjury large bowel emptying on the

inhibition of upper gastrointestinal motility after spinal cord injury in rats. *Dig. Dis. Sci.* 48: 1713-1718.

Gottschalk, P.G., Dyck, P.J., Kiely, J.M. 1968. Vinca alkaloid neuropathy: nerve biopsy studies in rats and in man. *Neurology*, 18, 9, 875–882.

Green, L.S., Donoso, J.A., Heller-Bettinger, I.E., Samson, F.E. 1977. Axonal transport disturbances in vincristine-induced peripheral neuropathy. *Ann. Neurol.*, 1, 3, 255–262.

Gregg, R.W., Molepo, J.M., Monpetit, V.J., Mikael, N.Z., Redmond, D., Gadia, M., Stewart, D.J. 1992. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *J. Clin. Oncol.*, 10, 5, 795–803.

Grosskreutz, J.A., Delsberger, H., Lersch, C., Quasthoff, S. 2000. Oxaliplatin-induced neuropathy differs from cisplatin and taxol neuropathy due to acute alteration of voltage-gated sodium channels in sensory neurons. *Clin. Neurophysiol.*, 111, S43.

Grunberg, S.M., Sonka, S., Stevenson, L.L., Muggia, F.M. 1989. Progressive paresthesias after cessation of therapy with very high-dose cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 25, 1, 62–64.

Hammack, J.E., Michalak, J.C., Loprinzi, C.L., Sloan, J.A., Novotny, P.J., Soori, G.S., Tirona, M.T., Rowland, K.M. Jr., Stella, P.J., Johnson, J.A. 2002. Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cis-platinum-induced peripheral neuropathy. *Pain*. 98, 1-2, 195-203.

Hayakawa, K., Sobue, G., Itoh, T., Mitsuma, T. 1994. Nerve growth factor prevents neurotoxic effects of cisplatin, vincristine and taxol, on adult rat sympathetic ganglion explants in vitro. *Life Sci.* 55, 7, 519-525.

Hiser, L., Herrington, B., Lobert, S. 2008. Effect of noscapine and vincristine combination on demyelination and cell proliferation *in vitro*. *Leuk. Lymphoma*. 49, 8, 1603-1609.

Holzer, P., Holzer-Petsche, U., Leander S. 1986. A tachykinin antagonist inhibits gastric emptying and gastrointestinal transit in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 89: 453-459.

Hori, K., Ozaki, N., Suzuki, S., Sugiura, Y. 2010. Upregulations of P2X3 and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. *Pain* 149, 393–405.

Haggard, M.E., Fernbach, D.J., Holcomb, T.M., Sutow, W.W., Vietti, T.J., Windmiller, J. 1968. Vincristine in acute leukemia of childhood. *Cancer.* 22, 2, 438-444.

Hartmann, J.T., Kollmannsberger, C., Kanz, L., Bokemeyer, C. 1999. Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int. J. Cancer.* 10, 83, 6, 866-869.

Hawkins, J.V., Emmel, E.L., Feuer, J.J., Nedelman, M.A., Harvey, C.J., Klein, H.J., Rozmiarek, H., Kennedy, A.R., Lichtenstein, G.R., Billings, P.C. 1997. Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 42, 9, 1969-1980.

Hinder, R.A., Kelly, K.A. 1977. Canine gastric emptying of solids and liquids. *Am. J. Physiol.* 233, 4, E335-40.

Hirvonen, H.E., Salmi, T.T., Heinonen, E., Antila, K.J., Välimäki, I.A. 1989. Vincristine treatment of acute lymphoblastic leukemia induces transient autonomic cardioneuropathy. *Cancer.* 15, 64, 4, 801-805.

Huang, H., Zhu, L., Reid, B.R., Drobny, G.P., Hopkins, P.B. 1995. Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. *Science*, 270, 5243, 1842-1845.

Ibeakanma, C., Miranda-Morales, M., Richards, M., Bautista-Cruz, F., Martin, N., Hurlbut, D., Vanner, S. 2009. *Citrobacter rodentium* colitis evokes post-infectious hyperexcitability of mouse nociceptive colonic dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* 15; 587, 3505-3521.

Inbar, M., Merimsky, O., Chaitchik, S. 1995. Carboplatin-related idiosyncrasy. *Anticancer Drugs.* 6, 6, 775-776.

Isonishi, S., Saitou, M., Yasuda, M., Tanaka, T. 2001. Mitochondria in platinum resistant cells. *Hum Cell*. 14, 3, 203-210.

James, S.E., Dunham, M., Carrion-Jones, M., Murashov, A., Lu, Q. 2010. Rho kinase inhibitor Y-27632 facilitates recovery from experimental peripheral neuropathy induced by anti-cancer drug cisplatin. *Neurotoxicology*. 31, 2, 188-194.

Jerian, S.M., Sarosy, G.A., Link Jr., C.J., Fingert, H.J., Reed, E., Kohn, E.C. 1993. Incapacitating autonomic neuropathy precipitated by taxol. *Gynecol. Oncol.*, 51, 2, 277–280.

Johnson, I.S.; Armstrong, J.G.; Gorman, M.; Burnett, J.P. 1963. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res.*, 23, 1390-1427.

Johnston, C.F., Shaw, C., Buchanan, K.D. 1985. Vincristine-induced abnormalities of gastrointestinal regulatory peptide cells of the rat. An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.*, 239, 1, 229-233.

Joseph, E.K., Levine, J.D. 2003. Sexual dimorphism for protein kinase c epsilon signaling in a rat model of vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Neuroscience*, 119, 3, 831–838.

Joseph, E.K., Levine, J.D. 2006. Mitochondrial electron transport in models of neuropathic and inflammatory pain. *Pain*. 121, 1-2, 105-114.

Joseph, E.K., Levine, J.D. 2009. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J. Pain*. 10, 5, 534-541.

Jucá, D.M., da Silva, M.T., Junior, R.C. Jr., de Lima, F.J., Okoba, W., Lahlou, S., de Oliveira, R.B., dos Santos, A.A., Magalhães, P.J. 2011. The essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its constituents, α - and β -pinene, show accelerative properties on rat gastrointestinal transit. *Planta Med*. 77, 1, 57-59.

Kamei, J., Tamura, N., Saitoh, A. 2005. Possible involvement of the spinal nitric oxide/cGMP pathway in vincristine-induced painful neuropathy in mice. *Pain*. 117, 1-2, 112-120.

Kamei, J., Nozaki, C., Saitoh A. 2006. Effect of mexiletine on vincristine-induced painful neuropathy in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 24, 536, 1-2, 123-127.

Kanbayashi, Y., Hosokawa, T., Okamoto, K., Konishi, H., Otsuji, E., Yoshikawa, T., Takagi, T., Taniwaki, M. 2010. Statistical identification of predictors for peripheral neuropathy associated with administration of bortezomib, taxanes, oxaliplatin or vincristine using ordered logistic regression analysis. *Anticancer Drugs*. 21, 9, 877-881.

Kaneko, H., Tomomasa, T., Watanabe, T., Takahashi, A., Tabata, M., Hussein, S., Morikawa, A. 2001. Effect of Vincristine on Gastric Motility in Conscious Rats. *Dig. Dis. Sci.* 46, 5, 952-959.

Kaplan, R.S., Wiernick, P.H. 1982. Neurotoxicity of antineoplastic drugs. *Semin. Oncol.*, 9, 1, 103-130.

Kaur, G., Jaggi, A.S., Singh, N. 2010. Exploring the potential effect of *Ocimum sanctum* in vincristine-induced neuropathic pain in rats. *J. Brachial Plex. Peripher. Nerve Inj.* 5, 3.

Keime-Guibert, F., Napolitano, M., Delattre, J.Y. 1998. Neurological complications of radiotherapy and chemotherapy. *J. Neurol.*, 245, 11, 695-708.

Kerr, B.J., Bradbury, E.J., Bennett, D.L., Trivedi, P.M., Dassan, P., French, J., Shelton, D.B., McMahon S.B., Thompson S.W. 1999. Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 15, 19, 12, 5138-5148.

Ki, K.D., Lee, J.M., Lee, S.K., Tong, S.Y., Huh, C.Y., Ryu, J.K., Kim, K.Y., 2010. Pulmonary toxicity after a quick course of combinatorial vincristine, bleomycin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *J. Korean Med. Sci.* 25, 2, 240-244.

- Kimball, E.S., Palmer, J.M., D'Andrea, M.R., Hornby, P.J., Wade, P.R. 2005. Acute colitis induction by oil of mustard results in later development of an IBS-like accelerated upper GI transit in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 288, G1266–G1273.
- Kishibayashi, N., Ichikawa, S., Yokoyama, T., Ishii, A., Karasawa, A. 1993. Pharmacological properties of KF18259, a novel 5-HT₃- receptor antagonist, in rats: inhibition of the distal colonic function. *Jpn. J. Pharmacol.*, 63, 4, 495-502.
- Ko, J.K., Sham, N.F., Guo, X., Cho, C.H. 2001. Beneficial intervention of experimental colitis by passive cigarette smoking through the modulation of cytokines in rats. *J. Investig. Med.* 49, 1, 21-29.
- Krarup-Hansen, A., Rietz, B., Krarup, C., Heydorn, K., Rorth, M., Schmalbruch, H. 1999. Histology and platinum content of sensory ganglia and sural nerves in patients treated with cisplatin and carboplatin: an autopsy study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 25, 1, 29 - 40.
- Lamb, K., Gebhart, G.F., Bielefeldt, K. 2004. Increased nerve growth factor expression triggers bladder overactivity. *J. Pain*, 5, 3, 150-156.
- Lamb, K., Kang, Y.M., Gebhart, G.F., Bielefeldt, K. 2003. Nerve growth factor and gastric hyperalgesia in the rat. *Neurogastroenterol. Motil.* 15, 4, 355-361.
- Lamb, K., Zhong, F., Gebhart, G.F., Bielefeldt, K. 2006. Experimental colitis in mice and sensitization of converging visceral and somatic afferent pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 290, 3, G451-457.
- Latella, G., Sferra, R., Vetuschi, A., Zanninelli, G., D'Angelo, A., Catitti, V., Caprilli, R., Gaudio, E. 2008. Prevention of colonic fibrosis by *Boswellia* and *Scutellaria* extracts in rats with colitis induced by 2,4,5-trinitrobenzene sulphonic acid. *European Journal of Clinical Investigation* . 38, 410-420. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2008.01955.x

Latiff, Z.A., Kamal, N.A., Jahendran, J., Alias, H., Goh, B.S., Syed Zakaria, S.Z., Jamal, R. 2010. Vincristine-induced vocal cord palsy: case report and review of the literature. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32, 5, 407-410.

Lauria, G., Lombardi, R., Borgna, M., Penza, P., Bianchi, R., Savino, C., Canta, A., Nicolini, G., Marmiroli, P., Cavaletti, G. 2005. Intraepidermal nerve fiber density in rat foot pad: neuropathologic-neurophysiologic correlation. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 10, 2, 202-208.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W. Animal Models of Nociception. 2001. *Pharmacol. Rev.* 53, 4, 597-652.

Lebrun, C., Chanalet, S., Frenay, M., Chatel, M. 1999. Leukoencephalopathy in multiple myeloma: two case reports. *Ann. Oncol.* 10, 12, 1515-1517.

Leker, R.R., Peretz, T., Hubert, A., Lossos, A. 1997. Vincristine-induced paralytic ileus in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 3, 2, 109-110.

Lomonaco, M., Milone, M., Batocchi, A. P., Padua, L., Restuccia, D., Tonali, P. 1992. Cisplatin neuropathy: clinical course and neurophysiological findings. *J. Neurol.*, 239, 4, 199-204.

Loss, I. de O., Fernandes L.G., Martins C.D.D., Cardoso, L. M. ; Silva, M.E., Dias-da-Silva V.J., Moraes, M.F.D. ; Chianca D.A. 2007. Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. *Life sciences* 81, 11, 944-950.

Marklund, L., Henriksson, R., Grankvist, K. 2001. Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *Int. J. Cancer*, 93, 4, 577-583.

Matsuki N, Torii Y, Saito H. 1993. Effects of iron and deferoxamine on cisplatin-induced emesis: further evidence for the role of free radicals. *Eur. J. Pharmacol.* 1, 248, 4, 329-331.

Macdonald, D.R., 1991. Neurologic complications of chemotherapy. *Neurol. Clin.* 9, 4, 955-967.

McDonald, E.S., Randon, K.R., Knight, A., Windebank, A.J. 2005. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 18, 305-313.

McDonald, E.S., Windebank, A.J. 2002. Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling. *Neurobiol. Dis.* 9, 220-233.

Meijer, C., de Vries, E.G., Marmiroli, P., Tredici, G., Frattola, L., Cavaletti, G. 1999. Cisplatin-induced DNA-platination in experimental dorsal root ganglia neuronopathy. *Neurotoxicol.* 20, 6, 883-887.

Migita, R., Gonzales, A., Gonzales, M.L., 1997. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J. Appl. Physiol.* 82, 1995–2002.

Milosavljevic, N., Durantou, C., Djerbi, N., Puech, P.H., Gounon, P., Lagadic-Gossmann, D., Dimanche-Boitrel, M.T., Rauch, C., Tauc, M., Counillon, L., Poët, M. 2010. Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res.* 70, 19, 7514-7522.

Minami, H., McCallum, R.W. 1984. The physiology and pathophysiology of gastric emptying in humans. *Gastroenterol.* 86, 1592-1610.

Mollman, J.E., Glover, D.J., Hogan, W.M., Furman, R.E. 1988. Cisplatin neuropathy. Risk factors, prognosis, and protection by WR-2721 *Cancer.* 61, 11, 2192-2195.

Morgan, R.J. Jr., Leong, L., Chow, W., Gandara, D., Frankel, P., Garcia, A., Lenz, H.J., Doroshow, J.H. 2010. Phase II trial of bryostatatin-1 in combination with cisplatin in patients

with recurrent or persistent epithelial ovarian cancer: a California cancer consortium study. *Invest New Drugs*. Oct 9.

Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, W., Depew, W., Szewczuk, M.R., Wallace, J.L. 1989. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterol*. 96, 795-803.

Muthuraman, A., Jaggi, A.S., Singh, N., Singh, D. 2008. Ameliorative effects of amiloride and pralidoxime in chronic constriction injury and vincristine induced painful neuropathy in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 10, 587, 1-3, 104-111.

Naithani, R., Dolai, T.K., Kumar, R. 2009. Bilateral vocal cord paralysis following treatment with vincristine. *Indian Pediatr*. 46, 1, 68-69.

Nathan, P.W., Smith, M.C., Cook, A.W. 1986. Sensory effects in man of lesions of the posterior columns and of some other afferent pathways. *Brain* 109, 1003–1041.

Necchi, D., Scherini, E., Luchini, G., Bernocchi, G. 1995. Effects of cis-dichlorodiammineplatinum on the molecular layer interneurons of the immature rat cerebellum: a putative role for calcium. *Eur. J. Morphol*. 33, 1, 81-89.

Nelson, G., Lucero, C.A., Chu, P., Nation, J., Ghatage, P. 2010. Intraperitoneal chemotherapy for advanced ovarian and peritoneal cancers in patients following interval debulking surgery or primary cytoreductive surgery: Tom Baker Cancer Centre experience from 2006 to 2009. *J. Obstet. Gynaecol. Can*. 32, 3, 263-269.

Nelson, K.A., Walsh, T.D., Sheehan, F.G., O'Donovan, P.B., Falk, G.W. 1993. Assessment of upper gastrointestinal motility in the cancer-associated dyspepsia syndrome. *J. Palliat. Care* 9, 27-31.

Nelson, K.A., Walsh, T.D., Sheehan, F.G. 2002. Cancer and chemotherapy-related upper gastrointestinal symptoms: the role of abnormal gastric motor function and its evaluation in cancer patients. *Support. Care Cancer* 10, 455-461.

Ness T.J., Gebhart G.F., 1991. Interactions between visceral and cutaneous nociception in the rat. I. Noxious cutaneous stimuli inhibit visceral nociceptive neurons and reflexes. *J. Neurophysiol.* 66, 20–28.

Nozaki-Taguchi, N., Chaplan, S.R., Higuera, E.S., Ajakwe, R.C., Yaksh, T.L. 2001. Vincristine-induced allodynia in the rat. *Pain*, 93, 1, 69-76.

O'Callaghan, J.P.; Holtzman, S.G. 1975. Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 192, 497 - 505.

Ogawa, T., Mimura, Y., Kato, H., Ootsubo, S., Murokoshi, M. 2000. The usefulness of rabbit as an animal model for the neuropathological assessment of neurotoxicity following the administration of vincristine. *Neurotoxicol.*, 21, 4, 501–512.

Ozyurek, H., Turker, H., Akbalik, M., Bayrak, A.O., Ince, H., Duru, F. 2007. Pyridoxine and pyridostigmine treatment in vincristine-induced neuropathy. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 24, 6, 447-452.

Pace, A., Giannarelli, D., Galiè, E., Savarese, A., Carpano, S., Della Giulia, M., Pozzi, A., Silvani, A., Gaviani, P., Scaioli, V., Jandolo, B., Bove, L., Cognetti, F. 2010. Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy: a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*, 74, 9, 762-766.

Park, S.B., Krishnan, A.V., Lin, C.S., Goldstein, D., Friedlander, M., Kiernan M.C. 2008. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr. Med. Chem.* 15, 29, 3081-3094.

Peixoto Junior, A.A., Teles, B.C.V., Castro, E.F.B., Santos, A.A., Oliveira, G.R., Ribeiro, R.A., Rola, F.H., Gondim, F.A.A., 2009. Vincristine delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 6, 567-573.

Peles, S., Miranda, A., Shaker, R., Sengupta, J.N. 2004. Acute nociceptive somatic stimulus sensitizes neurones in the spinal cord to colonic distension in the rat. *J. Physiol.* 560, 1, 291-302.

Pezzone, M.A., Liang, R., Fraser, M.O., 2005. A model of neural cross-talk and irritation in the pelvis: implications for the overlap of chronic pelvic pain disorders. *Gastroenterol.*, 128, 7, 1953-1964.

Pezzuolo, D., Pennucci, M.C., Mambrini, A., Pacetti, P., Orlandi, M., Tartarini, R., Del Freo, A., Cantore, M. 2010. Low dose fractionated Cisplatin plus gemcitabine for elderly patients with advanced non small cell lung cancer: a retrospective analysis. *J. Chemother.* 22, 4, 275-279.

Pirovano, C., Balzarini, A., Böhm, S., Oriana, S., Spatti, G.B., Zunino, F. 1992. Peripheral neurotoxicity following high-dose cisplatin with glutathione: clinical and neurophysiological assessment. *Tumori.* 78, 4, 253-257.

Pisano, C., Pratesi, G., Laccabue, D., Zunino, F., Lo Giudice, P., Bellucci, A., Pacifici, L., Camerini, B., Vesci, L., Castorina, M., Cicuzza, S., Tredici, G., Marmiroli, P., Nicolini, G., Galbiati, S., Calvani, M., Carminati, P., Cavaletti, G. 2003. Paclitaxel and Cisplatin-induced neurotoxicity: a protective role of acetyl-L-carnitine. *Clin. Cancer Res.* 15, 9, 5756-5767.

Plotkin, S.R., Wen, P.Y. 2003. Neurologic complications of cancer therapy. *Neurol Clin.*, 21, 1, 279-318.

Powley, T.L., Phillips, R.J. 2002. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, 6, 1217-1225.

Prinz, R.A., Nakamura-Pereira, M., De-Ary-Pires, B., Fernandes, D., Fabião-Gomes, B.D., Martinez, A.M., de Ary-Pires, R., Pires-Neto, M.A. 2005. Axonal and extracellular matrix responses to experimental chronic nerve entrapment. *Brain Res.*, 1044, 2, 164-175.

Punushapai, U., Yuenyao, P., Chumworathayi, B., Luanratanakorn, S., Udomthavornsuk, B. 2010. Weekly cisplatin 20 mg/m² in patients with carcinoma of cervix receiving pelvic radiotherapy at Srinagarind Hospital: a randomized controlled trial. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 11, 1, 201-207.

Quasthoff, S., Hartung, H.P. 2002. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurol.*, 249, 1, 9-17.

Qin C., Malykhina A.P., Akbarali H.I., Foreman R.D. 2005. Cross-organ sensitization of lumbosacral spinal neurons receiving urinary bladder input in rats with inflamed colon. *Gastroenterol.*, 129, 1967–1978.

Qin C., Chandler M.J., Foreman R.D. 2003. Effects of urinary bladder distension on activity of T3–T4 spinal neurons receiving cardiac and somatic noxious inputs in rats. *Brain Res.*, 971, 210–220.

Ratcliffe, E.M., Fan, L., Mohammed, T.J., Anderson, M., Chalazonitis, A., Gershon, M.D. 2011. Enteric Neurons Synthesize Neurexins and are Essential for the Development of the Vagal Sensory Innervation of the Fetal Gut Enteric Vagal Sensory. *Dev. Neurobiol.*, 71, 5, 362-373.

Regô, M.C.V; Graça, J.R.V. da; Gondim, F.A.A.; Gondim, R.B.M.; Dantas, R. P; Rola, F.H. 1998. Effect of pyloroplasty and fundectomy on the delay of gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid elicited by acute blood volume expansion in awake rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31, 3, 431-437.

Reynell, P.C., Spray, G.H., 1956. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal transit of the rat. *J. Physiol.*, 131, 452-462.

Richardson P., Cantwell B.M. 1990. Autonomic neuropathy after cisplatin based chemotherapy. *Br. Med. J.*, 2, 300, 1466-1467.

Riga, M., Psarommatis, I., Korres, S., Varvutsi, M., Giotakis, I., Apostolopoulos, N., Ferekidis, E. 2007. Neurotoxicity of vincristine on the medial olivocochlear bundle. *Int J Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 71, 1, 63-69.

Ritter, R.C. 2004. Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiology & Behavior*, 81, 249–273.

Roca, E., Bruera, E., Politi, P.M., Barugel, M., Cedaro, L., Carraro, S., Chacón, R.D., 1985. Vinca alkaloid-induced cardiovascular autonomic neuropathy. *Cancer Treat. Rep.*, 69, 149-151.

Rodrigues, C.L., Gondim, F.A., Leal, P.R., Camurça, F.D., Freire, C.C., dos Santos, A.A., Rola, F.H. 2001. Gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid throughout the first month after thoracic spinal cord transection in awake rats. *Dig. Dis. Sci.*, 46, 8, 1604-1609.

Roelofs, R.I., Hrushesky, W., Rogin, J., Rosenberg, L. 1984. Peripheral sensory neuropathy and cisplatin chemotherapy. *Neurology*, 34, 7, 934-938.

Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrodes. *Nature*, 205, 698–699.

Roos, I.A., Fairlie, D.P., Whitehouse, M.W. 1981. A peculiar toxicity manifested by platinum (II) amines in rats: gastric distension after intraperitoneal administration. *Chem. Biol. Interact.*, 35, 1, 111-117.

Ryan, S.P., DelPrete, S.A., Weinstein, P.W., Erichson, R.B., Bar, M.H., Lo, K.M., Cohen, N.S., Tepler, I. 1999. Low-dose vincristine-associated bilateral vocal cord paralysis. *Conn Med.*, 63, 10, 583-584.

Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Maeda T, Ozaki M, Kishioka S. 2009. Suppressive effect of imipramine on vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 7, 1231-1234.

Sandler, S.G., Tobin, W., Henderson, E.S. 1969. Vincristine-induced neuropathy. A clinical study of fifty leukemic patients. *Neurology*, 19, 4, 367-374.

Sangeetha, P., Das U.N., Koratkar, R., Suryaprabha, P. 1990. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 1, 15-19.

Sarkar, S., Deb, A.R., Saha, K., Das, C.S., 2009. Simultaneous isolated bilateral facial palsy: a rare vincristine-associated toxicity. *Indian J. Med. Sci.*, 63, 8, 355.

Scheithauer, W. Ludwig, H., Maida, E. 1985. Acute encephalopathy associated with continuous vincristine sulfate combination therapy: case report. *Invest. New Drugs*, 3, 3, 315-318.

Schiavoni, M.C., Fazan, V.P. 2006. There is no relation between the fascicular and the endoneural blood vessel areas on the cervical vagus nerve of normotensive rats. *J. Neurosci. Methods.*, 158, 171-178.

Schiller, J.H. 1996. High-dose cisplatin and vinblastine plus amifostine for metastatic non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* 23, 4 Suppl 8, 78-82.

Scott, R.H., Woods, A.J., Lacey, M.J., Fernando, D., Crawford, J. H., Andrews, P. L. 1995. An electrophysiological investigation of the effects of cisplatin and the protective actions of dexamethasone on cultured dorsal root ganglion neurones from neonatal rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 352, 3, 247-255.

Shapiro, W.R., Young, D.F., 1984. Neurological complications of antineoplastic therapy. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 100, 125-132.

Sharma, S.S., Gupta, Y.K. 1998. Reversal of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats by ginger (*Zingiber officinale*). *J. Ethnopharmacol.*, 62, 1, 49-55.

Shin, D.M., Glisson, B.S., Khuri, F.R., Ginsberg, L., Papadimitrakopoulou, V., Lee, J.J., Lawhorn, K., Gillenwater, A.M., Ang, K.K., Clayman, G.L., Callender, D.L., Hong, W.K., Lippman, S.M. 1998. Phase II trial of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin in patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 16, 4, 1325-1330.

Shiraishi, S., Le Quesne, P.M., Gajree, T., Cavanagh, J.B. 1985. Morphometric effects of vincristine on nerve regeneration in the rat. *J. Neurol. Sci.*, 71, 2-3, 165-181.

Siau, C., Xiao, W., Bennett, G.J. 2006. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp. Neurol.*, 201, 2, 507-514.

Siau, C., Bennett, G.J. 2006. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. *Anesth. Analg.*, 102, 5, 1485-1490.

Siddik, Z.H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 47, 7265-7279. Review.

Siegal, T., Haim, N. 1990. Cisplatin-induced peripheral neuropathy. Frequent off-therapy deterioration, demyelinating syndromes, and muscle cramps. *Cancer*, 66, 6, 1117-1123.

Silva, A., Wang, Q., Wang, M., Ravula, S.K., Glass, J.D. 2006. Evidence for direct axonal toxicity in vincristine neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 11, 3, 211-216.

Smith, B. 1967. The myenteric plexus in drug-induced neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*, 30, 6, 506-510.

Smooenburg, G.F.; De Groot, J.C.; Hamers, F.P.; Klis, S.F. 1999. Protection and spontaneous recovery from cisplatin-induced hearing loss. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 884, 192-210.

Sninsky, C.A. 1987. Vincristine alters myoelectric activity and transit of the small intestine in rats. *Gastroenterology*, 92, 2, 472-478.

Souza, M.A.N., Souza, M.H.L.P., Palheta Jr., R.C., Cruz, P.R.M., Medeiros, B.A., Rola, F.H., Magalhães, P.J.C., Troncon, L.E.A., Santos, A. A. 2009. Evaluation of gastrointestinal motility in awake rats: a learning exercise for undergraduate biomedical students *Advan. in Physiol. Edu.* 33, 4, 343-348.

Stathopoulos, G.P., Antoniou, D., Dimitroulis, J., Michalopoulou, P., Bastas, A., Marosis, K., Stathopoulos, J., Provata, A., Yiamboudakis, P., Veldekis, D., Lolis, N., Georgatou, N., Toubis, M., Pappas, C., Tsoukalas, G. 2010. Liposomal cisplatin combined with paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in non-small-cell lung cancer: a randomized phase III multicenter trial. *Ann. Oncol.* 21, 11, 2227-2232.

Stubblefield, M.D., Slovin, S., Macgregor-Cortelli, B., Muzzy, J., Scher, H., Wright, J., Esseltine, D., Schenkein, D., O'connor, O.A. 2006. An electrodiagnostic evaluation of the effect of pre-existing peripheral nervous system disorders in patients treated with the novel proteasome inhibitor bortezomib. *Clinical Oncology*, 18, 5, 410-418.

Ta, L.E., Bieber, A.J., Carlton, S.M., Loprinzi, C.L., Low, P.A., Windebank, A.J. 2010. Transient. Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol. Pain.* 5;6, 15.

Tanner, K.D., Levine, J.D., Topp, K.S. 1998a. Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine painful neuropathy in rat. *J. Comp Neurol.*, 395, 4, 481–492.

Tanner, K.D., Reichling, D.B., Levine, J.D. 1998b. Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J. Neurosci.*, 18, 16, 6480–649.

Tanner, K.D., Reichling, D.B., Gear, R.W., Paul, S.M., Levine, J.D. 2003. Altered temporal pattern of evoked afferent activity in a rat model of vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Neuroscience.* 118, 3, 809-817.

- Tarlaci, S. 2008. Vincristine-induced fatal neuropathy in non-Hodgkin's lymphoma. *Neurotoxicology*. 29, 4, 748-749.
- Ter Laak, M.P., Hamers, F.P., Kirk, C.J., Gispen, W.H. 2000. rhGGF2 protects against cisplatin-induced neuropathy in the rat. *J. Neurosci. Res.* 60, 2, 237-244.
- Thibault, K., Elisabeth, B., Sophie, D., Claude, F.Z., Bernard, R., Bernard, C. 2008. Antinociceptive and anti-allodynic effects of oral PL37, a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, in a rat model of peripheral neuropathic pain induced by vincristine. *Eur. J. Pharmacol.* 600, 1-3, 71-77.
- Thompson, S.W., Davis, L.E., Kornfeld, M., Hilgers, R.D., Standefer, J.C. 1984. Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer*, 54, 7, 1269–1275.
- Timmer-Bosscha, H. 1992. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance: a review. *B. J. Cancer*, 66, 2, 227.
- Tomaszewski, A., Büsselberg, D. 2007. Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. *Neurotoxicol.*, 28, 49-58.
- Toker, E., Yenice, O., Oğüt, M.S. 2004. Isolated abducens nerve palsy induced by vincristine therapy. *J AAPO*, 8, 1, 69-71.
- Topp, K.S., Tanner, K.D., Levine, J.D. 2000. Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 424, 4, 563–576.
- Traub, R.J., Wang, G. 2004. Colonic inflammation decreases thermal sensitivity of the forepaw and hindpaw in the rat. *Neurosci. Lett.*, 359, 81–84.

Triantaphyllidis, H., Bader, J.P. 1974. Circadian rhythmicity of the intestinal transit in rats and its disturbance through experimental hyperthyroidism. *Scand. J. Gastroenterol.* 9, 487-494.

Troncon, L.E.A. 2008. Motilidade gástrica: fisiopatologia e métodos de estudo. Stomach motility: pathophysiology and methods of study. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*, 2, 1, 14-25.

Troncon, L.E.A., Bennett, R.J., Ahluwalia, N.K., Thompson, D.G. 1994. Abnormal intra-gastric distribution of food during gastric emptying in functional dyspepsia patients, *Gut* 35, 327–332.

Troncon, L.E.A., Santos, A.A., Garbacio, V.L, Secaf, M., Verceze, A.V., Cunha-Melo, J.R. 2000. Inhibition of gastric emptying and intestinal transit in anesthetized rats by a *Tityus serrulatus* scorpion toxin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 9, 1053-1058.

Tuailon, E., Marie, I., Athoy, P., Lévesque, H. 2004. Courtois Une cause d'hypotension orthostatique sévère peu banale ou une complication du cisplatine à ne pas méconnaître> Severe autonomic neuropathy related to cisplatin chemotherapy *Mots clés:* Manifestations neurologiques; Syndrome dysautonomique. *La Revue de Médecine Interne*, 25, 321–327.

Umapathi, T., Chaudhry, V. 2005. Toxic neuropathy. *Curr. Opin. Neurol.*, 18, 5, 574-580.

Uy, Q.L., Moens, T.H., Johns, R.J., Owens, A.H. Jr. 1967. Vincristine neurotoxicity in rodents. *Johns Hopkins Med J.*, 121, 5, 349-360.

Van Der Hoop, R.G., Van Der Burg, M.E., Ten Bokkel Huinink, W.W., Van Houwelingen, C., Neijt, J.P. 1990. Incidence of neuropathy in 395 patients with ovarian cancer treated with or without cisplatin. *Cancer*, 66, 8, 1697–1702.

Vandertop, W.P., de Vries, W.B., Notermans, N.C., Nijsen, M.J., de Wildt, D.J., Tulleken, C.A., Gispen, W.H. 1996. Cisplatin-induced autonomic neuropathy: does it really exist? *J Neurooncol.*, 27, 1, 53-60.

Velasco, R., Bruna, J. 2010. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: an unresolved issue. *Neurologia*, 25, 2, 116-131.

Verdú, E., Vilches, J.J., Rodríguez, F.J., Ceballos, D., Valero A, Navarro X. 1999. Physiological and immunohistochemical characterization of cisplatin-induced neuropathy in mice. *Muscle Nerve*, 22, 3, 329-340.

Walsh, T.J., Clark, A.W., Parhad, I.M., Green, W.R. 1982. Neurotoxic effects of cisplatin therapy. *Arch. Neurol.*, 39, 11, 719–720.

Wang, S.C., Lu, K.Y., Chen, S.M., Young, T.K. 2001. Gastric Emptying and Intestinal Transit of Liquid and Solid Markers in Rats with Chronic Uremia *Chin. J. of Physiol.*, 44, 2, 81-87.

Wang, W.S., Chiou, T.J., Liu, J.H., Fan, F.S., Yen, C.C., Chen, P.M. 2000. Vincristine-induced dysphagia suggesting esophageal motor dysfunction: a case report. *Jpn J. Clin. Oncol.*, 30, 11, 515-518.

Weissman-Fogel, I., Dashkovsky, A., Rogowski, Z., Yarnitsky, D., 2008. An animal model of chemotherapy-induced vagal neuropathy. *Muscle Nerve*, 38, 6, 1634-1637.

Windebank, A.J. 1999. Chemotherapeutic neuropathy. *Curr Opin Neurol.*, 12, 5, 565–571.

Wright, R.A., Clemente R., Wathen, R. 1984. Gastric emptying in patients with chronic renal failure receiving hemodialysis. *Arch. Intern. Med.*, 144: 495-496.

Wongtawatchai, T., Agthong, S., Kaewsema, A., Chentanez, V. 2009. Sex-related differences in cisplatin-induced neuropathy in rats. *J Med Assoc Thai.*, 92, 11, 1485-1491.

Xiao, W.H., Bennett, G.J. 2008. Chemotherapy-evoked neuropathic pain: Abnormal spontaneous discharge in A-fiber and C-fiber primary afferent neurons and its suppression by acetyl-L-carnitine. *Pain*, 135, 3, 262-270.

Yang, Z., Schumaker, L.M., Egorin, M.J., Zuhowski, E.G., Guo, Z., Cullen, K.J. 2006. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 12, 19, 5817-5825.

Yeh, E.T., Tong, A.T., Lenihan, D.J., Yusuf, S.W., Swafford, J., Champion, C., Durand, J.B., Gibbs, H., Zafarmand, A.A., Ewer, M.S., 2004. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation*, 109, 25, 3122-3131.

Yoon, M.S., Bechmann, L., Obermann, M., Yepnjou, O., Egensperger, R., Gerken, G., Katsarava, Z., Thomale, J., Holtmann, G. 2010. Recombinant human erythropoietin counteracts cisplatin-induced visceral hyperalgesia. *Neurosci Bull*, 26, 4, 282-288.

Yoon, M.S., Katsarava, Z., Obermann, M., Schäfers, M., Liedert, B., Dzagnidze, A., Kribben, A., Egensperger, R., Limmroth, V., Diener, H.C., Thomale, J. 2009. Erythropoietin overrides the triggering effect of DNA platination products in a mouse model of cisplatin-induced neuropathy. *BMC Neurosci*. 15, 10, 77.

Yoshida, N., Omoya, H., Ito, T. 1992. DAT-582, a novel serotonin₃ receptor antagonist, is a potent and long-lasting antiemetic agent in the ferret and dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260, 3, 1159-1165.

Zhou, Q.Q., Price, D.D., Caudle, R.M., Verne, G.N. 2008. Visceral and somatic hypersensitivity in TNBS-induced colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 53, 2, 429- 435.

ANEXOS

ANEXO 1



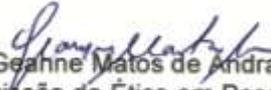
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 49/07, sobre o projeto intitulado: "ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA CISPLATINA, TAXOL, VINCRISTINA E BORTEZOMIB NA FUNÇÃO DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO EM RATOS", de responsabilidade de Francisco de Assis de Aquino Gondim, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 25 de junho de 2008.

Fortaleza, 25 de junho de 2008


Profa. Dra. Geanine Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

ORIGINAL ARTICLE: PRECLINICAL

Repeated Cisplatin Treatments inhibit Gastrointestinal Motility and Induces Baroreflex Changes and Mechanical Hyperalgesia in Rats

Kátia Virginia Viana-Cardoso,^{1,4} Moisés Tolentino B. da Silva,¹ Raimundo Campos Palheta Júnior,¹ Arnaldo A. Peixoto Junior,^{1,2} Lucas Gomes Pinho,¹ Armenio Aguiar dos Santos,¹ Ronaldo A. Ribeiro,¹ Francisco Hélio Rola,¹ and Francisco de Assis A. Gondim^{1,2,3}

Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil,¹ Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil,² Department of Neurology and Psychiatry, Saint Louis University, St. Louis, Missouri, USA³

Cisplatin is a chemotherapy agent known for its neurotoxicity. We evaluated the effect of cisplatin on the gastric emptying (GE), gastrointestinal (GI) transit of liquid, baroreflex function, thermal, and mechanical withdrawal latencies in rats. Cisplatin increased the GE of liquid with doses ≥ 2 mg.kg⁻¹ by 59.7–77.4%. This GE delay was not present two weeks after the treatment with five doses of cisplatin at 1 mg.kg⁻¹. Cisplatin also enhanced baroreflex gain possibly by increasing sympathetic activity. Our results demonstrated that cisplatin (2–10 mg.kg⁻¹) causes autonomic neuropathy with GI and baroreflex changes and mechanical but not thermal hyperalgesia in rats.

Keywords: Autonomic neuropathy, Baroreflex, Cisplatin, Gastric emptying, Gastric motility, Rats

INTRODUCTION

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum [II]), which was first described as a chemotherapy agent in 1965 by Rosenberg et al. (1), is one of the most frequently employed agents for the treatment of a broad range of solid tumors (2, 3). The efficacy of platinum-based chemotherapy is limited by the development of cellular and clinical resistance (4, 5), leading to therapeutic failure and dose-limiting side effects, i.e., nephrotoxicity (6, 7), neurotoxicity (8), ototoxicity (9, 10) and liver toxicity (11).

The pathogenesis of cisplatin-induced neurotoxicity is still not completely understood. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following chronic cisplatin treatment in rats revealed distal axonal damage. However, it could not distinguish a sensory neuropathy from a length-dependent sensory neuropathy (12). Upregulation of apoptosis and regeneration genes in the dorsal root ganglia has been demonstrated in rats (13). In humans, even in lower doses,

there is degeneration of large sensory neurons without evidence of distal axonal degeneration (14).

In humans, autonomic function testing may demonstrate additional sympathetic abnormalities, such as orthostatic hypotension and parasympathetic abnormality evidence by an abnormal valsalva ratio (15). Nausea and vomiting are one of the most common side effects of chemotherapy, including cisplatin treatment. Cisplatin dose-dependently induces gastric stasis, stomach distension, anorexia, and GI dysmotility in rats (16, 17). A single dose of cisplatin can produce dose-related inhibition of GE in mice and rats (18). However, the course of these gastrointestinal (GI) motility changes in relation to the other autonomic changes has not been adequately studied in humans or animals. Thus, the aim of this study is to evaluate the impact of intravenous (i.v.) cisplatin treatment on the GE and GI transit of liquid in awake rats and the relationship between these abnormalities and the development of baroreflex and sensory changes.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Experiments were performed on 107 male Wistar rats, weighing between 150–200 g. All animals were brought from the breeding station at the School of Medicine of the Universidade Federal do Ceará and were housed under standardized conditions. All procedures and animal treatments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [DHEW Publication No. (NIH) 85-23, Bethesda, MD, USA] and were approved by the Institutional Review Board of the Universidade Federal do Ceará (Protocol 49/07).

Cisplatin (Tecnoptatin, Eurofarma/Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, São Paulo-SP, 10 mg.mL⁻¹) was administered by i.v. injection into the tail vein at doses of 0.5 mg.Kg⁻¹,

⁴Part of the requirements for a PhD thesis to be presented by KVV Cardoso at the Universidade Federal do Ceará.

Correspondence to: Kátia Virginia Viana-Cardoso, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Alexandre Gusmão, 949 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, 60430-160, Brazil. email: kvvc2004@yahoo.com.br

ANEXO 3 – Publicação submetida

[Imprimir](#) - [Fechar janela](#)

Assunto: Your manuscript (NMO-0070-2011) has been submitted to Neurogastroenterology and Motility

De: maggy.barber@gmail.com [mailto:maggy.barber@gmail.com]

Para: palhetajunior@gmail.com; moisesfisb@yahoo.com.br; moisesfisb@yahoo.com.br; helanoku@yahoo.com.br; debora.pavani@hotmail.com; livvc2004@yahoo.com.br; guilabotuto.br; gioracel@uol.br; rhdolive@wmp.usp.br; marcolivic.br

Data: Sábado, 10 de Setembro de 2011 1:10

Dear Professor Santos,

Thank you for your manuscript entitled "ATRIAL STRETCH DELAYS THE GASTRIC EMPTYING OF LIQUIDS IN AWAKE RATS", submitted for consideration for publication in <http://mc.manuscriptcentral.com/nmo>.

The Journal has recently revised its Instructions to Authors, adding new or updated requirements for disclosures and a statement of contributions of each author. If you have not followed these already, please revise your acknowledgments section accordingly and submit a revised manuscript file to me (maggy.barber@gmail.com). This can be done immediately or at the time of revision, assuming your manuscript is accepted for publication.

This paper will be sent out to referees and we will contact you in due course as to its suitability for publication.

Yours sincerely,

Maggy Barber
Editorial Office, Neurogastroenterology and Motility