



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ANAMARIA FALCÃO PEREIRA**

**PAPEL DO OXALATO NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA  
POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS: COMPARAÇÃO ENTRE A  
OXALIPLATINA E SEU ANÁLOGO LIVRE DE OXALATO**

**FORTALEZA**

**2015**

ANAMARIA FALCÃO PEREIRA

PAPEL DO OXALATO NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR  
OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS: COMPARAÇÃO ENTRE A OXALIPLATINA  
E SEU ANÁLOGO LIVRE DE OXALATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Lima Vale

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA

2015

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

- 
- P489p Pereira, Anamaria Falcão.  
Papel do oxalato na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos : comparação entre a oxaliplatina e seu análogo livre de oxalato / Anamaria Falcão Pereira. – 2015.  
130 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.  
Coorientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.
1. Quimioterapia. 2. Compostos de Platina. 3. Doenças do Sistema Nervoso Periférico. 4. Oxalatos. I. Título.

---

CDD 618.0461

ANAMARIA FALCÃO PEREIRA

PAPEL DO OXALATO NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR  
OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS: COMPARAÇÃO ENTRE A OXALIPLATINA  
E SEU ANÁLOGO LIVRE DE OXALATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Farmacologia.  
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 08/10/2015.

BANCA EXAMINADORA

---

Profª. Dra. Mariana Lima Vale (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Carlos Campos Câmara  
Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por ter sempre iluminado os meus passos e me dado força e determinação para lutar pelos meus objetivos.

Aos meus pais, Maria Jalva Falcão Pereira e Francisco Aldemir Pereira, por terem me dado a vida, ensinando-me a vivê-la com dignidade; pelo amor, carinho e apoio, dedicados a mim, incentivo ao estudo e por terem me dado uma educação de qualidade. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, tanto os de felicidade quanto os mais difíceis. Vocês são os responsáveis pela formação do meu caráter, pelo que sou hoje. Essa conquista é nossa.

Ao meu irmão, Francisco Lucas Falcão Pereira, que também esteve ao meu lado e acompanhou a minha caminhada.

Ao meu noivo, Hector Galdino Rodrigues, que sempre está ao meu lado me apoiando, pelo amor e carinho, dedicados a mim, pelos momentos de descontração, pela paciência nos momentos de ausência, em que precisei me dedicar a este trabalho. Obrigada pela ajuda nos experimentos, sua participação foi essencial para a realização deste trabalho. Você é uma pessoa muito especial na minha vida e quero comemorar e partilhar cada conquista ao seu lado. Te amo.

À Profa. Dra. Mariana Lima Vale, minha orientadora, pela oportunidade, ensinamentos, paciência, incentivo e presença constante durante esses dois anos de mestrado.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), meu co-orientador, pelos ensinamentos e contribuição neste trabalho.

Às Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar e Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong, por terem participado da minha banca de qualificação e pela contribuição no aprimoramento deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa e Prof. Dr. Carlos Campos Câmara, por terem aceitado participar da minha banca de defesa da dissertação e pela grande contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos, alunos da pós-graduação, Fábio Bezerra e Kalina Sousa, pelo apoio e ajuda na realização dos experimentos, a participação de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica, Karoline, Aline, Bruno, Jéssica, Ighor, Larissa, Clertiani, pela contribuição nos experimentos; a participação de vocês foi essencial para a realização deste trabalho.

À Vandinha, técnica do laboratório, pelo apoio nos experimentos e disponibilidade, sua participação foi importante para a realização deste trabalho.

A todos os amigos do LAFICA, pela convivência e momentos de descontração.

Aos meus amigos, Anália Almeida, Bruna Vitoriano, Daisy Jereissati, Juliano Casemiro, Lívia Galvão, Luana David e Tamiris Goebel, pelo apoio, momentos de descontração e compreensão nos momentos em que eu precisei me ausentar para me dedicar à realização deste trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos e contribuição no meu crescimento profissional.

À Dra. Rosemayre Freire e à Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela realização das fotos de microscopia confocal.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade.

## RESUMO

### **PAPEL DO OXALATO NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS: COMPARAÇÃO ENTRE A OXALIPLATINA E SEU ANÁLOGO LIVRE DE OXALATO**

Oxaliplatina (OXL) é um composto de platina de terceira geração com potente atividade citotóxica contra vários tipos de câncer, possuindo um efeito colateral de difícil tratamento, uma severa neuropatia periférica. Estudos sugerem que o oxalato, metabólito da OXL, está envolvido no desenvolvimento dessa neuropatia sensitiva periférica (NSP); de modo que foi publicada a síntese de um análogo (LLC-1402) da OXL, livre de oxalato, tendo propriedades antitumorais (LIU *et al.*, 2013). O objetivo do trabalho é estudar o papel do oxalato na neuropatia induzida por OXL em camundongos, comparando a OXL com LLC-1402. A NSP foi induzida por 2 injeções (iv.) por semana de OXL (2 mg/kg), em camundongos machos Swiss, durante 4 ½ semanas, totalizando 9 injeções. LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg) foi administrado (iv.) seguindo o mesmo esquema. Foram realizados testes nociceptivos (Von Frey eletrônico e TIC), semanalmente. Depois, foi escolhida a dose de 14 mg/kg do LLC-1402 para fazer um outro experimento, no qual foi acrescentada a injeção ip. de oxalato (1,7 mg/kg). No 28º dia, foi feita coleta de sangue para contagem total de leucócitos e dosagens bioquímicas. Nos 28º e 56º dias, foi feita a coleta de medula espinhal e GRD para imunofluorescência para ATF-3, c-FOS, iNOS e NeuN. Os resultados mostraram que a OXL e o LLC-1402 foram capazes de diminuir o limiar de retirada da pata e o tempo de retirada da cauda significativamente ( $p < 0,05$ ), comparado ao grupo controle. A injeção de LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato também foi capaz de reduzir o limiar de retirada da pata e o tempo de retirada da cauda. Os grupos tratados com OXL, LLC-1402 e oxalato mostraram uma redução significativa da contagem total de leucócitos. Para as dosagens bioquímicas (TGO, TGP, ureia, creatinina), não houve diferença estatística entre os grupos. Houve um aumento da imunexpressão de c-Fos no GRD nos grupos tratados com OXL, LLC-1402 e LLC-1402 junto com oxalato nos 28º e 56º dias, e somente oxalato no 28º dia. Foi observado esse aumento no corno dorsal da medula espinhal no 28º dia em todos os grupos tratados. Foi observado um aumento da imunexpressão de ATF-3, no GRD e corno dorsal da medula espinhal, em todos os grupos tratados, nos 28º e 56º dias. Não houve diferença significativa entre os grupos no GRD nem medula espinhal na imunexpressão de iNOS no 56º dia; já, no 28º dia, houve um aumento da imunexpressão de iNOS no GRD. Os resultados mostraram que o oxalato pode estar envolvido parcialmente na NSP induzida por OXL.

**Palavras-chave:** Quimioterapia. Compostos de Platina. Doenças do Sistema Nervoso Periférico. Oxalatos.

## ABSTRACT

### ROLE OF OXALATE IN THE PERIPHERAL SENSORIAL NEUROPATHY INDUCED BY OXALIPLATIN IN MICE: COMPARISON BETWEEN OXALIPLATIN AND ITS OXALATE FREE ANALOGUE

Oxaliplatin (OXL) is a third generation platinum compound with potent cytotoxic activity against several types of cancers, having a side effect is difficult to treat, a severe peripheral neuropathy. Studies suggest that oxalate, OXL metabolite, is involved in the development of peripheral sensory neuropathy (PSN); so that was published the synthesis of an OXL analogue (LLC-1402), oxalate free, which has antitumor properties (LIU *et al.*, 2013). The objective of this research is to study the role of oxalate in OXL induced neuropathy in mice, comparing OXL with LLC-1402. The PSN was induced by two injections (iv.) OXL (2 mg/kg) per week, in male Swiss mice, for 4 ½ weeks, totaling 9 injections. LLC-1402 (7, 14 and 28 mg / kg) was administered (iv.) following the same scheme. Nociceptive tests were performed (electronic von Frey and tail immersion test) weekly. After, it was chosen dose of 14 mg / kg of the LLC-1402 to perform another experiment, in which was added oxalate injection (1.7 mg/kg). In the 28<sup>th</sup> day, it was made blood collection for total leukocyte count and biochemical measurement. In the 28<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> days, spinal cord and DRG were removed for immunofluorescence for ATF-3, c-FOS, iNOS and NeuN. The results showed that both OXL and LLC-1402 were able to decrease the paw withdrawal threshold and tail withdrawal time significantly ( $p < 0.05$ ) compared to the control group. The injection of LLC-1402 together with oxalate and only oxalate was also able to reduce the paw withdrawal threshold and the tail withdrawal time. Moreover, all groups treated with OXL, LLC-1402 and oxalate showed a significant reduction in the total leukocyte count. The biochemical measurement (glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, urea, creatinine) showed no statistical difference between the groups. The results also showed increased c-Fos immunoexpression in GRD in groups treated with OXL, LLC-1402 and LLC-1402 together with oxalate in the 28 and 56 days, and only oxalate the 28<sup>th</sup> day. This increase was observed in the dorsal horn of the spinal cord at 28<sup>th</sup> day in all the treated groups. It was not observed this increase in the dorsal horn of the spinal cord in the 56<sup>th</sup> day. It was observed an increase in immunoexpression of ATF3 in DRG and spinal cord of dorsal horn in all treated groups in the 28<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> days. iNOS immunofluorescence showed no significant difference between groups in the DRG nor spinal cord, already in the 28<sup>th</sup> day, there was an increase in immunoexpression of iNOS in GRD. Thus, the results showed that the oxalate may be partially involved in PSN induced OXL. **Keywords:** Chemotherapy. Platinum Compounds. Peripheral Nervous System Diseases. Oxalates.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Análogos platinos utilizados na quimioterapia do câncer.....	25
Figura 2	– Ligantes instáveis dos análogos platinos utilizados na quimioterapia do câncer.....	27
Figura 3	– Expectativa de vida de pacientes com câncer colorretal metastático.....	28
Figura 4	– Mecanismo de ação da oxaliplatina.....	29
Figura 5	– Mecanismos envolvidos na dor neuropática periférica induzida por OXL.....	34
Figura 6	– Produção de espécies reativas de oxigênio.....	36
Figura 7	– Microglia, astrócitos e oligodendrócitos.....	38
Figura 8	– Composto análogo da oxaliplatina livre de oxalato.....	43
Figura 9.1	– Desenho esquemático do protocolo experimental 1.....	48
Figura 9.2	– Desenho esquemático do protocolo experimental 2.....	49
Figura 9.3	– Desenho esquemático do protocolo experimental 3.....	50
Figura 10	– Hiperalgisia mecânica plantar – Von Frey eletrônico.....	52
Figura 11	– Gânglio da raiz dorsal.....	53
Figura 12	– Criostato utilizado para os cortes dos tecidos.....	54
Figura 13	– Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	61
Figura 14	– Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	63
Figura 15	– Fotomicrografia da imunexpressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	65
Figura 16	– Fotomicrografia da imunexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	67
Figura 17	– Fotomicrografia da imunexpressão de iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	69
Figura 18	– Fotomicrografia da imunexpressão de iNOS no corno dorsal da medula	

	espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	71
Figura 19	– Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	73
Figura 20	– Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	75
Figura 21	– Fotomicrografia da imunexpressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	77
Figura 22	– Fotomicrografia da imunexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	79
Figura 23	– Fotomicrografia da imunexpressão de iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	81
Figura 24	– Fotomicrografia da imunexpressão de iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	83
Figura 25	– Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	85
Figura 26	– Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	87
Figura 27	– Fotomicrografia da imunexpressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	89
Figura 28	– Fotomicrografia da imunexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	91
Figura 29	– Fotomicrografia da imunexpressão de iNOS no gânglio da raiz dorsal	

	de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	93
Figura 30	– Fotomicrografia da imunexpressão de iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	95

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Avaliação da hipernociceção mecânica plantar de camundongos submetidos à injeção de OXL e LLC-1402.....	56
Gráfico 2	– Avaliação da alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à injeção de OXL e LLC-1402.....	57
Gráfico 3	– Avaliação da hipernociceção mecânica plantar de camundongos submetidos à injeção de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	58
Gráfico 4	– Avaliação da alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à injeção de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	59
Gráfico 5	– Análise quantitativa da imunexpressão para c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	62
Gráfico 6	– Análise quantitativa da imunexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	64
Gráfico 7	– Análise quantitativa da imunexpressão para ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	66
Gráfico 8	– Análise quantitativa da imunexpressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	68
Gráfico 9	– Análise quantitativa da imunexpressão para iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	70
Gráfico 10	– Análise quantitativa da imunexpressão para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....	72
Gráfico 11	– Análise quantitativa da imunexpressão para c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	74

Gráfico 12	– Análise quantitativa da imunexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	76
Gráfico 13	– Análise quantitativa da imunexpressão para ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	78
Gráfico 14	– Análise quantitativa da imunexpressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	80
Gráfico 15	– Análise quantitativa da imunexpressão para iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	82
Gráfico 16	– Análise quantitativa da imunexpressão para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	84
Gráfico 17	– Análise quantitativa da imunexpressão para c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	86
Gráfico 18	– Análise quantitativa da imunexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	88
Gráfico 19	– Análise quantitativa da imunexpressão para ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	90
Gráfico 20	– Análise quantitativa da imunexpressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	92
Gráfico 21	– Análise quantitativa da imunexpressão para iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	94
Gráfico 22	– Análise quantitativa da imunexpressão para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....	96

Gráfico 23	– Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à injeção de OXL e LLC-1402.....	98
Gráfico 24	– Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à injeção de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	99
Gráficos 25, 26, 27 e 28	– Dosagens bioquímicas para avaliar funções hepática e renal de camundongos submetidos a injeções de OXL e LLC-1402.....	100
Gráficos 29, 30, 31 e 32	– Dosagens bioquímicas para avaliar funções hepática e renal de camundongos submetidos a injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.....	23
Tabela 2	– Características clínicas da neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL.....	31
Tabela 3	– Escala de Neurotoxicidade Específica da Oxaliplatina.....	31
Tabela 4	– Critério de Toxicidade Comum do Instituto Nacional do Câncer dos EUA.....	32
Tabela 5	– Possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da neurotoxicidade induzida pelo agente antineoplásico OXL.....	33
Tabela 6	– Resumo dos resultados das imunofluorescências realizadas.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATF	Fator de transcrição de ativação
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP7A	ATPase tipo P transporte de cobre
ATP7B	ATPase tipo P transporte de cobre
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CREB	Proteína de ligação a elemento responsivo ao cAMP
CTR	Transportador de cobre
Cx43	Conexina 43
DACH	Diaminociclohexano
DOC	Complexo de oxaliplatina hidratada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
ERK	Sinal extracelular regulado por quinase
FOLFOX	5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina
FOLFOXIRI	5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina, irinotecano
FU	Fluorouracil
g	Gramas
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GSH	Glutathiona reduzida
HCN	Canal ativado por hiperpolarização
Iba-1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado
IB4	Isolectina B4
IL	Interleucina



INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ip.	Intraperitoneal
iv.	Intravenosa
JNK	Quinase c-jun-N-terminal
KCNK	Canal de potássio, subfamília K
Kg	Quilograma
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LLC-1402	Análogo da oxaliplatina
LV	Leucovorin
M	Molar
MAP	Proteína ativada por mitógeno
mg	Milígrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
Nav	Canal de sódio dependente de voltagem
NeuN	Antígeno nuclear neuronal
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	Número de oxidação
NRG1	Neuregulina 1
NSP	Neuropatia sensitiva periférica
OCT	Transportador de cátion orgânico
OCTN	Transportador de carnitina/cátion orgânico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXL	Oxaliplatina
PAR2	Receptor ativado de proteinase 2
PBS	Solução salina tamponada

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial hidrogeniônico
pt	Platina
P2X7	Receptor purinérgico P2X7
RNA	Ácido ribonucleico
SAPK	Proteína quinase ativada por estresse
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TIC	Teste de imersão da cauda
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAAK	Membro 4 da subfamília de canais de potássio de dois poros
TREK1	Membro 1 da subfamília de canais de potássio de dois poros
TRPA1	Receptor potencial transitório Ankyrin 1
TRPM8	Receptor potencial transitório melastatina 8
TRPV1	Receptor potencial transitório vaniloide 1
TRPV4	Receptor potencial transitório vaniloide 4
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UFC	Universidade Federal do Ceará
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro
%	Porcentagem
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Câncer.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Efeito colateral da quimioterapia do câncer: neuropatia sensitiva periférica.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1</b>	<b><i>Compostos de platina.....</i></b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Oxaliplatina.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Mecanismo de ação.....</i></b>	<b>28</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Farmacocinética.....</i></b>	<b>29</b>
<b>2.3.3</b>	<b><i>Efeitos colaterais.....</i></b>	<b>30</b>
<b>2.3.4</b>	<b><i>Efeito neurotóxico.....</i></b>	<b>30</b>
<b>2.3.4.1</b>	<b><i>Marcadores teciduais de neurotoxicidade.....</i></b>	<b>40</b>
<b>2.4</b>	<b>Importância do metabólito oxalato na neurotoxicidade da oxaliplatina.....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>Protocolo experimental e desenho de estudo.....</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>Indução da neuropatia sensitiva periférica por oxaliplatina.....</b>	<b>50</b>
<b>5.5</b>	<b>Preparação e injeção de LLC-1402 (análogo da OXL) e oxalato.....</b>	<b>51</b>
<b>5.6</b>	<b>Testes nociceptivos.....</b>	<b>51</b>
<b>5.6.1</b>	<b><i>Hiperalgisia mecânica plantar.....</i></b>	<b>51</b>
<b>5.6.2</b>	<b><i>Alodínia térmica pelo frio.....</i></b>	<b>52</b>
<b>5.7</b>	<b>Contagem total de leucócitos e dosagens bioquímicas.....</b>	<b>52</b>
<b>5.8</b>	<b>Coleta da medula espinhal lombar e gânglio da raiz dorsal para imunofluorescência.....</b>	<b>52</b>

<b>5.9</b>	<b>Imunofluorescência para ATF-3, c-Fos, iNOS e NeuN em medula espinhal lombar e gânglio da raiz dorsal.....</b>	<b>53</b>
<b>5.10</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>6.1</b>	<b>Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar em camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>55</b>
<b>6.2</b>	<b>Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>55</b>
<b>6.3</b>	<b>Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar em camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>57</b>
<b>6.4</b>	<b>Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>58</b>
<b>6.5</b>	<b>Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>60</b>
<b>6.6</b>	<b>Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>62</b>
<b>6.7</b>	<b>Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>64</b>
<b>6.8</b>	<b>Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>66</b>
<b>6.9</b>	<b>Imunofluorescência para iNOS em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>68</b>
<b>6.10</b>	<b>Imunofluorescência para iNOS em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>70</b>
<b>6.11</b>	<b>Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>72</b>
<b>6.12</b>	<b>Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>74</b>

<b>6.13</b>	<b>Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>76</b>
<b>6.14</b>	<b>Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>78</b>
<b>6.15</b>	<b>Imunofluorescência para iNOS em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>80</b>
<b>6.16</b>	<b>Imunofluorescência para iNOS em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>82</b>
<b>6.17</b>	<b>Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....</b>	<b>84</b>
<b>6.18</b>	<b>Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....</b>	<b>86</b>
<b>6.19</b>	<b>Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....</b>	<b>88</b>
<b>6.20</b>	<b>Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias .....</b>	<b>90</b>
<b>6.21</b>	<b>Imunofluorescência para iNOS em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....</b>	<b>92</b>
<b>6.22</b>	<b>Imunofluorescência para iNOS em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias.....</b>	<b>94</b>
<b>6.23</b>	<b>Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>98</b>
<b>6.24</b>	<b>Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>98</b>

<b>6.25</b>	<b>Dosagens bioquímicas para TGO, TGP, ureia e creatinina de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402.....</b>	<b>99</b>
<b>6.26</b>	<b>Dosagens bioquímicas para TGO, TGP, ureia e creatinina de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato.....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 1.....</b>	<b>119</b>
	<b>APÊNDICE B – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 2.....</b>	<b>122</b>
	<b>APÊNDICE C – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 3.....</b>	<b>125</b>
	<b>APÊNDICE D – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 4.....</b>	<b>128</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células, podendo invadir tecidos e órgãos e espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (RUDDON, 2007). O câncer é umas das principais causas de morte no mundo e um sério problema de saúde pública. No ano de 2012, no mundo, houve em torno de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes causadas por essa doença; sendo o câncer de cólon e reto o terceiro mais comumente diagnosticado em homens; e, o segundo, em mulheres (TORRE *et al.*, 2015). No Brasil, no ano de 2014, o câncer de cólon e reto foi o terceiro mais incidente em homens; e o segundo, em mulheres (INCA, 2014).

A oxaliplatina (OXL), um fármaco de terceira geração da classe dos agentes platinos, é utilizada como primeira linha de tratamento do câncer de cólon e reto (LEVI *et al.*, 2000; DE GRAMONT *et al.*, 2000). A OXL desenvolve uma neuropatia aguda e crônica, que é dolorosa e de difícil tratamento. A fase aguda afeta a maioria dos pacientes que fazem o tratamento com OXL, e a crônica é cumulativa e dose limitante. Esse efeito colateral da OXL tem sido estudado durante estes últimos anos, entretanto o mecanismo completo é inconclusivo e o tratamento eficaz ainda não existe, permanecendo um desafio na prática clínica (PARK *et al.*, 2009; ARGYRIOU *et al.*, 2008).

De acordo com Park *et al.* (2011), faltam conhecimentos claros sobre os mecanismos fisiopatológicos que contribuem para a neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina, sendo improvável que estratégias neuroprotetoras sejam desenvolvidas principalmente em um curto prazo de tempo. Além disso, conforme Peltier e Russel (2002), a neuropatia causada por outros antineoplásicos, como paclitaxel e vincristina, já estão bem documentadas na literatura, com modelos desenvolvidos para o seu estudo; contudo existem poucos modelos animais para a investigação da neuropatia periférica provocada pela OXL.

Muitos pesquisadores têm explorado os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL, a fim de promover um tratamento apropriado e uma gestão eficaz dessa condição. Alguns estudos sugerem que o metabólito da OXL, o oxalato, pode ter participação nesse efeito neurotóxico (LIU *et al.*, 2013). Recentemente, foi publicado um artigo de Liu *et al.* (2013), o qual anuncia a síntese de um análogo da OXL livre de oxalato e com boas propriedades antitumorais. Dessa forma, neste trabalho, propõe-se investigar a participação do oxalato no desenvolvimento da neuropatia sensitiva periférica provocada por OXL.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células causado por alterações na expressão de genes, levando à desregulação do equilíbrio da proliferação e morte celulares e podendo evoluir para uma população de células que podem invadir tecidos e órgãos e espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (RUDDON, 2007).

As causas do aparecimento do câncer são variadas, podendo ser tanto externas quanto internas. Fatores biológicos, ambientais e predisposições genéticas relacionadas a desequilíbrios hormonais são situações que podem prejudicar o comportamento celular, favorecendo o surgimento de neoplasias malignas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas e aumentar a probabilidade de transformações malignas em células normais (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; SILVA, 2006).

A ocorrência mundial do câncer está aumentando por causa do crescimento e envelhecimento da população, bem como um aumento da frequência de fatores de risco estabelecidos, como tabagismo, excesso de peso, sedentarismo e mudança nos padrões reprodutivos associados à urbanização e ao desenvolvimento econômico. Com base nas estatísticas do GLOBOCAN, estimativas mundiais de incidência de câncer e mortalidade produzidas pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC), cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes causadas por essa doença ocorreram em 2012 em todo o mundo. Além disso, o câncer de cólon e reto foi o terceiro mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres, com uma estimativa de 1,4 milhões de casos e 693.900 óbitos no ano de 2012 no mundo (TORRE *et al.*, 2015).

As estimativas da incidência de câncer, para o ano 2014, no Brasil, são válidas também para o ano 2015 e apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma. Os tipos mais incidentes são os cânceres de pele não melanoma (182 mil casos novos), próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (TABELA 1) (INCA, 2014).



Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Fonte: adaptada de Instituto Nacional do Câncer (INCA) – **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

O tratamento do câncer é feito, principalmente, através de excisão cirúrgica, radioterapia, que é um tratamento no qual se utiliza radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem, e quimioterapia, na qual se utiliza medicamentos para

destruir as células doentes que formam o tumor. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade de tratamento (INCA, 2015).

O número de agentes antineoplásicos tem crescido nas últimas décadas, colaborando para o aumento da sobrevivência de pacientes com câncer; contudo os efeitos colaterais da quimioterapia, como náuseas, vômitos, imunossupressão, alopecia, nefrotoxicidade, mucosite, neurotoxicidade, entre outros, prejudicam a qualidade de vida dos pacientes e a eficácia do tratamento (AUTHIER *et al.*, 2009).

## **2.2 Efeito colateral da quimioterapia do câncer: neuropatia sensitiva periférica**

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam de diversas formas, interferindo nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celulares. Apesar do desenvolvimento dirigido no sentido de torná-los capazes de uma ação seletiva sobre os tecidos neoplásicos, os agentes disponíveis manifestam toxicidade considerável sobre os tecidos normais, levando a complicações do uso desses compostos. Assim, deve-se considerar, criteriosamente, o risco versus o benefício quando se opta pela utilização desses agentes (BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

A neuropatia periférica é um efeito colateral comum de vários fármacos antineoplásicos, como cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, vincristina, paclitaxel e bortezomibe. Estes agentes exercem efeitos diretos e indiretos nos nervos sensoriais e reduzem a amplitude da velocidade de condução do potencial de ação, provocando dor em pacientes, especialmente aqueles que experimentam um distúrbio da sensibilidade nociceptiva durante o tratamento. A neuropatia periférica induzida pela quimioterapia do câncer pode ser extremamente dolorosa, resultando em sofrimento do paciente e limitando o tratamento com fármacos antineoplásicos potencialmente úteis (JAGGI; SINGH, 2012). A neuropatia periférica associada à quimioterapia possui um forte impacto econômico e social, pois pacientes nessa condição geram um custo anual no valor de 17.344 dólares a mais que pacientes que não desenvolvem esse efeito colateral (PIKE *et al.*, 2012).

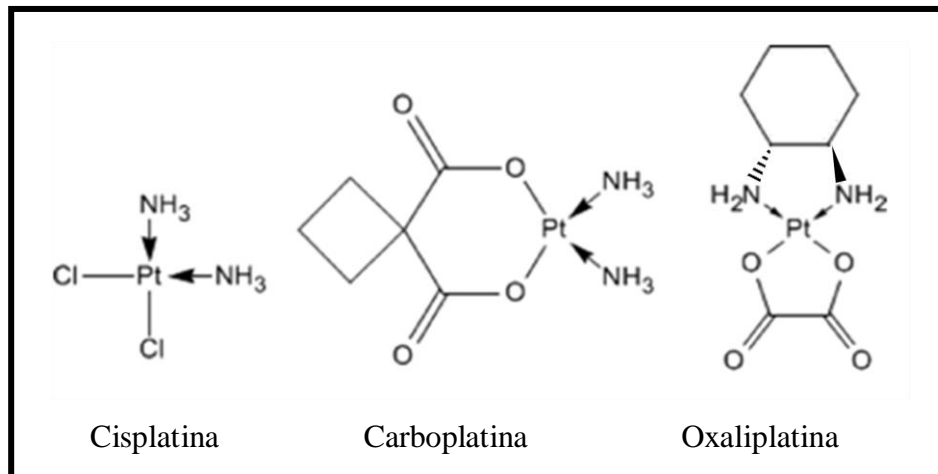
Diversos pesquisadores têm investigado os vários mecanismos envolvidos no surgimento da neurotoxicidade periférica relacionada à quimioterapia, a fim de identificar alvos moleculares úteis para o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras. Desse modo, entre os eventos que desencadeiam o aparecimento da neurotoxicidade periférica e dor neuropática, estão danos no DNA, aumento de espécies reativas de oxigênio intracelulares,

disfunções mitocondriais, alterações no sistema de reparo celular, nos canais iônicos, na sinalização do glutamato, nas MAP quinases e ativação ectópica de nociceptores. Além disso, os locais preferenciais onde a neurotoxicidade causada por quimioterapia ocorre são neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal, células satélites, células de Schwann e células neuronais e gliais da medula espinhal (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

### 2.2.1 Compostos de platina

Os compostos de platina, como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (FIGURA 1), são classificados como agentes alquilantes do DNA e representam uma importante classe de fármacos antitumorais, sendo bastante utilizados no tratamento de um amplo espectro de tumores sólidos em humanos. Os compostos de platina inibem a síntese do DNA através da formação de ligações cruzadas inter e intracadeias. Esses compostos antitumorais se ligam de forma eficiente ao DNA, promovendo a formação de uma variedade de produtos de adição, que bloqueiam a replicação e a transcrição e induzem a morte celular (BRABEC; KASPARKOVA, 2005).

Figura 1 – Análogos platínicos utilizados na quimioterapia do câncer



Fonte: MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009. A figura representa a estrutura química de compostos de platina.

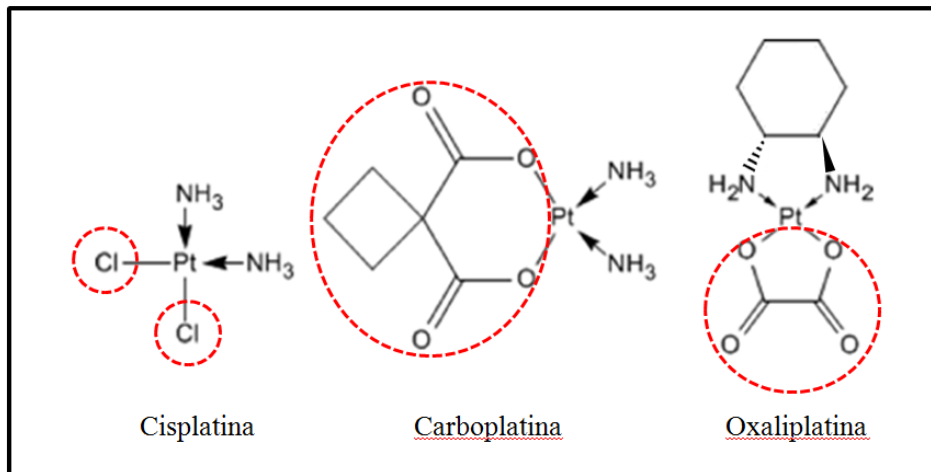
A eficácia do tratamento de neoplasias com medicamentos à base de platina é, geralmente, comprometida devido ao risco substancial para toxicidades graves, como a neurotoxicidade. Esta pode resultar em debilidade aguda e crônica, diminuindo, assim, a qualidade de vida do paciente (MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009). O

tratamento da dor neuropática é feito com anticonvulsivantes, antidepressivos, antioxidantes, opioides e lidocaína tópica, contudo a terapia dessa condição ainda é um desafio, pois, em muitos pacientes, não ocorre o suficiente alívio da dor (BARON; BINDER; WASNER, 2010).

O perfil de neurotoxicidade difere entre os compostos platinos, cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (OXL). A neuropatia periférica causada pela cisplatina, agente platino de 1ª geração, desenvolve-se em aproximadamente 50% dos pacientes. Os sintomas envolvem as extremidades superiores e inferiores, podendo ocorrer parestesias dolorosas, dormência, formigamentos, geralmente durante os primeiros ciclos da quimioterapia. Após a interrupção do tratamento, a disfunção neurológica pode melhorar de forma gradual ou persistir por um período de tempo ou ser permanente. Já a carboplatina, agente platino de 2ª geração, é considerada menos neurotóxica que a cisplatina e OXL. A disfunção neurológica é um efeito colateral que ocorre no tratamento com carboplatina, no entanto aparece mais tarde e, principalmente, após a administração de doses elevadas ou em combinação com outros agentes citotóxicos neurotóxicos. Apenas 4 a 6% dos pacientes submetidos ao tratamento com carboplatina desenvolvem neuropatia periférica. O potencial da OXL, agente platino de 3ª geração, para provocar neurotoxicidade periférica é mais parecido com o da cisplatina. A neuropatia periférica é a toxicidade limitante da dose mais comum da OXL e uma das principais causas da descontinuação do tratamento, existindo dois padrões de neuropatia, uma forma aguda e uma crônica, a qual tem início após múltiplas exposições ao fármaco, podendo melhorar ou persistir após o término da terapia. Além disso, a neuropatia periférica dolorosa provocada pela OXL é caracterizada por um início rápido e intensa alodínia ao frio, uma síndrome de dor, a qual não é ocasionada pelos outros agentes platinos (MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009; AMPTOULACH; TSAVARIS, 2011; JOSEPH; LEVINE, 2009).

Messori, Marzo e Merlino (2015) sugerem que a cisplatina e carboplatina se comportam de forma semelhante quando reagem com proteínas, enquanto que a OXL mostra um comportamento diferente. Assim, as diferenças na reatividade e formação de aductos com proteínas podem estar relacionadas com os perfis farmacológico e toxicológico distintos dos três fármacos: cisplatina, carboplatina e OXL. Antes da ligação com o DNA, os compostos de platina precisam ser ativados, através da liberação de ligantes instáveis: como dois cloretos, no caso da cisplatina; ciclobutanodicarboxilato, no caso da carboplatina, e oxalato, no caso da OXL (FIGURA 2).

Figura 2 – Ligantes instáveis dos análogos platínicos utilizados na quimioterapia do câncer



Fonte: adaptada de MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009. A figura representa a estrutura química dos análogos de platina e seus respectivos ligantes instáveis (circulado), os quais são liberados quando os compostos platínicos são injetados na corrente sanguínea.

### 2.3 Oxaliplatina

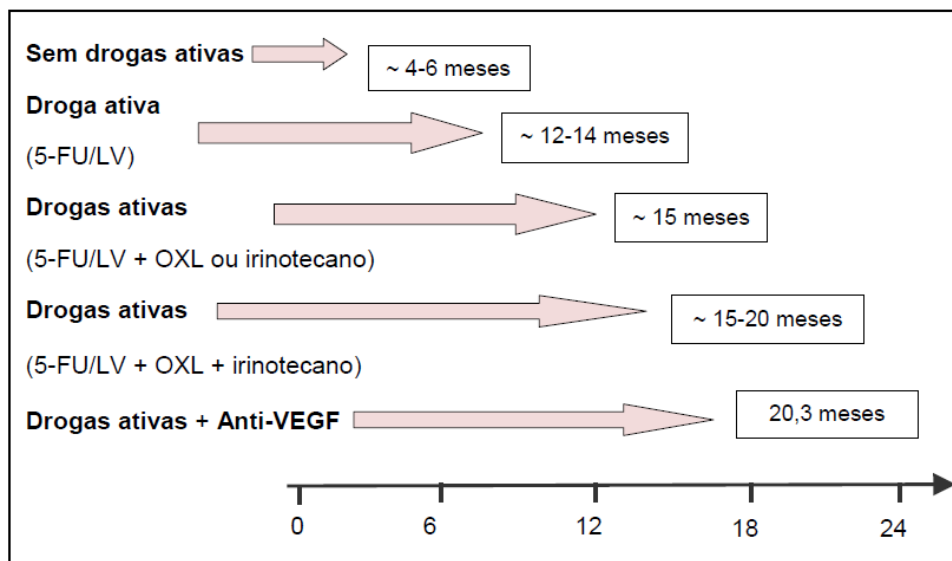
Com o intuito de aumentar a atividade antitumoral e diminuir os efeitos tóxicos dos fármacos utilizados na terapia do câncer, a molécula de oxaliplatina (OXL), trans – 1 – diaminociclohexano – 2 – OH, foi desenvolvida no Japão, em 1970; pertencendo à terceira geração de agentes platínicos (LEVI *et al.*, 2000).

A OXL, com estrutura similar à cisplatina, demonstrou, em estudos pré-clínicos, um amplo espectro de atividade antitumoral em linhas de células cancerosas humanas e toxicidade diferente da cisplatina e dos fármacos de segunda geração, como a carboplatina (KELLAND, 2007; ARGYRIOU *et al.*, 2008). O grupo 1,2-DACH existente na molécula de OXL veio substituir os grupos cis-diamino-Pt da cisplatina, proporcionando uma maior potência contra células cancerosas e requerendo menos complexos de DNA para alcançar a mesma citotoxicidade (BURZ *et al.*, 2008).

A OXL possui uma potente atividade citotóxica em linhas de células cancerosas humanas; em associação com 5-fluorouracil (5-FU) e leucovorin (LV), nos protocolos FOLFOX, constitui um dos esquemas de primeira linha para o tratamento do câncer colorretal metastático (DE GRAMONT *et al.*, 2000), além de ser utilizada na quimioterapia adjuvante (ANDRÉ *et al.*, 2004). Além disso, a OXL é utilizada nos protocolos FOLFOXIRI, em associação com 5-FU, LV e irinotecano. Estudos clínicos confirmaram a ação da OXL também em tumores resistentes à cisplatina, incluindo o câncer de estômago, pâncreas (LOUVET *et al.*, 2002), ovário (DIERAS *et al.*, 2002), mama e pulmão (PETIT *et al.*, 2006).

A incorporação da OXL ou do irinotecano à associação de 5-FU e LV tem aumentado a expectativa de vida de pacientes com câncer de cólon e reto. Com a introdução da OXL, a expectativa de vida dos pacientes com essa doença aumentou de aproximadamente 6 meses para 20,3 meses (FIGURA 3) (VAN CUTSEM, VERSLYPE, DEMEDTS, 2002; GOLDBERG *et al.*, 2004; HURWITZ, 2003).

Figura 3 – Expectativa de vida de pacientes com câncer colorretal metastático

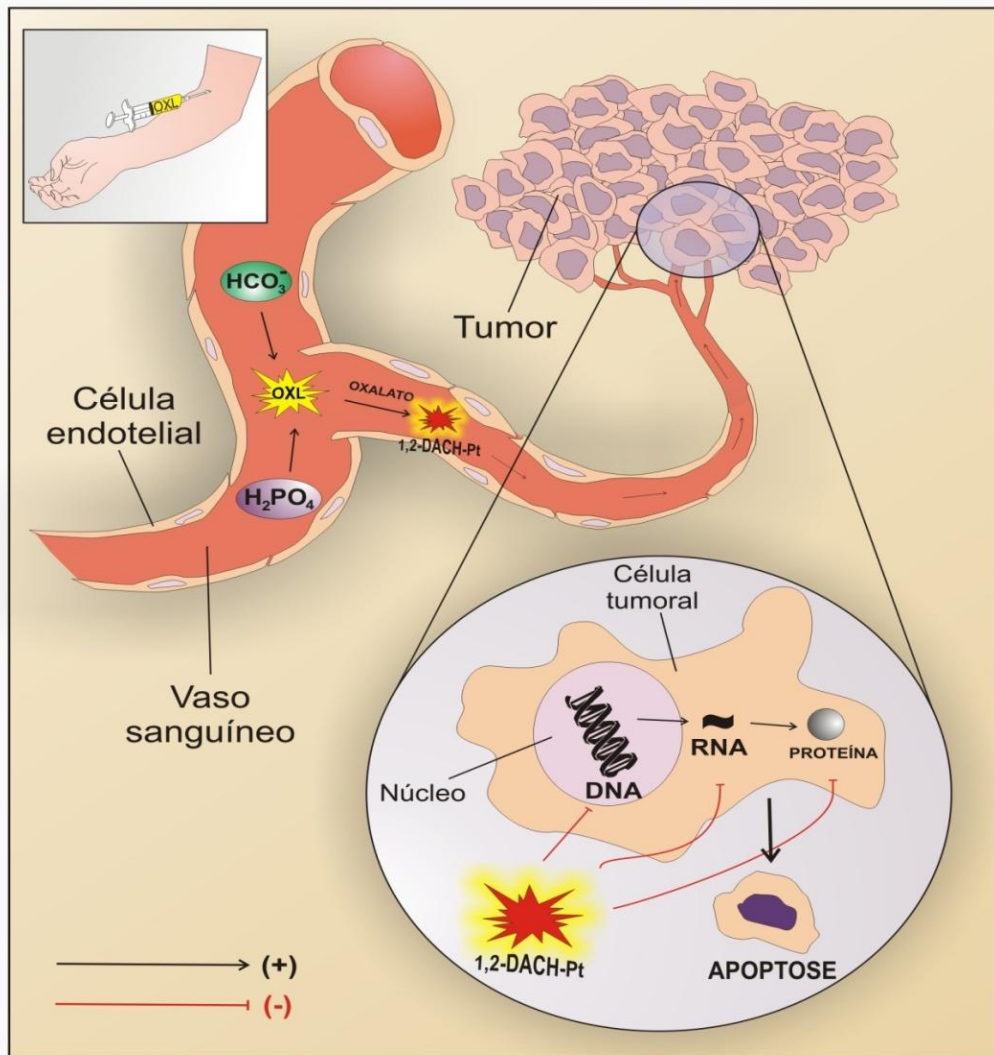


Fonte: adaptada de VAN CUTSEM, VERSLYPE, DEMEDTS, 2002; GOLDBERG *et al.*, 2004; HURWITZ, 2003. A figura representa a expectativa de vida de pacientes com câncer colorretal metastático sem e com tratamento antineoplásico. FU: Fluorouracil; LV: Leucovorin; OXL: Oxaliplatina; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

### 2.3.1 Mecanismo de ação

O alvo do antineoplásico OXL é o DNA, e sua atividade consiste em formar aductos do DNA, havendo o bloqueio de sua duplicação e ocorrendo a apoptose celular. Quando a OXL atinge o vaso sanguíneo, há o desacoplamento do seu grupamento oxalato, ocasionando a formação de intermediários não estáveis, que são hidrolisados a espécies platinas, como o dicloro(1,2-dach)platino e o monocloro(1,2-dach)platino, os quais reagem com o DNA celular, proteínas e outras macromoléculas, resultando em apoptose celular (FIGURA 4) (CHU, 2004; FOLTINOVÁ *et al.*, 2008). Os complexos de pt-DNA formados são capazes de interferir no metabolismo e organização celulares (STILLMAN; CATA, 2006) e mais tóxicos que os metabólitos da cisplatina e carboplatina (PARK *et al.*, 2008).

Figura 4 – Mecanismo de ação da oxaliplatina



Fonte: LINO, 2011. A figura representa o mecanismo de ação da oxaliplatina após ser injetada na corrente sanguínea. DACH: Diaminociclohexano; DNA: Ácido desoxirribonucleico;  $\text{HCO}_3^-$ : Bicarbonato;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ : Dihidrogenofosfato; OXL: Oxaliplatina; Pt: Platina; RNA: Ácido ribonucleico.

### 2.3.2 Farmacocinética

A OXL tem uma meia vida curta, devido a sua rápida captação pelos tecidos. Esse antineoplásico é largamente distribuído para a maioria dos tecidos e tem um volume de distribuição mais elevado que o da cisplatina. Após 2 a 5 horas da infusão de OXL, 40% da platina se liga às hemácias, formando produtos não tóxicos, 30% se liga às proteínas plasmáticas e os 30% restantes correspondem ao fármaco ativo, representando o componente citotóxico. Em relação ao metabolismo, os complexos formados na presença de cloreto e água, como dicloro(1,2-dach)platino, monocloro(1,2-dach)platino e DOC (complexo de

oxaliplatina desidratada), são mais citotóxicos do que a OXL dentro da célula (JERREMALM; WALLIN; EHRSSON, 2009). A maior parte do fármaco é eliminada na urina (CHU, 2004).

### **2.3.3 Efeitos colaterais**

A toxicidade da OXL difere dos compostos platinos de primeira e segunda gerações, sendo o agente platino com efeitos colaterais menos severos (AUTHIER *et al.*, 2009). Dentre os efeitos colaterais, provocados pelo tratamento com OXL, têm sido descritos toxicidade hematológica média, gastrointestinal com náuseas, vômitos e diarreia, efeitos nefrotóxico e ototóxico insignificantes (o que difere a OXL dos outros platinos), febre medicamentosa, reações de hipersensibilidade, fadiga e fibrose pulmonar; entretanto, a toxicidade mais importante relacionada à OXL é a neurológica, possuindo características únicas e sendo dose limitante (ARGYRIOU *et al.*, 2008).

### **2.3.4 Efeito neurotóxico**

O efeito neurotóxico da OXL, manifestado como uma neuropatia sensitiva periférica, acomete mais de 70% dos pacientes e representa a causa mais comum de abandono do tratamento, pois a neurotoxicidade reduz a tolerabilidade à quimioterapia e prejudica a qualidade de vida dos pacientes (PARK *et al.*, 2009). A neuropatia sensitiva periférica induzida pela OXL pode se apresentar de duas maneiras distintas: uma forma aguda e transitória, que aparece geralmente durante as primeiras horas após a infusão desse antineoplásico, e uma forma tardia, que é dose limitante, caracterizada por uma neuropatia sensitiva periférica cumulativa (ARGYRIOU *et al.*, 2008).

A neurotoxicidade aguda tem como sintomas: parestesias distais e periorais exacerbadas pelo frio e são descritas pelos pacientes como sensações de formigamento nas mãos, pés, boca e garganta. Além disso, podem ocorrer câimbras, miotonias, espasmos musculares, disestesias faringolaringeais com dificuldade de respiração e deglutição em 1 a 2% dos pacientes (SCHIFF; WEN; VAN DEN BENT, 2009).

A neuropatia crônica, induzida pela OXL, ocorre em 24 a 48% dos pacientes que recebem doses maiores que 750 a 850 mg/m<sup>2</sup> (ALEJANDRO *et al.*, 2013; GROTHEY, 2003; MOLS *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2009). Os sintomas se caracterizam por parestesias (sensações anormais não desagradáveis, espontâneas ou evocadas), alodínias (dores



ocasionadas por um estímulo que normalmente não provoca dor) e disestesias distais de duração prolongada (sensações anormais desagradáveis, espontâneas ou evocadas), progredindo com ataxia sensitiva, alteração proprioceptiva e déficit funcional e, conseqüentemente, levando a limitações nas atividades diárias do paciente. Geralmente, esses sintomas persistem entre os ciclos de tratamento e aumentam de intensidade com as doses cumulativas. Diferentemente da neuropatia aguda, os sintomas da neuropatia crônica nem sempre são exacerbados pelo frio (GROTNEY, 2005; SAIF; REARDON, 2005). Esses sintomas podem ser parcialmente reversíveis, em 80% dos pacientes, e completamente reversíveis, em 40% deles, em até 6 a 8 meses após a descontinuação do tratamento com OXL (ARGYRIOU *et al.*, 2008). Essas evidências, no entanto, contestam a prática clínica, onde muitos oncologistas afirmam que essa neuropatia nem sempre é reversível, podendo se prolongar por um período maior que 8 meses. Na TABELA 2, pode-se ver a distinção entre a neuropatia sensitiva periférica aguda e a crônica.

Tabela 2 – Características clínicas da neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL

	Neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL	
	Aguda	Crônica
Incidência	85-95%	24-48%
Dose limite de toxicidade	Não	Sim
Sintomas	Parestesia, disestesia	Parestesia, disestesia, ataxia sensorial
Localização	Extremidades, perioral	Extremidades
Ativação	Exposição ao frio	Nada sugerido
Sintomas motores	Espasmos musculares	Não
Início	Agudo	Demorado
Recuperação	Rápida	Devagar
Outros	Disestesias faringolaringeais	Alodinia

Fonte: adaptada de ALEJANDRO *et al.*, 2013; GROTNEY, 2003; MOLS *et al.*, 2013.

A administração crônica de OXL pode provocar uma neuropatia periférica que é semelhante na apresentação dos sintomas, frequência e duração da neurotoxicidade induzida pela cisplatina. Esta provoca uma neuropatia em aproximadamente 50% dos pacientes em tratamento e sua gravidade é, em parte, dependente das quantidades totais de fármaco que o paciente recebe. Além do mais, a neuropatia causada pela cisplatina pode persistir em um

número considerável de pacientes após o término do tratamento e, em alguns casos, é irreversível. A neuropatia periférica provocada pela OXL é diferente da ocasionada pela cisplatina, pois a administração aguda de OXL provoca uma neurotoxicidade aguda, caracterizada por dor, aumento da sensibilidade ao frio, em uma grande porcentagem dos pacientes (KELLEY *et al.*, 2014).

Para avaliar a evolução da neuropatia sensitiva periférica causada pelo agente antitumoral OXL, existem dois critérios utilizados: a Escala de Neurotoxicidade Específica da Oxaliplatina (TABELA 3) e o Critério de Toxicidade Comum do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (TABELA 4) (PARK *et al.*, 2009).

Tabela 3 – Escala de Neurotoxicidade Específica da Oxaliplatina

Escala de Neurotoxicidade Específica da Oxaliplatina	
Grau 1	Disestesia ou parestesia que regride completamente antes do próximo ciclo de terapia.
Grau 2	Disestesia ou parestesia persistindo entre os ciclos de terapia.
Grau 3	Disestesia ou parestesia causando comprometimento funcional.

Fonte: adaptada de PARK *et al.*, 2009.

Tabela 4 – Critério de Toxicidade Comum do Instituto Nacional do Câncer dos EUA

Critério de Toxicidade Comum do Instituto Nacional do Câncer dos EUA	
Grau 1	Assintomática – perda de reflexos do tendão profundo ou parestesia (incluindo formigamento), mas não interferindo na função.
Grau 2	Alteração sensitiva ou parestesia (incluindo formigamento), interferindo na função, mas sem interferir nas atividades diárias.
Grau 3	Alteração sensitiva ou parestesia, interferindo nas atividades cotidianas.

Fonte: adaptada de PARK *et al.*, 2009

Muitos pesquisadores têm explorado diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da neurotoxicidade, induzida pelo agente antineoplásico OXL, com a finalidade de proporcionar uma terapia medicamentosa adequada e, conseqüentemente, uma gestão eficaz dessa condição (TABELA 5) (JAGGI; SINGH, 2012), (FIGURA 5) (SISIGNANO *et al.*, 2014). De acordo com Weickhardt, Wells e Messersmith (2011), o acúmulo dependente da dose de compostos de platina em gânglios da raiz dorsal pode contribuir para atrofia neuronal e apoptose e, conseqüentemente, promover a neuropatia sensitiva periférica.

A neuropatia induzida pela OXL causa severos efeitos neuronais, como o aumento da atividade dos canais iônicos regulados por ligantes e voltagem (SISIGNANO *et al.*, 2014).

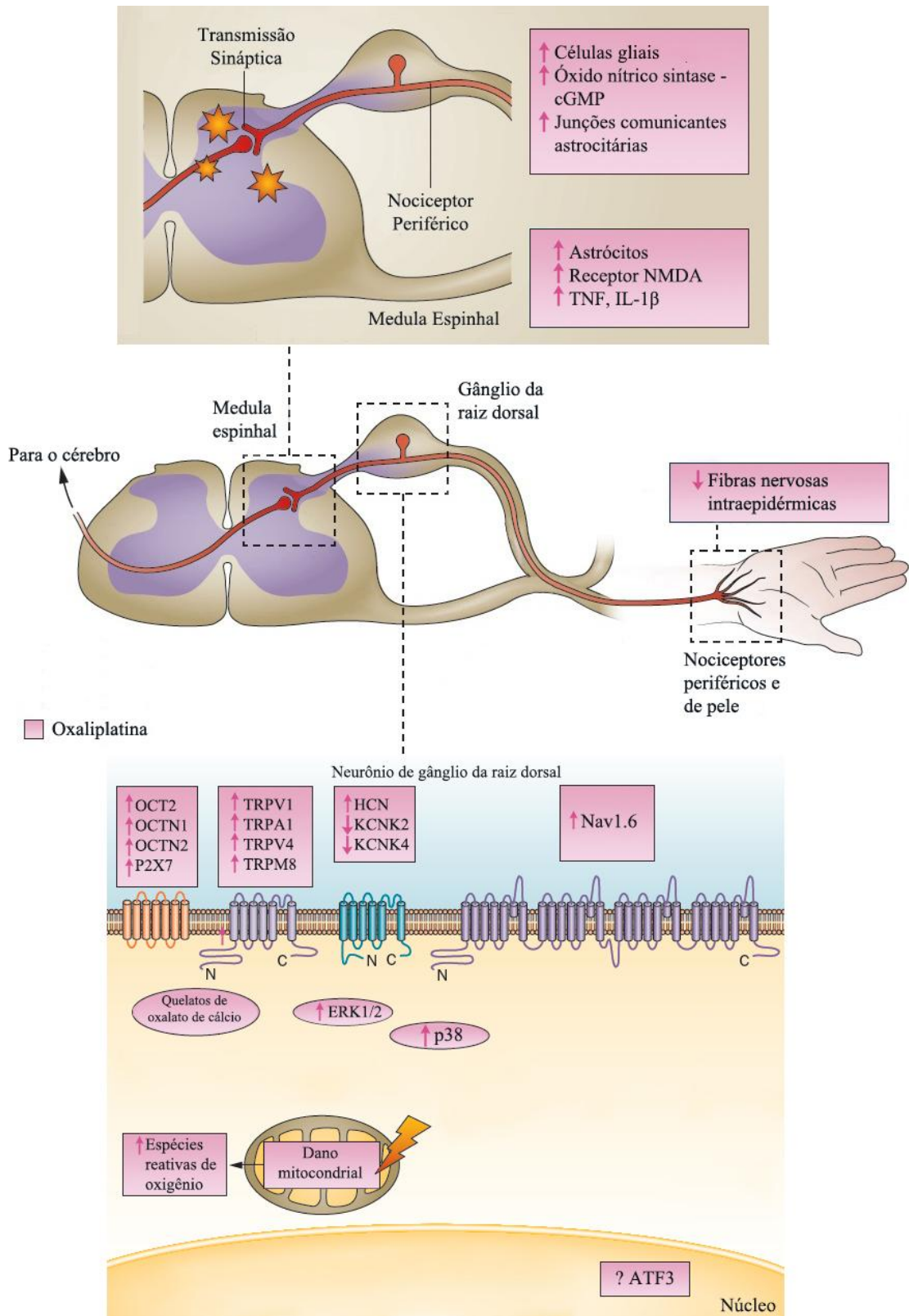
Além do mais, de acordo com Carozzi, Canta e Chiorazzi (2015), os canais de sódio desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da dor provocada pelo tratamento com OXL. Estudos previamente relatados mostraram que o tratamento de gânglios da raiz dorsal com OXL induziu um aumento na corrente de sódio, que foi antagonizado pelo bloqueador de canal de sódio carbamazepina (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

Tabela 5 – Possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da neurotoxicidade induzida pelo agente antineoplásico OXL

Alvo	Mecanismos
Canais de sódio	Aumento da corrente de sódio no gânglio da raiz dorsal, predispondo a parestesias e fasciculações.
Canais de potássio	Redução da expressão de canais inibitórios do tipo TREK1 e TRAAK e aumento da expressão de canais pró-excitatórios, HCNs.
TRPV	Regulação positiva de TRPV1, TRPA1, TRPM8 e TRPV4 em neurônios de gânglios da raiz dorsal, levando à hiper-responsividade dos nociceptores.
Estresse oxidativo	Espécies reativas de oxigênio em neurônios de gânglios da raiz dorsal. Geração de radicais livres é secundário para aumentar o cálcio citosólico e produzir citotoxicidade neuronal.
Caspases e calpaínas	Ativação das caspases e calpaínas, proteases ativadas por cálcio presentes nos neurônios de gânglios da raiz dorsal.
Proteína quinase ativada por mitógeno	Ativação da p38 e ERK1/2 nos neurônios de gânglios da raiz dorsal juntamente com a regulação negativa JNK/Sapk. Papel duplo de ERK1/2, dependendo do estímulo celular.
Receptores NMDA	Antagonistas dos receptores NMDA antagonizam agentes anticâncer que induzem dor neuropática.
Óxido nítrico	Disfunção da via do óxido nítrico. Aumento da óxido nítrico sintase (NOS), particularmente, óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no corno dorsal da medula espinhal.
Proteína quinase C	Aumento da atividade da proteína quinase C em regiões supraespinhais. Regulação positiva das isoformas gama/épsilon da proteína quinase C dentro do tálamo e área periaquedutal.

Fonte: adaptada de JAGGI; SINGH, 2012.

Figura 5 – Mecanismos envolvidos na dor neuropática periférica induzida por OXL



Fonte: adaptada de SISIGNANO *et al.*, 2014. ATF: Fator de transcrição de ativação; cGMP: Guanosina monofosfato cíclica; ERK: Sinal extracelular regulado por quinase; HCN: Canal ativado por hiperpolarização; IL: interleucina; KCNK: Canal de potássio, subfamília K; Nav: Canal de sódio dependente de voltagem; NMDA: N-metil-D-aspartato; OCT: Transportador de cátion orgânico; OCTN: Transportador de carnitina/cátion orgânico; P2X7: Receptor purinérgico P2X7; TRPA: Receptor potencial transitório Ankyrin; TRPM: Receptor potencial transitório melastatina; TRPV: Receptor potencial transitório vaniloide.

Pesquisadores sugerem que uma desregulação na homeostase do cálcio pode desempenhar um importante papel na patogênese da disfunção do nervo associada à OXL. Observou-se que a administração intravenosa de gluconato de cálcio e sulfato de magnésio uma hora antes ou depois de cada infusão de OXL foi prescrita para reduzir a neuropatia subsequente. Além disso, o tratamento com bloqueadores de canais de cálcio, que atuam limitando o influxo de cálcio através das membranas plasmáticas, tem sido clinicamente utilizado. Desse modo, essas informações são consideráveis, pois o cálcio é um mensageiro intracelular essencial para várias funções neuronais, como sobrevivência, morte, plasticidade neuronal e liberação de neurotransmissores (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

A formação de quelatos de oxalato de cálcio pode ocasionar distúrbios no potencial de membrana neuronal. Em camundongos, a injeção de oxalato provoca alodinia ao frio semelhante à causada por quimioterápicos, sendo esse efeito colateral atenuado por infusão de cálcio e magnésio, apoiando o envolvimento do oxalato na neuropatia periférica induzida por OXL (GAMELIN *et al.*, 2007; SAKURAI *et al.*, 2009).

Conforme Sisignano *et al.* (2014), vários receptores de potenciais transitórios têm sido relacionados à dor neuropática periférica induzida por OXL. Dessa forma, TRPA1 foi identificado como um mediador da alodinia mecânica e fria, enquanto que TRPV1, TRPM8 e TRPV4 são sensibilizados nos neurônios de gânglios da raiz dorsal, reduzindo o limiar de ativação dessas células. Em um estudo de Gauchan *et al.* (2009), foi demonstrado que bloqueando a função de TRPM8, através da administração de capsazepina, há uma inibição da alodinia ao frio provocada por OXL em camundongos.

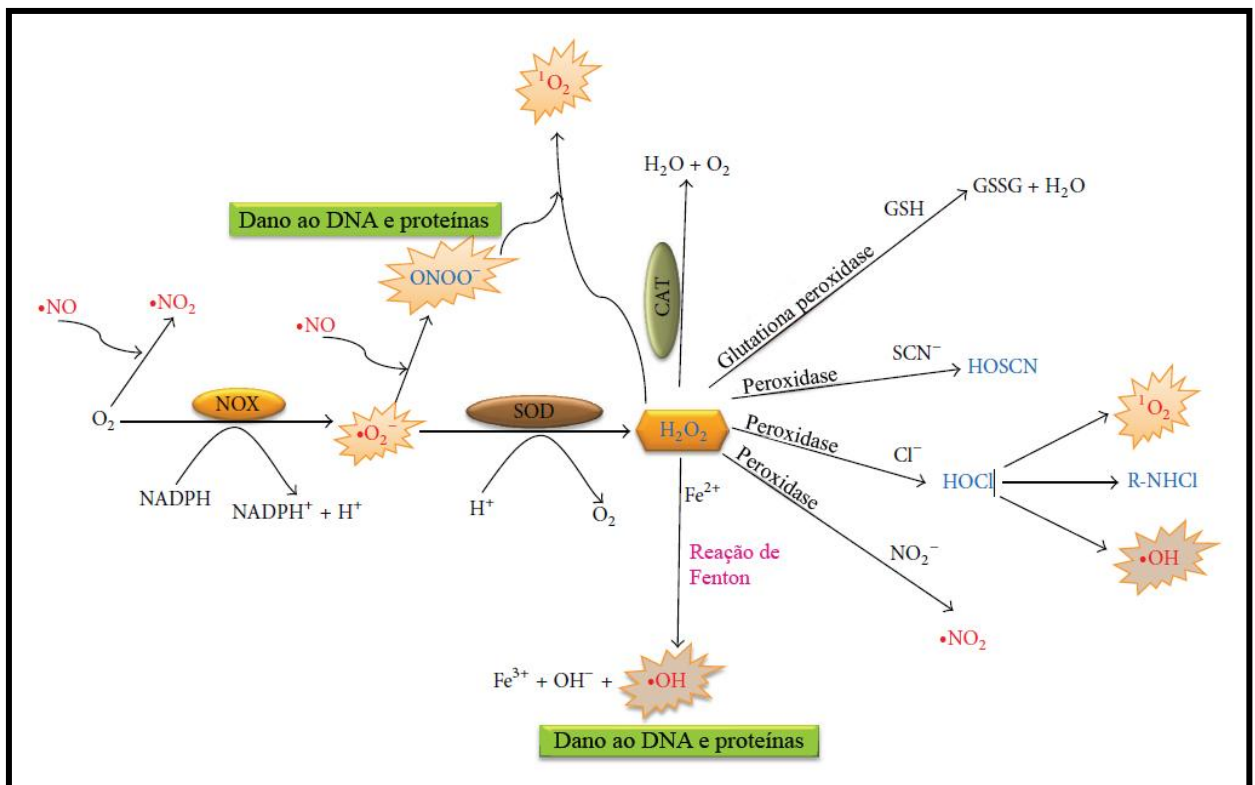
Chen *et al.* (2015) demonstraram, em um modelo de neuropatia induzida por OXL em ratos, que o bloqueio espinhal de PAR2 e TRPV1 atenuou as respostas de dor provocadas por estimulação mecânica e diminuiu a liberação da substância P e CGRP no corno dorsal da medula espinhal. Substância P e CGRP são neurotransmissores excitatórios e/ou neuromoduladores que são liberados no corno dorsal da medula espinhal por aferentes sensoriais primários, contribuindo para o desenvolvimento de alodinia e hiperalgesia, facilitando a liberação de glutamato e aspartato excitatórios de aferentes primários. O bloqueio de PAR2 também atenuou a elevada sensibilidade ao frio provocada por OXL. O TRPV1 desempenha um papel importante na regulação da hiperalgesia mecânica, porém não é fundamental na hipersensibilidade ao frio. Além disso, esse antineoplásico aumentou as expressões proteicas de PAR2 e TRPV1 na superfície do corno dorsal da medula espinhal.

De acordo com Joseph *et al.* (2008), a OXL atua sobre os nociceptores IB4 positivos para induzir uma neuropatia periférica dolorosa aguda dependente de estresse

oxidativo. Este ocorre quando a formação de radicais livres (conhecidos como espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio) excede a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo.

Em condições de estresse oxidativo, há o aumento da expressão de iNOS, enzima responsável pela síntese de óxido nítrico (NO), catalisando a oxidação da L-arginina para formar NO e L-citrulina. Além disso, o aumento da expressão da iNOS causa um aumento da produção de NO; que é uma espécie altamente reativa e gera compostos que causam danos ao DNA celular, como é o caso do radical peroxinitrito. O oxigênio molecular ( $O_2$ ) reage com o NO para produzir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é altamente reativo contendo nitrogênio e provocando um estresse nitrativo. A superóxido dismutase (SOD) converte o  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Na presença de ferro ( $Fe^{2+}$ ), ocorre a reação de Fenton, sendo formado um radical hidroxila altamente reativo ( $OH^-$ ) (JOSEPH *et al.*, 2008) (FIGURA 6).

Figura 6 – Produção de espécies reativas de oxigênio



Fonte: adaptada de JOSHI; PECK; KHAN, 2013. A figura representa a produção de espécies reativas de oxigênio. CAT: Catalase; GSH: Glutaciona reduzida; GSSG: Glutaciona dissulfeto; HOCl: Ácido hipocloroso; HOSCN: Ácido hipotiocianoso;  $H_2O_2$ : Peróxido de hidrogênio; NADPH: Fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida; NO: Óxido nítrico;  $NO_2$ : Dióxido de nitrogênio; NOX: Número de oxidação;  $O_2^-$ : Superóxido; OH: Radical hidroxila;  $ONOO^-$ : Peroxinitrito; SCN<sup>-</sup>: Tiocianato; SOD: Superóxido dismutase.

A expressão de iNOS é consequente de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual, sendo expressa após ativação celular e, conseqüentemente, produzindo NO durante períodos relativamente longos de tempo, como horas ou dias). Em um estudo de Azevedo *et al.* (2013), foi demonstrado que há um aumento da expressão de iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL.

Em um estudo de Zheng, Xiao e Bennett (2011), foi relatado que a OXL é capaz de produzir efeitos deletérios sobre as mitocôndrias axonais, levando a perturbações na cadeia transportadora de elétrons e à falha de energia celular em neurônios de gânglios da raiz dorsal. Esse dano mitocondrial pode ser o ponto de partida para o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, no mesmo estudo, o tratamento profilático com o composto antioxidante acetil-L-carnitina inibe o desenvolvimento da hiperalgesia provocada por OXL, evitando o dano da cadeia respiratória e, conseqüentemente, preservando a integridade mitocondrial.

Ta *et al.* (2006) constataram o envolvimento das caspases na neuropatia periférica induzida por OXL, usando um inibidor de caspases. Eles demonstraram um aumento de células positivas em ensaio TUNEL em gânglios da raiz dorsal de ratos, sugerindo uma apoptose mediada por caspases. Além do mais, em neurônios sensoriais “in vitro” de gânglios da raiz dorsal de rato, a exposição prolongada à OXL induz a ativação precoce de MAP quinase, p38 e ERK1/2 que mediam a morte celular por apoptose (SCUTERI *et al.*, 2010).

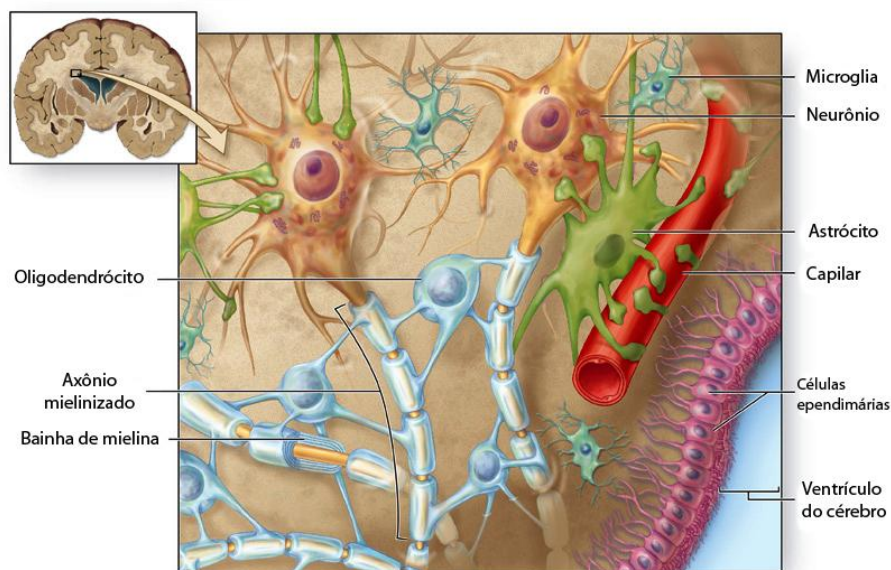
De acordo com Carozzi, Canta e Chiorazzi (2015), a capacidade de transportadores de cobre (CTRs) e transportadores de cátion orgânico (OCTs) para mediar a captação da OXL é de interesse neurológico, pois a expressão deles pode influenciar o influxo e efluxo desse antineoplásico nas células do gânglio da raiz dorsal. Em um estudo de Liu *et al.* (2009), a expressão de ATP7A, ATP7B e CTR1 foi investigada através de PCR em tempo real quantitativo, imunohistoquímica e análise por western blot em gânglio da raiz dorsal de ratos controle saudáveis e tratados com OXL. Verificou-se que ATP7A foi expresso no citoplasma de neurônios menores de GRD sem coloração de células satélites e fibras nervosas, enquanto CTR1 foi detectado a níveis elevados nas membranas plasmáticas e estruturas vesiculares citoplasmáticas de neurônios grandes de GRD sem co-localização com ATP7A. ATP7B não foi detectado. Os autores sugerem que os neurônios de GRD que expressam níveis altos de CTR1 são mais sensíveis à neurotoxicidade induzida pela OXL.

Em um estudo de Tsutsumi *et al.* (2014), foi demonstrado, através de análise de microarranjo de DNA, que a OXL reduz a expressão gênica de neuregulina 1 (NRG1), fator

de regulação da mielinização, no GRD de ratos submetidos à neuropatia provocada pela administração de OXL. Na mesma pesquisa, observou-se que a OXL diminuiu os níveis de proteína mielina zero no nervo ciático, indicando que esse antineoplásico induz hipomielinização. Os autores desse estudo relatam que o tratamento crônico com OXL pode causar retração de neurônios de GRD e axonopatia de fibras mielinizadas em modelos de camundongos.

Existem diversos estudos que mostram a importância das células da glia na neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL. As células da glia, no sistema nervoso central (SNC), compreendem os seguintes subtipos: macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) e microglia residente e perivascular (FIGURA 7). As células da glia, principalmente astrócitos e microglia, têm funções de promover a defesa do SNC contra agentes patógenos, remover neurônios mortos, formar a bainha de mielina, nutrir e dar sustentação aos neurônios, sendo fundamentais para que haja a transmissão sináptica entre os neurônios.

Figura 7 – Microglia, astrócitos e oligodendrócitos



Fonte: adaptada de FLOETER-WINTER *et al.* IV Curso de Inverno: **Tópicos em Fisiologia Comparativa**, Universidade de São Paulo (USP), 2007. A figura representa a morfologia, localização e interação entre os diferentes tipos de células da glia e os neurônios no sistema nervoso central.

Além disso, as células da glia apresentam as funções de guiar os neurônios na migração e os axônios no seu crescimento; diferenciação neural; manter a homeostase neuronal, através da regulação do pH extracelular; participar na formação da barreira hematoencefálica, intermediando o transporte de substâncias entre o sangue e os neurônios;



sintetizar e liberar compostos neurotróficos; formar tecido cicatricial em resposta à perda neuronal e participar de respostas imunes (LENZ, 1996).

No sistema nervoso periférico (SNP), existe um grande número de gânglios sensoriais e autonômicos, que contêm células gliais especializadas denominadas células satélites gliais. Estas células cercam os corpos celulares neuronais e os envolvem firmemente; aparecendo, em cortes de tecidos, como um anel em torno do neurônio (HANANI, 2010). Com a ativação das células satélites gliais, há o aumento da expressão de GFAP, da síntese de citocinas e do acoplamento das junções comunicantes entre essas células (WARWICK; HANANI, 2013).

Astrócitos e microglia são ativadas na dor neuropática, levando a respostas pró-inflamatórias com efeitos patológicos, como hiperexcitabilidade neuronal, neurotoxicidade e inflamação crônica (MILLIGAN; WATKINS, 2009; HALD, 2009). Além disso, a ativação tanto astrocitária quanto microglial leva à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ; prostaglandinas; óxido nítrico; ATP; d-serina e glutamato (NAKAGAWA; KANEKO, 2010).

De acordo com Ohara *et al.* (2010), há evidências crescentes de que as células da glia têm participação em condições patológicas, como a geração e a manutenção da dor. Estudos de eletrofisiologia demonstram que a ativação da microglia espinhal ocorre durante a fase inicial da dor neuropática e precede astrogliose. Desse modo, microglia são importantes para a iniciação da dor neuropática; astrócitos, para a manutenção dela (JI; SUTER, 2007).

As células gliais da coluna vertebral têm sido mostradas para contribuir com o desenvolvimento da dor crônica em várias condições, como cirurgia, inflamação e lesão do nervo. Há evidências de que os tratamentos farmacológicos, como minociclina e fluorocitrato, são capazes de evitar a ativação glial e reduzir a dor neuropática. Mesmo a OXL não tendo acesso ao SNC, por não atravessar a barreira hematoencefálica, tem sido descrito um dano oxidativo na medula espinhal de ratos tratados com OXL, coincidindo com ativação das células da glia e dor. Em condição de neuropatia, o aumento do número de células imuno-positivas para Iba-1 (marcador de microglia) e GFAP (marcador de astrócitos) é evidente no corno dorsal da medula espinhal, concomitantemente com uma diminuição do limiar de dor e com uma maior densidade de células gliais (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

Vários estudos demonstraram que não só a microglia, mas também os astrócitos estão envolvidos na neuropatia induzida por OXL. A expressão da proteína de junções de hiato, conexina 43 (Cx43), em astrócitos foi aumentada na medula espinhal de ratos tratados com OXL. A aplicação na medula espinhal de carbenoxolona com a finalidade de bloquear as

ligações de junções de hiato entre astrócitos foi capaz de prevenir a ativação astrocitária e a hipersensibilidade mecânica provocada pela OXL (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

Conforme Ji *et al.* (2013), a administração intraperitoneal ou intratecal de minociclina, um inibidor específico da microglia, pode aliviar a dor neuropática induzida pela ligadura do nervo espinhal, constrição do nervo ciático, secção do nervo espinhal e inflamação periférica. O pré-tratamento com minociclina preveniu a hiperalgesia mecânica e a perda de fibras nervosas intraepidermais induzidas pelo antineoplásico oxaliplatina em ratos (BOYETTE-DAVIS; DOUGHERTY, 2011). Em um estudo de Yoon *et al.* (2013), a administração intraperitoneal de oxaliplatina em ratos aumentou a expressão de GFAP no sétimo dia de tratamento. Além disso, um recente estudo de Warwick e Hanani (2013) demonstrou que houve um aumento da expressão de GFAP em gânglios da raiz dorsal de camundongos tratados com oxaliplatina e paclitaxel, nas doses de 4 mg/kg e 18 mg/kg, respectivamente.

Apesar de existirem diferentes estratégias para o tratamento da dor neuropática, os agentes farmacológicos utilizados não são totalmente eficazes na redução dos sintomas. Com o objetivo de diminuir a severidade dos sintomas neuropáticos em pacientes que estão recebendo tratamentos com antineoplásicos, são utilizados antidepressivos, anticonvulsivantes, opioides, lidocaína tópica (BARON; BINDER; WASNER, 2010), infusão de cálcio e magnésio, vitamina E, glutathione, glutamina e n-acetilcisteína (KALEY; DEANGELIS, 2009; PAICE, 2009). Para serem eficazes, esses agentes devem reduzir o efeito neurotóxico dos antineoplásicos e manter a atividade antitumoral deles.

#### 2.3.4.1 Marcadores teciduais de neurotoxicidade

Com a finalidade de investigar os mecanismos que podem estar envolvidos em neurotoxicidade, existem técnicas imunohistoquímicas com vários marcadores teciduais e colorações específicas, como ATF-3, c-Fos, ERK, NMDA, substância P, CGRP, TRPV1, Fluoro-Jade, entre outros (CHEN *et al.*, 2015; CHIDLOW *et al.*, 2009; LINO, 2011; TA *et al.*, 2006).

O fator de transcrição de ativação 3 (ATF-3) é um membro da família ATF/CREB (fatores de transcrição de ativação/proteína de ligação a elemento responsivo ao cAMP) de fatores de transcrição. O ATF-3 regula a transcrição por ligação a locais do DNA como um homodímero ou heterodímero com proteínas Jun. O ATF-3 é induzido por sinais de estresse

em uma variedade de tecidos, como no fígado, em condições de intoxicação e hepatectomia; coração, em isquemia e isquemia-reperfusão; rim, em isquemia-reperfusão; cérebro, sob convulsão após tratamento com pentilenotetrazole, desempenhando um importante papel na resposta ao estresse (TSUJINO *et al.*, 2000). O ATF-3 também é induzido por vários estímulos, como LPS, IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , radiações ionizante e ultravioleta, e sua função regula negativamente ou positivamente respostas ao estresse de um modo dependente do contexto (JUNG *et al.*, 2015).

Jung *et al.* (2015) indicam que o ATF-3 regula negativamente a expressão do gene iNOS e, conseqüentemente, a produção de NO, de modo que as interações entre o ATF-3 e NF- $\kappa$ B, componentes de sinalização, são essenciais para a transcrição do gene de iNOS. Além disso, em um trabalho de Jung *et al.* (2015), o ATF-3 induzido por IFN- $\gamma$  e LPS inibiu a atividade transcricional de NF- $\kappa$ B, interagindo com o N-terminal de p65 no complexo NF- $\kappa$ B, suprimindo a expressão de iNOS.

A indução de ATF-3 pode ser uma resposta celular comum a sinais de estresse, em que essa resposta não é específica de tecido nem de estresse específico. O ATF-3 não é expresso de forma constitutiva em gânglios da raiz dorsal e medula espinhal, sendo induzido em neurônios submetidos à axotomia. Além do mais, o ATF-3 é induzido em neurônios sensoriais e motores da medula espinhal após lesão do nervo, sendo considerado um marcador de injúria neuronal (TSUJINO *et al.*, 2000).

Fos é o produto proteico do gene precoce imediato c-Fos, que é encontrado em núcleos neuronais. Os níveis de Fos, na maioria dos neurônios, são baixos em condições basais, contudo mudanças em insumos aferentes e/ou alterações nos estímulos externos podem induzir a expressão de c-Fos, resultando em reprogramação fenotípica da célula. Dessa forma, c-Fos é um marcador útil para rastrear os efeitos de estímulos farmacológicos, elétricos e fisiológicos no sistema nervoso e tem sido utilizado para indicar dor e neuroplasticidade (AZEVEDO *et al.*, 2013).

Após a aplicação de estímulos dolorosos, c-Fos se expressa em várias estruturas do SNC envolvidas no processo nociceptivo, incluindo medula espinhal, substância periaquedutal mesencefálica, os núcleos parabraquiais e o tálamo. A estimulação elétrica supraespinhal ou a administração de morfina reduz a expressão das proteínas de c-Fos na medula espinhal. A expressão de c-Fos está relacionada à atividade neuronal e à intensidade da dor (TEIXEIRA, 2009).

## 2.4 Importância do metabólito oxalato na neurotoxicidade da oxaliplatina

Sabe-se que o metabolismo da OXL leva à produção de um metabólito tóxico, o oxalato, para diversos tecidos, inclusive o tecido nervoso. Alguns trabalhos vêm sugerindo que o efeito neurotóxico da OXL deve-se à produção desse metabólito. Sakurai *et al.* (2009) correlacionam o aumento de TRPA1 (proteína transdutora de estímulos frios) com os fenômenos de alodinia e alterações da sensibilidade ao frio com a produção de oxalato. Sabe-se também que o oxalato está relacionado à via da NADPH oxidase, uma das principais enzimas que catalisa a produção de superóxidos e de outras espécies reativas de oxigênio (JOSHI; PECK; KHAN, 2013).

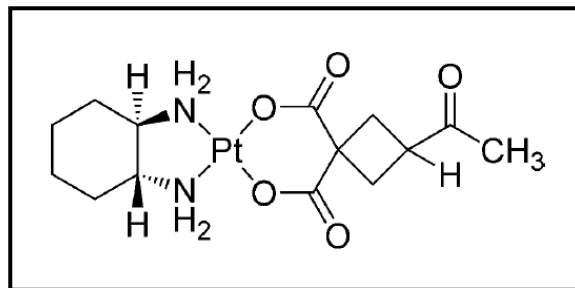
Avan *et al.* (2015) sugerem que a OXL pode alterar a cinética de canais de sódio dependentes de voltagem sensíveis ao cálcio, através de uma imobilização de íons de cálcio por resíduos de oxalato como um quelante de cálcio e provocar neurotoxicidade. O oxalato é conhecido como um quelante dos íons cálcio e magnésio. Assim, Liu *et al.* (2013) sugere que o oxalato, metabólito da OXL, é responsável pela neurotoxicidade ocasionada por este antineoplásico, através da depleção celular dos níveis de íons cálcio e magnésio, já que o oxalato é capaz de formar os sais insolúveis oxalato de cálcio e oxalato de magnésio. Além do mais, estudos clínicos mostram que a infusão de cálcio e magnésio diminui a neuropatia induzida pela OXL sem afetar seu efeito antineoplásico e um estudo de eletrofisiologia, utilizando um método “in vitro”, mostrou que o oxalato bloqueia os canais de sódio dependente de voltagem (UENO *et al.*, 2014).

Em um estudo de Kawashiri *et al.* (2012), foi demonstrado que a OXL e o oxalato induziram significativamente o aumento de TRPM8 no gânglio da raiz dorsal de ratos. Além disso, tanto o tratamento com OXL quanto com oxalato aumentou os níveis de mRNA TRPM8, interferiu no influxo de cálcio e induziu o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) em culturas de células de gânglio da raiz dorsal.

Em um estudo de Ueno *et al.* (2014), foram produzidas nanopartículas micelares poliméricas incorporadas com 1,2-diaminociclo-hexano (NC-4016), para aumentar os efeitos antitumorais da OXL e reduzir a neurotoxicidade, já que as micelas são isentas de oxalato. Os resultados mostraram que houve uma diminuição da alodinia ao frio nos ratos tratados com NC-4016. O comportamento de liberação lenta destes complexos micelares de 1,2-diaminociclo-hexano pode também contribuir para a redução da incidência da neuropatia aguda.

A importância do oxalato vem ganhando força na literatura de forma que, recentemente, foi publicado um artigo científico de Liu *et al.* (2013) anunciando a síntese de um análogo da OXL (Cis[PtII(1R,2R-DACH)(3-acetoxi-1,1-ciclobutanodicarboxilato)]) ou LLC-1402 livre de oxalato (FIGURA 8). Este composto sem a presença do grupamento oxalato é estável e solúvel em água, além de exibir uma alta atividade antitumoral e uma menor toxicidade que a OXL. O análogo foi produzido seguindo as reações químicas descritas por Liu *et al.* (2013), sendo totalmente caracterizado por análise elementar, espectrometria de massa por bombardeamento atômico rápido, infravermelho, ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios X, sendo sua fórmula molecular  $C_{14}H_{22}O_6N_2Pt$ .

Figura 8 – Composto análogo da oxaliplatina livre de oxalato



Fonte: Liu *et al.* (2013). A figura representa a estrutura química do composto análogo da oxaliplatina livre de oxalato.

A atividade antineoplásica do composto químico cis[PtII(1R,2R-DACH)(3-acetoxi-1,1-ciclobutanodicarboxilato) foi comparada “in vitro” com a da OXL em seis linhagens de células cancerosas humanas representando cinco entidades de tumor: carcinoma de pulmão de células não pequenas (A549 / ATCC), carcinoma gástrico (SGC-7901), carcinoma de ovário (OVCR / 8 SK-OV-3), carcinoma de cólon (HT-29) e carcinoma de mama (MCF-7 / ADR), mostrando uma alta atividade antitumoral e potencial para superar resistência cruzada em certos tumores. Além disso, a atividade antineoplásica do novo composto químico foi comparada com a da OXL também “in vivo” em um modelo experimental de sarcoma murino (S180), exibindo alta atividade antitumoral dependente da dose (LIU *et al.*, 2013). Diante deste composto químico promissor, vê-se a importância de avaliar a sua provável neurotoxicidade comparada à da OXL.

### 3 JUSTIFICATIVA

A OXL é um antineoplásico da terceira geração de agentes platinos, possuindo potente atividade citotóxica em linhas de células cancerosas humanas e sendo utilizada como primeira linha de tratamento do câncer colorretal metastático. Este tipo de câncer foi o terceiro mais comumente diagnosticado em homens; e, o segundo, em mulheres, no mundo, no ano de 2012 (TORRE *et al.*, 2015). No Brasil, no ano de 2014, a situação foi semelhante, já que o câncer colorretal foi o terceiro mais incidente em homens; e, o segundo, em mulheres (INCA, 2014). A introdução da OXL nos esquemas de quimioterapia para o tratamento do câncer colorretal é imprescindível, pois a OXL aumenta a expectativa de vida dos pacientes com essa condição em até aproximadamente 20 meses (VAN CUTSEM, VERSLYPE, DEMEDTS, 2002; GOLDBERG *et al.*, 2003; HURWITZ, 2003).

O uso da OXL no tratamento do câncer colorretal, entretanto, é prejudicado devido a um efeito colateral de difícil manejo: o neurotóxico, manifestado por uma neuropatia sensitiva periférica (NSP), que pode se apresentar de duas maneiras distintas uma forma aguda e uma crônica, limitando as doses e a duração do tratamento. A neuropatia periférica associada à quimioterapia possui um forte impacto econômico e social, já que pacientes nessa condição geram um custo elevado em relação aos pacientes que não desenvolvem esse efeito colateral. O mecanismo exato dessa toxicidade ainda não foi elucidado. Vários alvos moleculares foram propostos, mas nenhum capaz de causar impacto no tratamento. Na prática clínica, o que se tem observado é que os tratamentos utilizados na tentativa de combater a neuropatia causada por OXL, como antidepressivos, anticonvulsivantes, opioides, vitamina E, entre outros, têm tido pouco sucesso e que, muitas vezes, esse efeito persiste.

Diante disso, vê-se a importância de estudar os possíveis mecanismos e alterações que ocorrem na NSP provocada por OXL. Essa NSP é caracterizada por uma forma aguda e crônica, além de uma síndrome de dor, a qual não é ocasionada pelos outros compostos platinos. Sabe-se que, quando a OXL é injetada na corrente sanguínea, ocorre a liberação de oxalato, diferentemente da cisplatina e carboplatina que liberam outros tipos de ligantes. Assim, alguns trabalhos têm dado importância ao oxalato, sugerindo que o efeito neurotóxico da OXL deve-se à produção desse metabólito; de modo que estudos visam tratamentos da NSP causada por OXL através da anulação do efeito do oxalato por infusão de cálcio e magnésio para quelar esse metabólito, obtendo alguns resultados promissores. Dessa forma, é importante desvendar o papel do oxalato no desenvolvimento da NSP induzida por OXL, bem

como sua participação em outros possíveis efeitos colaterais, como alterações na contagem de leucócitos e nas funções hepática e renal.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Estudar o papel do oxalato na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos, comparando esse antineoplásico com seu análogo livre de oxalato (LLC-1402).

### **4.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a participação do oxalato na hiperalgesia mecânica e na alodínia térmica da neuropatia induzida por OXL em camundongos, comparando a OXL com seu análogo livre de oxalato (LLC-1402);
- Avaliar a influência do oxalato no dano neuronal, em medula espinhal e gânglio da raiz dorsal, da neuropatia induzida por OXL em camundongos, através da marcação de ATF-3;
- Avaliar a influência do oxalato na marcação de c-Fos em medula espinhal e gânglios da raiz dorsal na neuropatia induzida por OXL em camundongos;
- Avaliar a influência do oxalato na expressão de iNOS em medula espinhal e gânglios da raiz dorsal na neuropatia induzida por OXL em camundongos;
- Estudar a alteração em marcadores de função hepática (TGO e TGP) e renal (ureia e creatinina) em camundongos submetidos à neuropatia por oxaliplatina e participação do oxalato;
- Investigar a alteração na contagem total de leucócitos em camundongos submetidos à neuropatia por oxaliplatina e a participação do oxalato nesse efeito.



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, de massa corporal entre 25 a 30 gramas (g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno apropriadas, recebendo ração padrão e água à vontade, e mantidos em sala climatizada, sob temperatura média de 26°C, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com exaustão de gases e redução de ruídos.

### 5.2 Aspectos éticos

Os protocolos experimentais, desenvolvidos no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi enviado à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC e aprovado sob o número de protocolo 18/2013.

### 5.3 Protocolo experimental e desenho de estudo

Foi utilizado o modelo de neuropatia sensitiva periférica, induzida pelo agente antineoplásico OXL, desenvolvido no LAFICA por ocasião da publicação de Azevedo *et al.* (2013), que tomou por base os modelos desenvolvidos por Ling *et al.* (2007a).

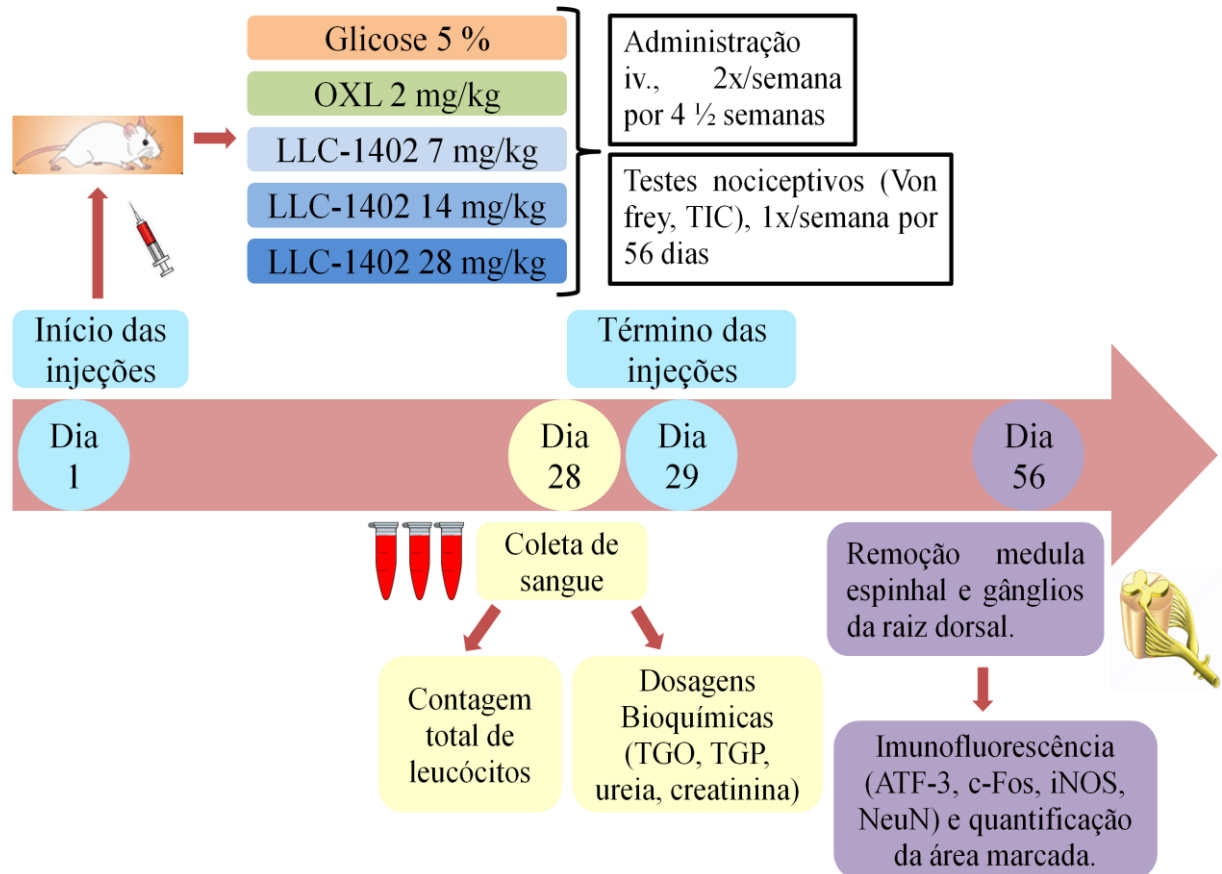
Os animais, primeiramente, foram divididos em 5 grupos de 6 animais:

- Glicose 5% (controle)
- OXL 2 mg/kg
- LLC-1402 7 mg/kg
- LLC-1402 14 mg/kg
- LLC-1402 28 mg/kg.

As administrações foram feitas via intravenosa, 2 vezes por semana, durante 4 ½ semanas. Foram feitos testes nociceptivos (Von Frey eletrônico e Teste de imersão da cauda a 10°C), uma vez por semana, durante 56 dias. No 28º dia, foi feita a coleta de sangue dos animais para contagem total de leucócitos e dosagens bioquímicas para avaliar as funções

hepática (TGO, TGP) e renal (ureia, creatinina). No 56º dia, os animais foram eutanasiados para remoção da medula espinhal lombar e gânglio da raiz dorsal. Com os tecidos coletados, foram feitas imunofluorescência para ATF-3, C-Fos, iNOS, NeuN e quantificação da área marcada (FIGURA 9.1).

Figura 9.1 – Desenho esquemático do protocolo experimental 1



Fonte: elaborado pelo autor.

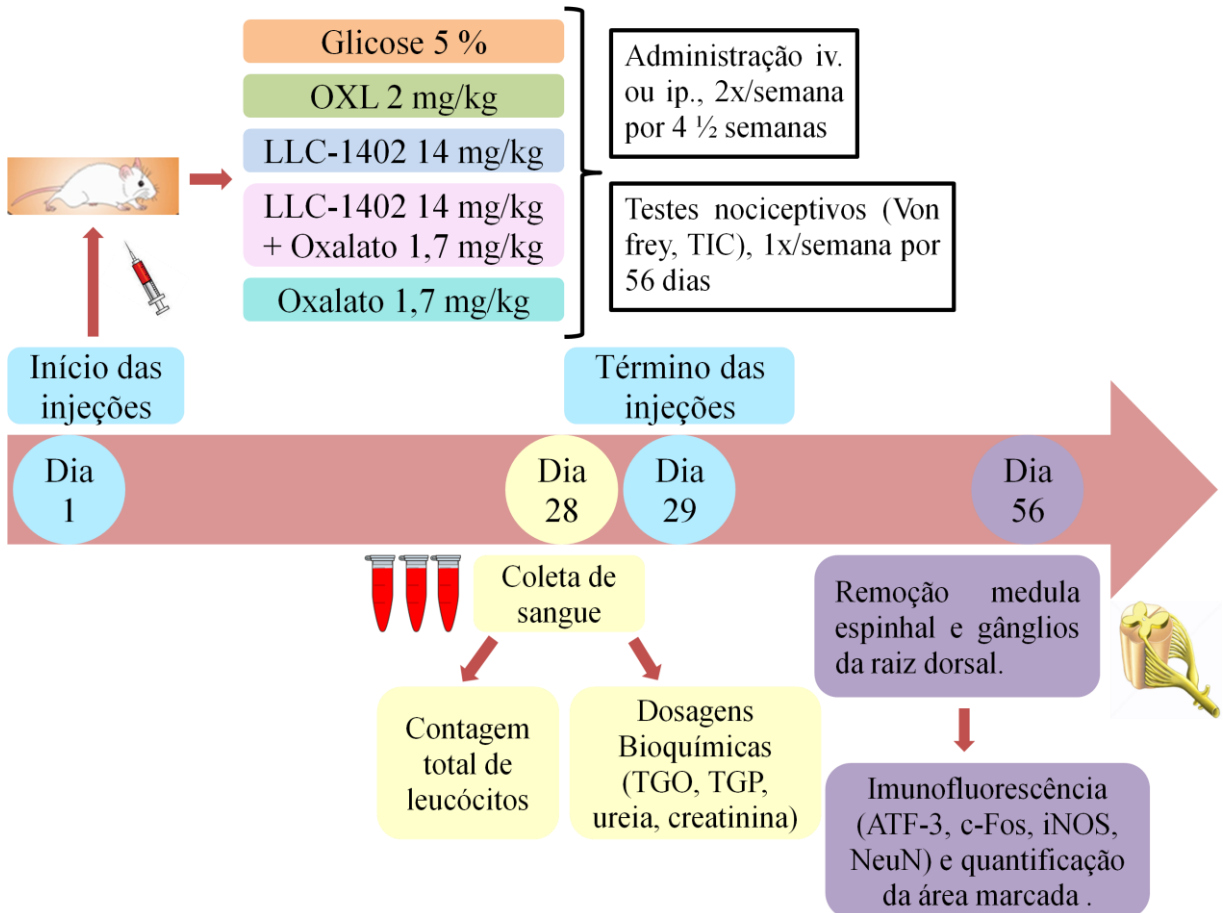
Após o experimento, com as doses 7, 14 e 28 mg/kg do análogo da OXL (LLC-1402), e as análises feitas, foi escolhida a dose de 14 mg/kg para a realização de um outro experimento.

Os animais foram divididos em 5 grupos de 6 animais:

- Glicose 5% (Controle)
- OXL 2 mg/kg
- LLC-1402 14 mg/kg
- LLC-1402 14 mg/kg + Oxalato 1,7 mg/kg
- Oxalato 1,7 mg/kg

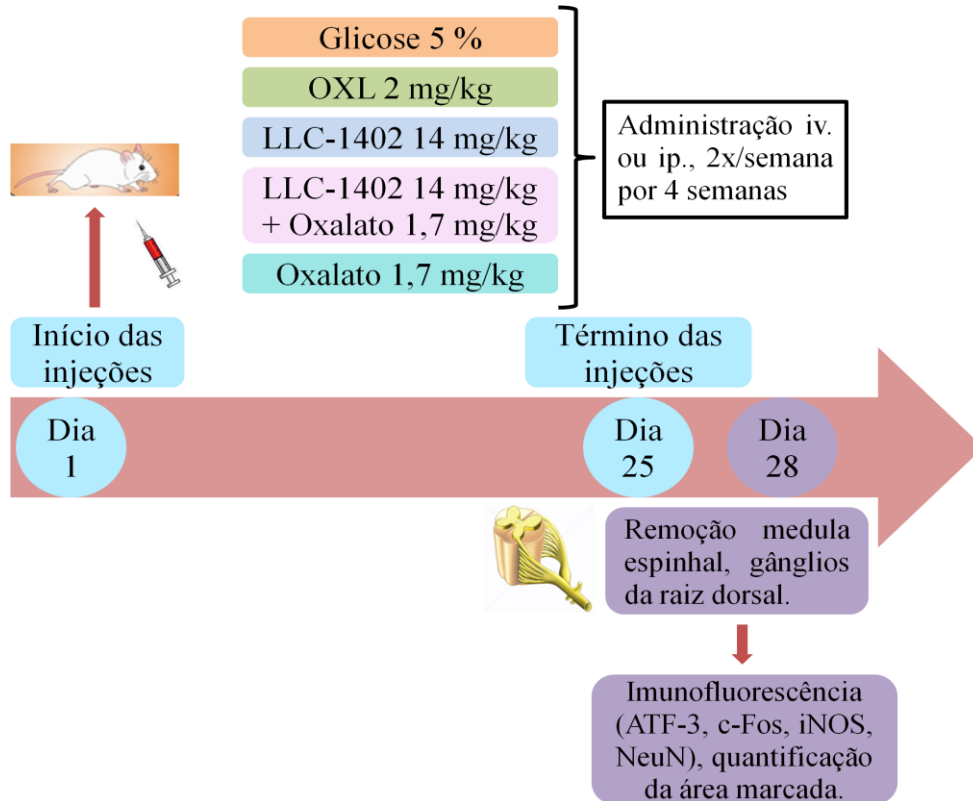
As administrações foram feitas via intravenosa, 2 vezes por semana, durante 4 ½ semanas, com exceção do oxalato, que a via de administração utilizada foi a intraperitoneal. Foram feitas as mesmas análises do experimento anterior: testes nociceptivos, contagem total de leucócitos, dosagens bioquímicas e imunofluorescência. Foram feitos dois experimentos, um com a eutanásia dos animais com 56 dias e outro com 28 dias (FIGURAS 9.2 e 9.3).

Figura 9.2 – Desenho esquemático do protocolo experimental 2



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 9.3 – Desenho esquemático do protocolo experimental 3



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 5.4 Indução da neuropatia sensitiva periférica por oxaliplatina

A OXL foi diluída em solução de glicose estéril 5% e administrada via intravenosa (0,10 mL para cada 10 g de massa corporal do animal), na dose de 2 mg/kg, na veia lateral da cauda do camundongo, utilizando uma agulha de calibre 0,45 x 13 mm em seringa de 1 ml. Os animais do grupo controle receberam somente a injeção de solução glicosada estéril 5%. As injeções foram administradas 2 vezes por semana, durante 4 ½ semanas, totalizando 9 injeções.

## 5.5 Preparação e injeção de LLC-1402 (análogo da OXL) e oxalato

O composto LLC-1402 foi disponibilizado por Liu e colaboradores (Instituto de Metais Preciosos de Kunming, Yunnan, China) e o oxalato foi adquirido da Sigma-Aldrick®. Tanto o análogo da OXL quanto o oxalato foram dissolvidos em solução de glicose estéril 5% e administrados, respectivamente, por vias intravenosa e intraperitoneal (0,10 mL para cada 10 g de massa corporal do animal), 2 vezes por semana, durante 4 ½ semanas, totalizando 9 injeções. As doses utilizadas para o LLC-1402 foram 7, 14 e 28 mg/kg, escolhidas com base no trabalho de Liu *et al.* (2013); e, para o oxalato, 1,7 mg/kg, baseada no trabalho de Zhao *et al.* (2012).

## 5.6 Testes nociceptivos

### 5.6.1 Hiperalgisia mecânica plantar

A intensidade de hiperalgisia foi avaliada pelo limiar de sensibilidade de cada animal a um estímulo mecânico produzido pela pressão gradual exercida por um filamento rígido acoplado a um aparelho que registra a pressão em gramas exercida na ponta desse filamento. Dez minutos antes de começar o teste, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico de dimensões 12 x 10 x 17 cm sob uma grade de arame. Um espelho inclinado é colocado abaixo da grade de arame para a visualização da região plantar das patas traseiras do animal, na qual é exercida a estimulação mecânica. O aparelho Von Frey eletrônico (Insight®) registra a pressão em gramas suficiente para provocar uma reação descrita como uma flexão da pata seguida por um “flinch” após a retirada da pata em contato com o aparelho (FIGURA 10). A hiperalgisia mecânica foi medida antes (tempo zero) e após o início das injeções, semanalmente. Foi avaliado o limiar mecânico de cada animal (CUNHA *et al.*, 2004).

Figura 10 – Hiperalgisia mecânica plantar – Von Frey eletrônico



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.6.2 – Alodínia térmica pelo frio

Baseado no modelo de Authier *et al.* (2009), foi realizado o teste de imersão da cauda (TIC) em água fria, usando a temperatura de 10°C. A cauda do animal foi imersa em água fria e mantida até que a extremidade da cauda fosse levantada pelo camundongo. A duração da imersão da cauda foi registrada em segundos. Os animais foram adaptados ao teste e ao manuseio pelo pesquisador durante uma semana antes do experimento.

### 5.7 Contagem total de leucócitos e dosagens bioquímicas

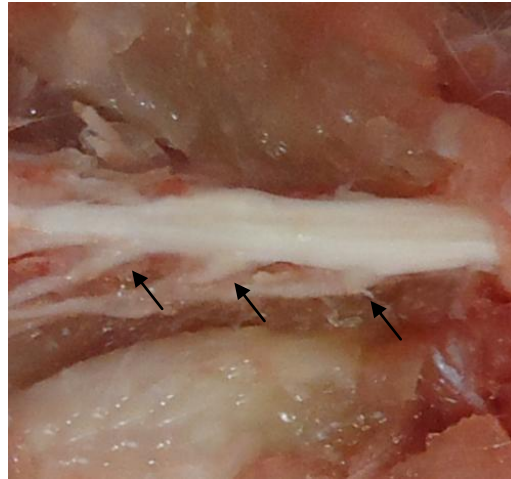
Com a finalidade de avaliar outros efeitos colaterais, no 28º dia do experimento, foi feita a coleta de sangue dos camundongos para a realização da contagem total de leucócitos e das dosagens bioquímicas. A contagem total de leucócitos foi feita através do aparelho de hemograma BC-5300Vet Mindray®. As dosagens bioquímicas realizadas foram TGO, TGP (para avaliar a função hepática), ureia e creatinina (para avaliar a função renal). As dosagens bioquímicas foram executadas seguindo os procedimentos descritos nos kits utilizados da Labtest® e a leitura dos resultados foi feita em espectrofotômetro.

### 5.8 Coleta da medula espinhal lombar e gânglio da raiz dorsal para imunofluorescência

Os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg); e, depois, foi realizada a perfusão intracardíaca com 40

mL de solução salina e 40 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4%. A medula espinhal lombar e o gânglio da raiz dorsal foram removidos (FIGURAS 11); e, em seguida, foi feita a crioproteção em sacarose 30% por 2 dias. Depois, os tecidos foram acondicionados com tissue-tek®, em freezer, à temperatura de - 80°C.

Figura 11 – Gânglio da raiz dorsal



Fonte: elaborado pelo autor. As setas apontam, da esquerda para direita, para gânglios da raiz dorsal dos segmentos L6, L5 e L4.

### **5.9 Imunofluorescência para ATF-3, c-Fos, iNOS e NeuN em medula espinhal lombar e gânglio da raiz dorsal**

Com os tecidos extraídos, foram feitos cortes com espessura de 10 µm (para gânglios) ou 20 µm (para medula) no criostato (Leica CM1850) (FIGURA 12), à temperatura de - 24°C. Os cortes foram fixados por 2 minutos em metanol e ficaram imersos em PBS até o momento de começar a imunofluorescência. Em seguida, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato 0,1M (pH 6,0), sob aquecimento em forno micro-ondas, por 15 minutos, à temperatura de 95°C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente, por 20 minutos, foi feita a permeabilização da membrana nuclear (para ATF-3 e c-Fos) com triton X-100 (0,1%) e foi feito o bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 5% acrescida de glicina 0,3M por 30 minutos para todas as lâminas. Os cortes foram lavados com PBS e incubados, durante a noite, à temperatura de 4°C, com o anticorpo primário feito em coelho anti-ATF-3 (Abcam®) ou anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology®) ou anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology®) na diluição 1:200 em BSA 5%. As lâminas foram lavadas e incubadas, durante 1 hora e 30 minutos, com o anticorpo secundário anti-igG de coelho Alexa flúor 568

(Invitrogen®) na diluição de 1:400 em BSA 5%. Para a marcação dos corpos neuronais, os cortes foram incubados, durante 1 hora e 30 minutos, com o anticorpo NeuN conjugado com Alexa Flúor 488 (Merck Millipore®) na diluição de 1:100 em BSA 5%. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, montadas com “Prolong Gold” (Invitrogen®) e fotografadas no microscópio confocal (LM 710, Zeiss).

A quantificação da área marcada nas fotos foi feita diferenciando as áreas marcadas (pixels) pela maior saturação de cor associada à marcação (vermelha ou verde). Para isso, foi utilizado o programa Fiji Image J. O procedimento foi baseado na saturação da cor associada à marcação positiva para um determinado marcador. Os limites necessários para definição de pixels marcados e não marcados foram definidos previamente. Para a quantificação da área marcada foram utilizadas quatro fotos (de animais diferentes) por grupo experimental. Os resultados dessa quantificação foram apresentados em porcentagem, a qual foi calculada a marcação positiva de um determinado marcador em relação à área total da foto, que foi considerada 100%. Os marcadores quantificados foram ATF-3, c-Fos e iNOS; o NeuN foi utilizado para marcar os corpos neuronais, de modo que a co-marcação (“merge”) foi utilizada para mostrar se os neurônios estariam expressando ATF-3 ou c-Fos ou iNOS.

Figura 12 – Criostato utilizado para os cortes dos tecidos



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, nos testes de comportamento, foi utilizado Two way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Para os outros resultados foi utilizada ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.0.



## **6 RESULTADOS**

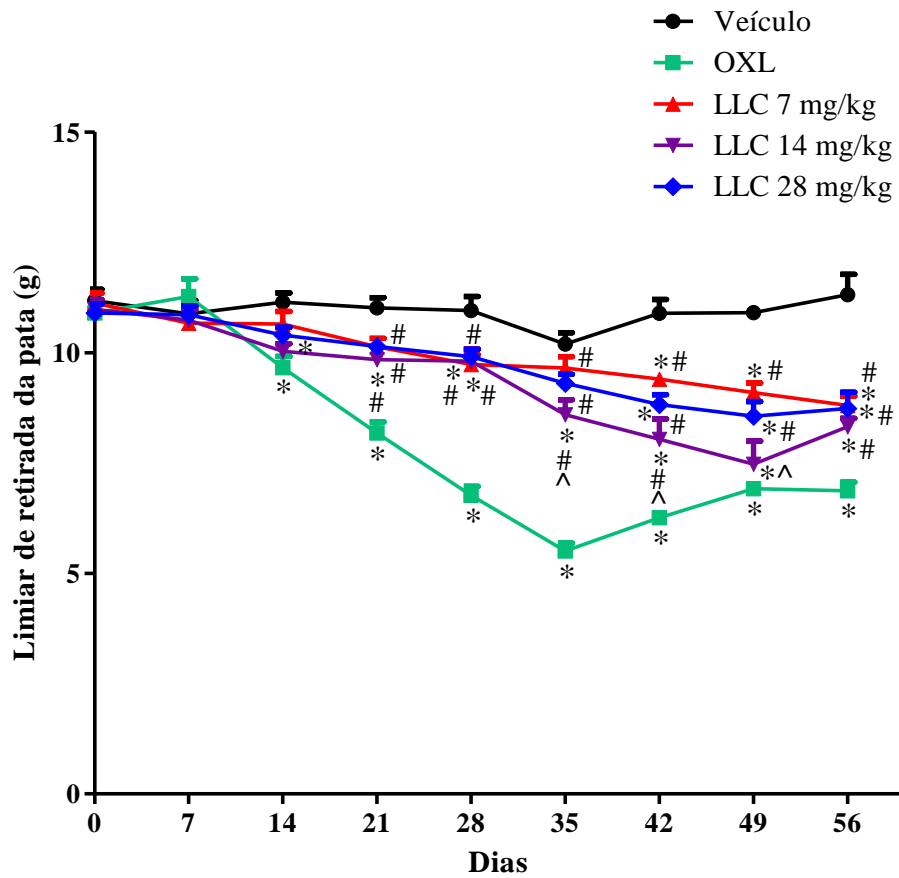
### **6.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar em camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402**

A hiperalgesia mecânica plantar foi avaliada, através do teste Von Frey eletrônico, semanalmente, num período de 56 dias, nas patas traseiras de camundongos injetados, via intravenosa, com a OXL (2 mg/kg) e seu análogo LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg). Tanto a OXL quanto o LLC-1402, na dose de 14 mg/kg diminuíram o limiar de retirada da pata significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir do 14º dia até o 56º dia. A dose de 7 mg/kg do LLC-1402 diminuiu o limiar de retirada da pata significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir do 21º dia até o 56º dia, com exceção para o 35º dia, já a dose de 28 mg/kg diminuiu o limiar de retirada da pata significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir do 42º dia até o 56º dia. A comparação dos grupos OXL e LLC-1402 foi feita com o grupo controle, o qual foi injetado glicose 5%. Além disso, houve um aumento significativo do limiar de retirada da pata nos grupos tratados com LLC-1402 em comparação com o grupo tratado com OXL. Nos 35º, 42º e 49º dias, houve uma diminuição significativa do limiar de retirada da pata no grupo tratado com LLC-1402 (14mg/kg) em relação à dose de 7 mg/kg e, no 49º, em relação à dose de 28 mg/kg (GRÁFICO 1).

### **6.2 Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402**

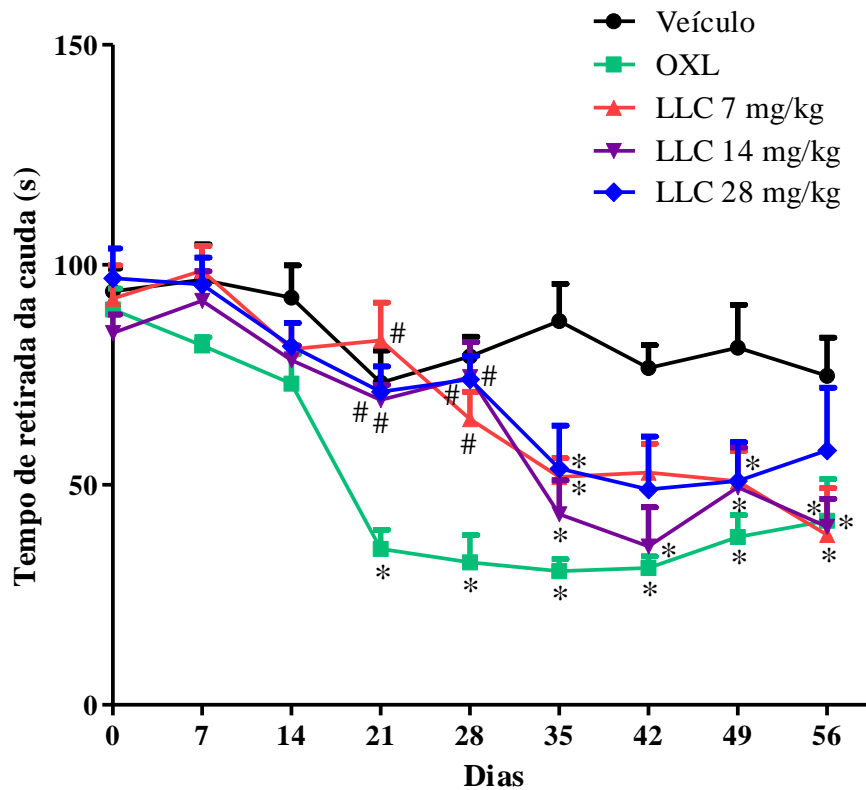
A alodínia térmica pelo frio foi avaliada, através do teste de imersão da cauda (TIC) em temperatura de 10°C, semanalmente, num período de 56 dias, em camundongos submetidos à injeção intravenosa de OXL (2 mg/kg) e seu análogo LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg). No grupo o qual foi administrado OXL, comparado ao grupo controle (glicose), houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no tempo em segundos de retirada da cauda a partir do 21º dia até o 56º dia. As três doses do LLC-1402 foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) o tempo em segundos de retirada da cauda; a dose de 7 mg/kg, nos 35º e 56º dias, a de 14 mg/kg, a partir do 35º até o 56º dias e a de 28 mg/kg, nos 35º e 49º dias, comparado ao grupo controle (glicose). Além do mais, houve uma diferença significativa no tempo de retirada da cauda entre os grupos tratados com LLC-1402 e o grupo tratado com OXL nos 21º e 28º dias (GRÁFICO 2).

Gráfico 1 – Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à injeção de OXL e LLC-1402



O gráfico representa o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica plantar em camundongos que foram submetidos à administração intravenosa de OXL (2mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL; ^ $p < 0,05$  versus LLC (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

Gráfico 2 – Avaliação da alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à injeção de OXL e LLC-1402



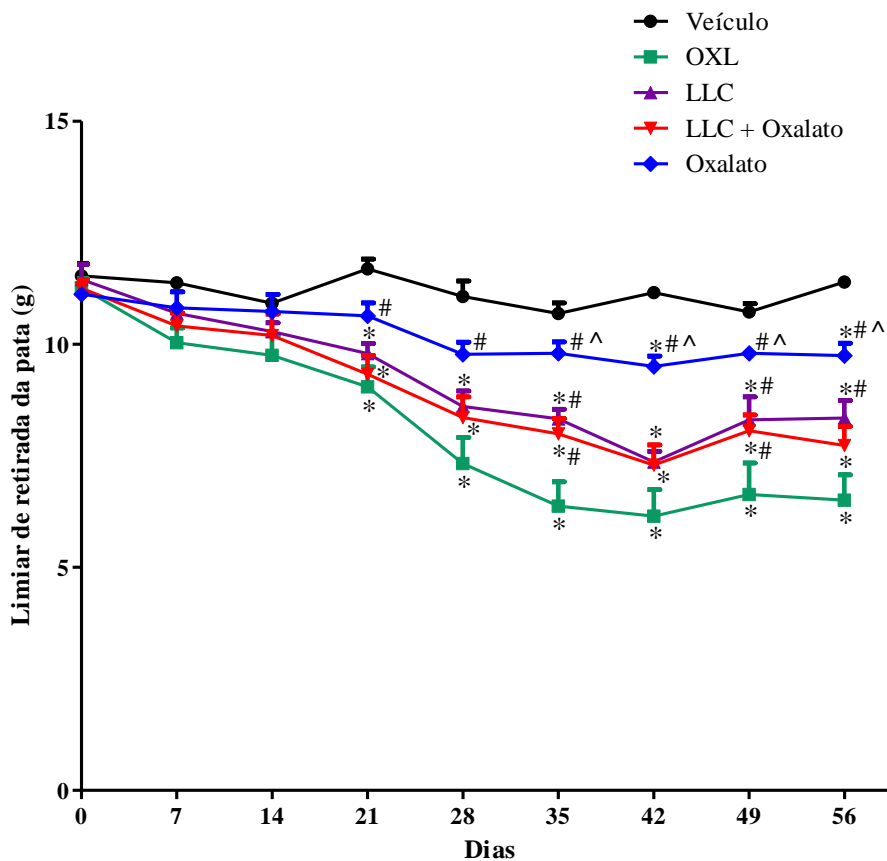
O gráfico representa o desenvolvimento de alodínia térmica pelo frio em camundongos que foram submetidos à administração intravenosa de OXL (2mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

### 6.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar em camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato

A hiperalgesia mecânica plantar foi avaliada, através do teste Von Frey eletrônico, semanalmente, num período de 56 dias, nas patas traseiras de camundongos injetados, via intravenosa, com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg), e via intraperitoneal, com oxalato (1,7 mg/kg). A OXL diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) o limiar de retirada da pata a partir do 21º dia até o 56º dia, comparado ao grupo controle (glicose). Tanto no grupo o qual foi injetado LLC-1402 quanto no que foi administrado LLC-1402 juntamente com o oxalato houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no limiar de retirada da pata no 21º dia até o 56º dia. Já no grupo o qual foi administrado somente o oxalato, houve um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) no limiar de retirada da pata nos 42º e 56º dias. Houve diferença estatística entre os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente

oxalato e a OXL. Além disso, houve uma diferença significativa estatisticamente entre o grupo tratado com LLC-1402 e com oxalato administrado sozinho (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 – Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à injeção de OXL, LLC-1402 e oxalato



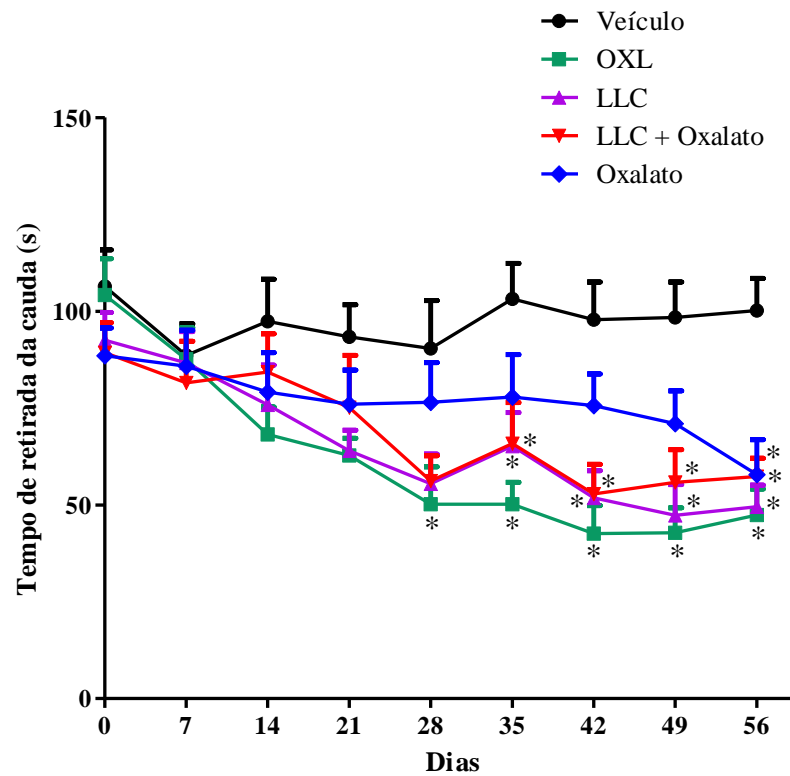
O gráfico representa o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica plantar em camundongos que foram submetidos à administração intravenosa de OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com a injeção intraperitoneal de oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402 e oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL; ^ $p < 0,05$  versus LLC (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

#### 6.4 Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato

A alodínia térmica pelo frio foi avaliada, através do teste de imersão da cauda (TIC) em temperatura de 10°C, semanalmente, num período de 56 dias, em camundongos submetidos à injeção intravenosa de OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) e, intraperitoneal, de oxalato (1,7 mg/kg). A OXL reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o tempo

de retirada da cauda em segundos a partir do 28º dia até o 56º dia, comparado ao grupo controle (glicose). No grupo que recebeu a injeção somente de LLC-1402 (14 mg/kg), houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do tempo de retirada da cauda no 35º dia até o 56º dia. No grupo que recebeu LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com o oxalato (1,7 mg/kg), essa redução começou no 35º dia e se estendeu até o 56º dia. No grupo tratado somente com o oxalato (1,7 mg/kg), houve um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) do tempo de retirada da cauda no 56º dia (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 – Avaliação da alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à injeção de OXL, LLC-1402 e oxalato



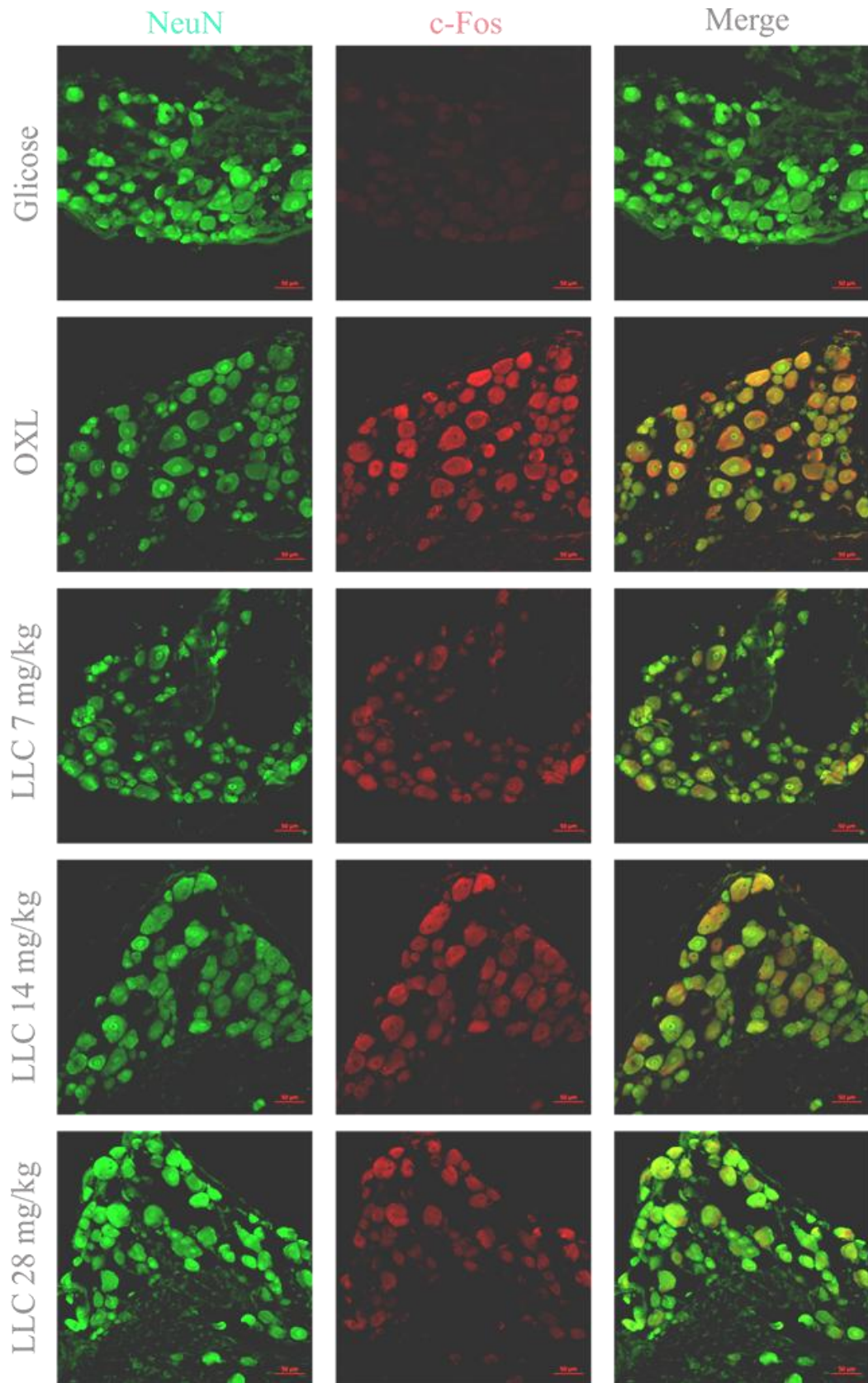
O gráfico representa o desenvolvimento de alodínia térmica pelo frio em camundongos que foram submetidos à administração intravenosa de OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com a injeção intraperitoneal de oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402 e oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

### **6.5 Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402**

Na imunofluorescência para c-Fos, no experimento de 56 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um aumento da imunoexpressão tanto no grupo tratado com OXL (2 mg/kg) quanto no grupo tratado com LLC-1402, nas doses de 7, 14 e 28 mg/kg, comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5%. Em comparação com o grupo tratado com a OXL, houve uma diminuição da imunoexpressão de c-Fos nos grupos tratados com LLC-1402 nas doses de 7 e 28 mg/kg (FIGURA 13).

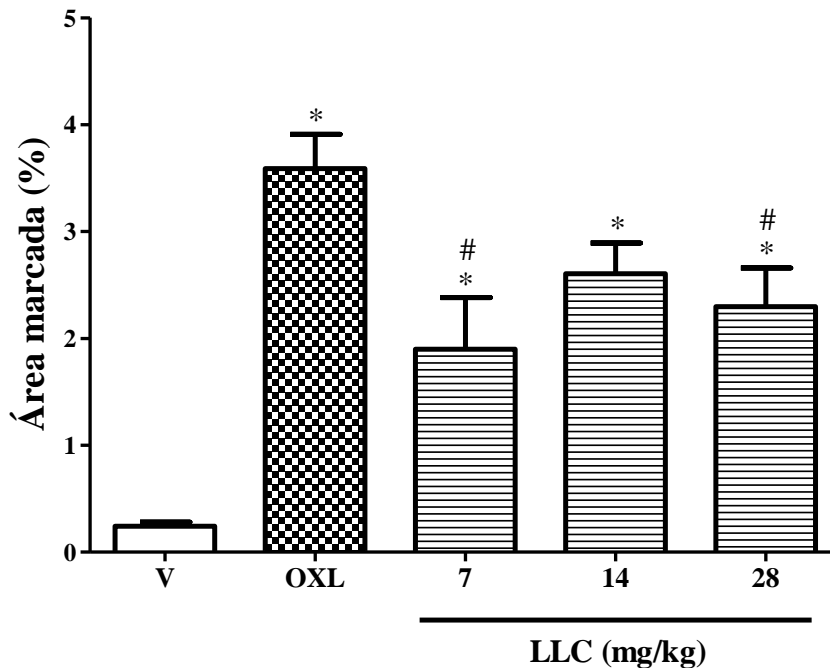
Na análise quantitativa da imunoexpressão para c-Fos, a quantificação da área marcada, comparando com o grupo controle, aumentou significativamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg). Houve uma diferença significativa entre os grupos tratados com LLC-1402 (7 e 28 mg/kg) e OXL (GRÁFICO 5).

Figura 13 – Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 5 – Análise quantitativa da imunoexpressão para c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoexpressão de c-Fos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402 também são comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

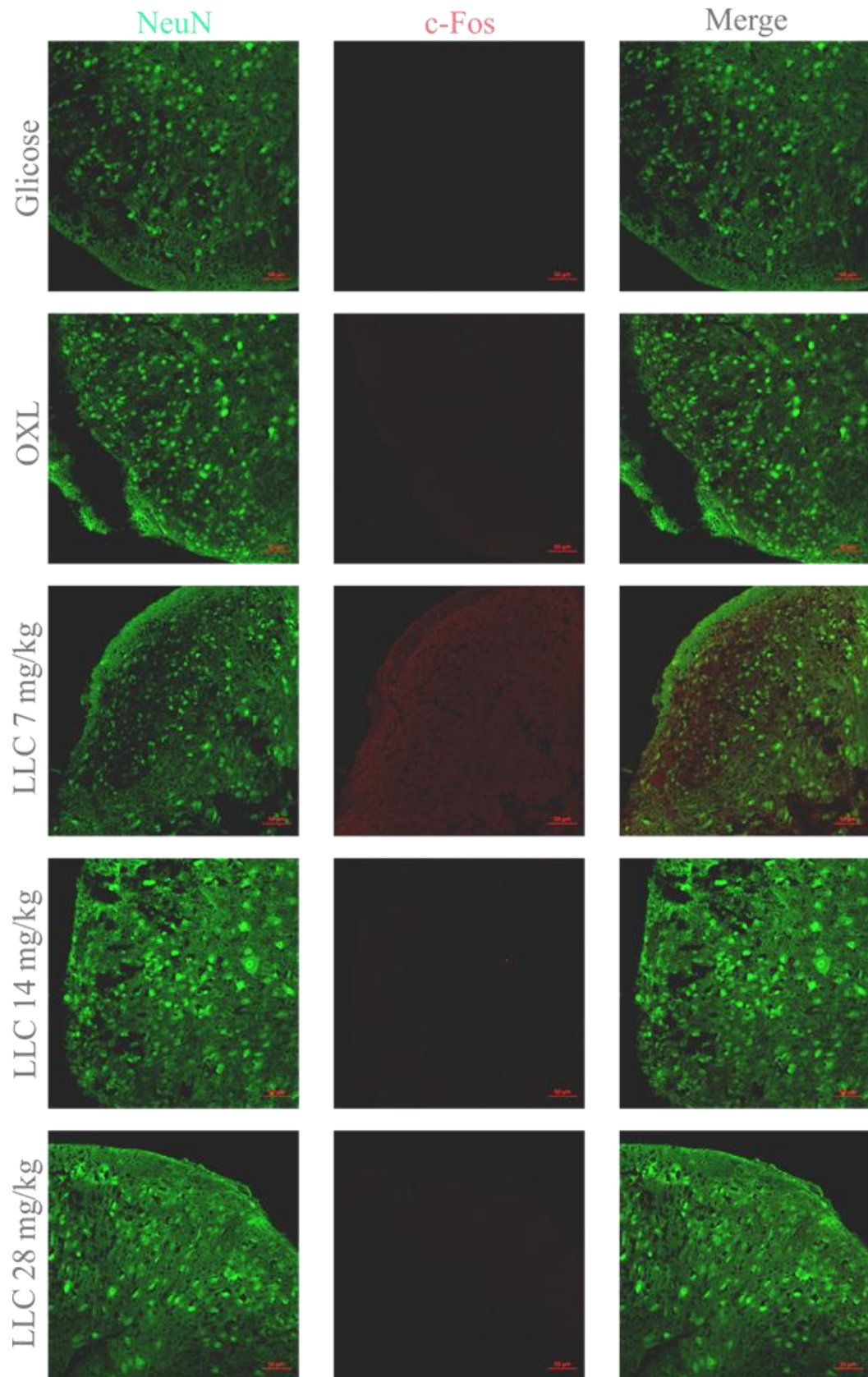
### 6.6 Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402

Na imunofluorescência para c-Fos, no experimento de 56 dias, no corno dorsal da medula espinhal, não foi observado um aumento da imunoexpressão nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402, nas doses de 14 e 28 mg/kg, já na dose de 7 mg/kg houve um leve aumento da imunoexpressão, não sendo considerado significativo estatisticamente quando comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 14).

Na análise quantitativa da imunoexpressão no corno dorsal da medula espinhal, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402, nas doses 7, 14 e 28 mg/kg, comparando com o grupo controle (GRÁFICO 6).

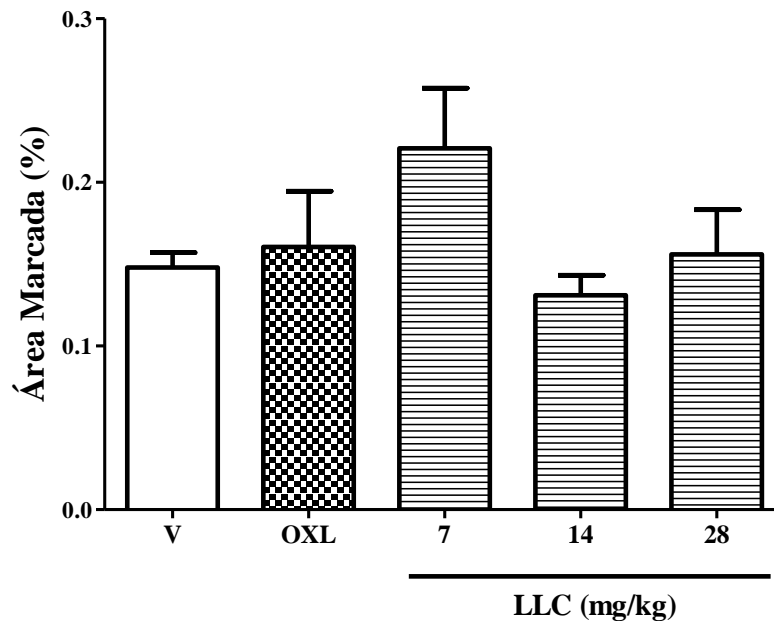


Figura 14 – Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 6 – Análise quantitativa da imunoexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



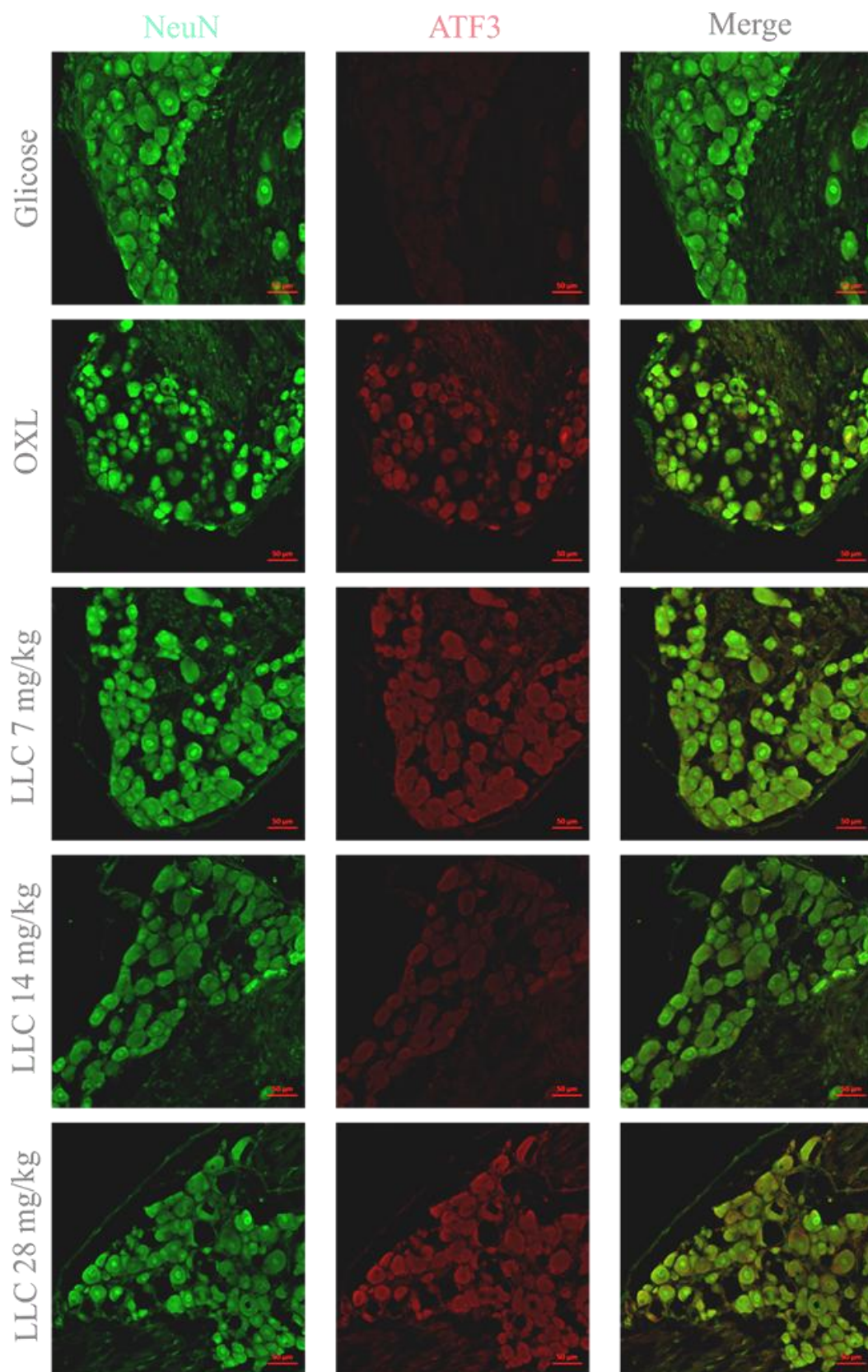
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoexpressão de c-Fos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402 também são comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.7 Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402

Na imunofluorescência para ATF-3, no experimento de 56 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um aumento da imunoexpressão tanto no grupo tratado com OXL (2 mg/kg) quanto no grupo tratado com LLC-1402, nas doses de 7, 14 e 28 mg/kg, comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 15).

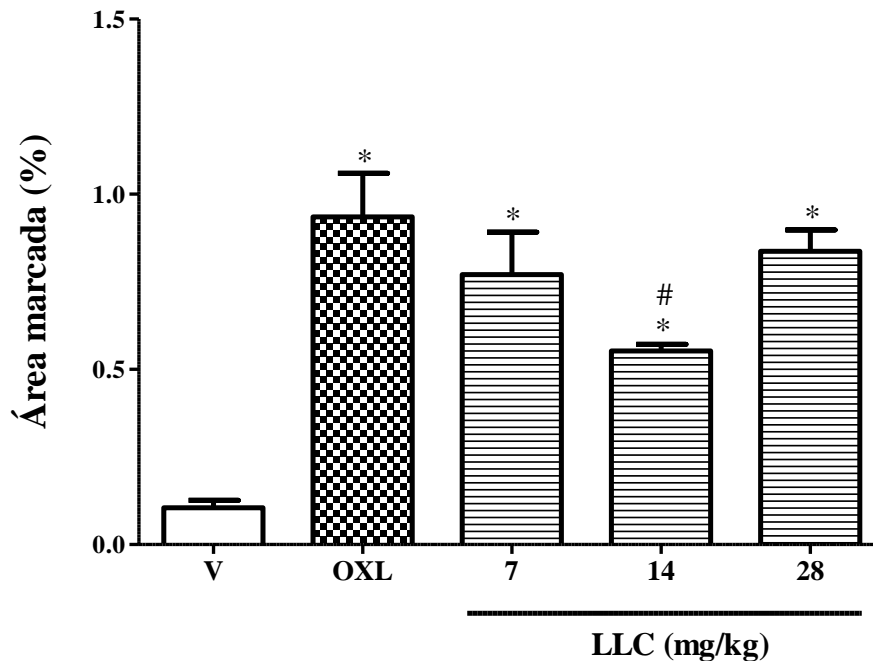
Na análise quantitativa da imunoexpressão para ATF-3, a quantificação da área marcada, comparando com o grupo controle, aumentou significativamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg). No grupo tratado com LLC-1402, na dose de 14 mg/kg, houve uma diminuição significativa da imunoexpressão em comparação com o grupo tratado com a OXL (GRÁFICO 7).

Figura 15 – Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 7 – Análise quantitativa da imunopressão para ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



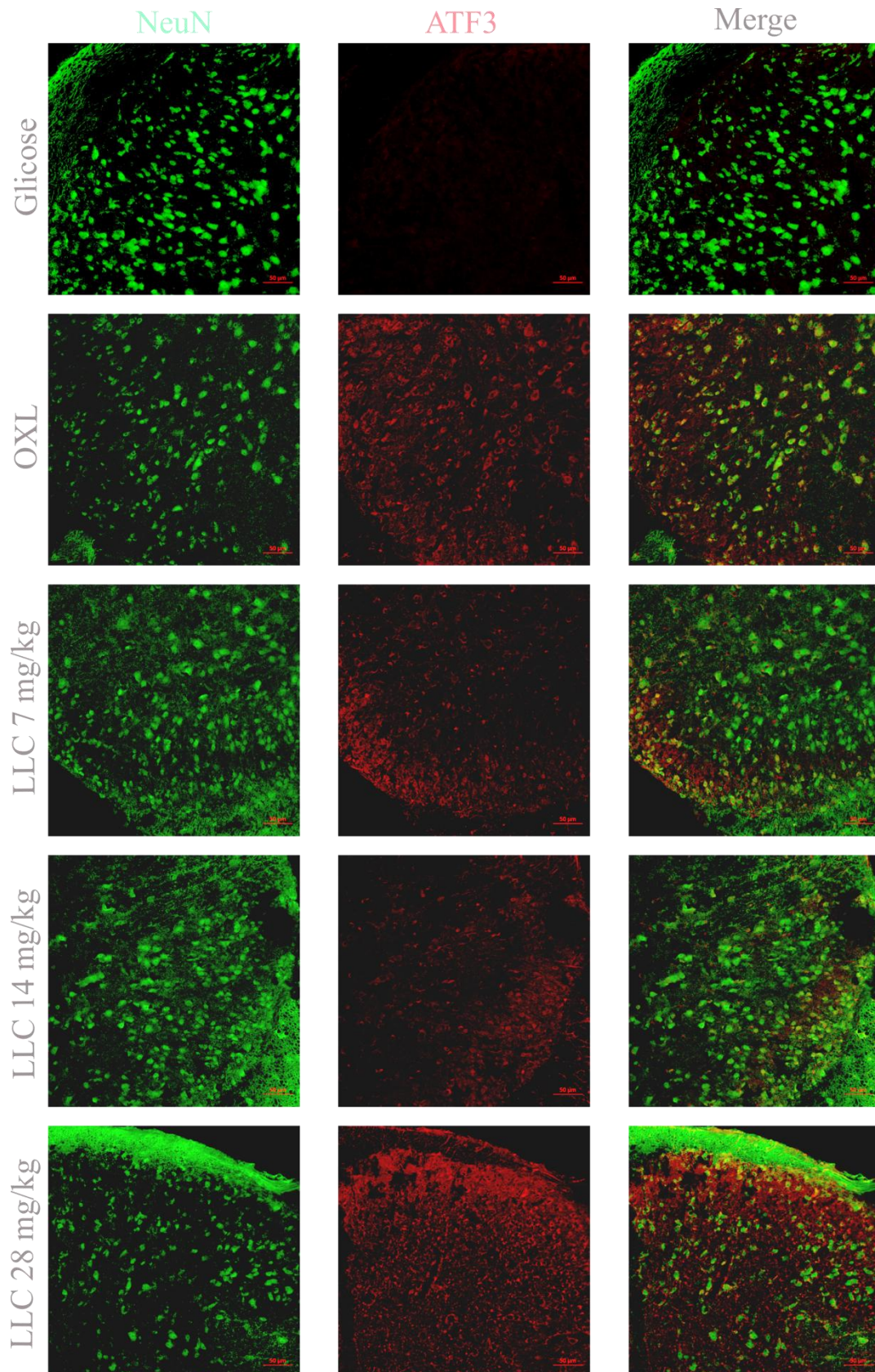
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de ATF-3. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402 também são comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.8 Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402

Na imunofluorescência para ATF-3, no experimento de 56 dias, no corno dorsal da medula espinhal, foi observado um aumento da imunopressão tanto no grupo tratado com OXL (2 mg/kg) quanto no grupo tratado com LLC-1402, nas doses de 7, 14 e 28 mg/kg, comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 16).

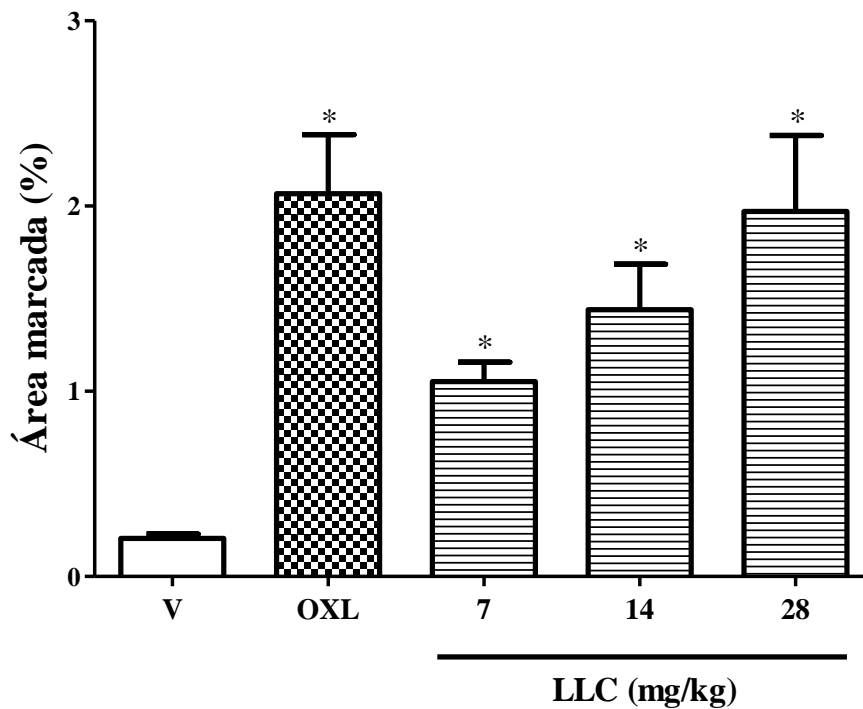
Na análise quantitativa da imunopressão para ATF-3, a quantificação da área marcada, comparando com o grupo controle, aumentou significativamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg) (GRÁFICO 8).

Figura 16 – Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 8 – Análise quantitativa da imunoexpressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



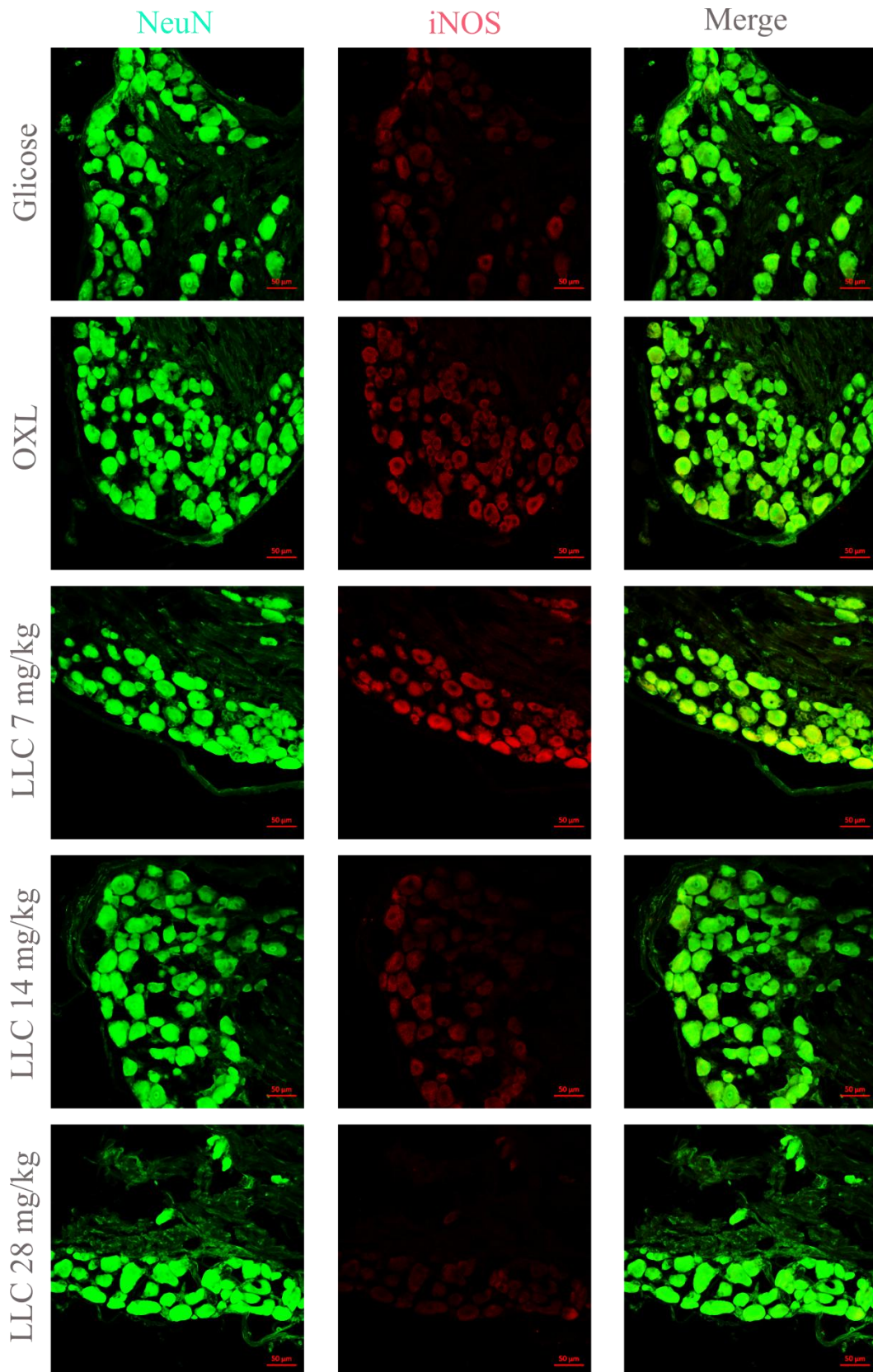
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoexpressão de ATF-3. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402 também são comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.9 Imunofluorescência para iNOS em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402

Na imunofluorescência para iNOS, no experimento de 56 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um leve aumento da imunoexpressão nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7 e 14 mg/kg), não sendo considerado significativo estatisticamente quando comparado comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 17).

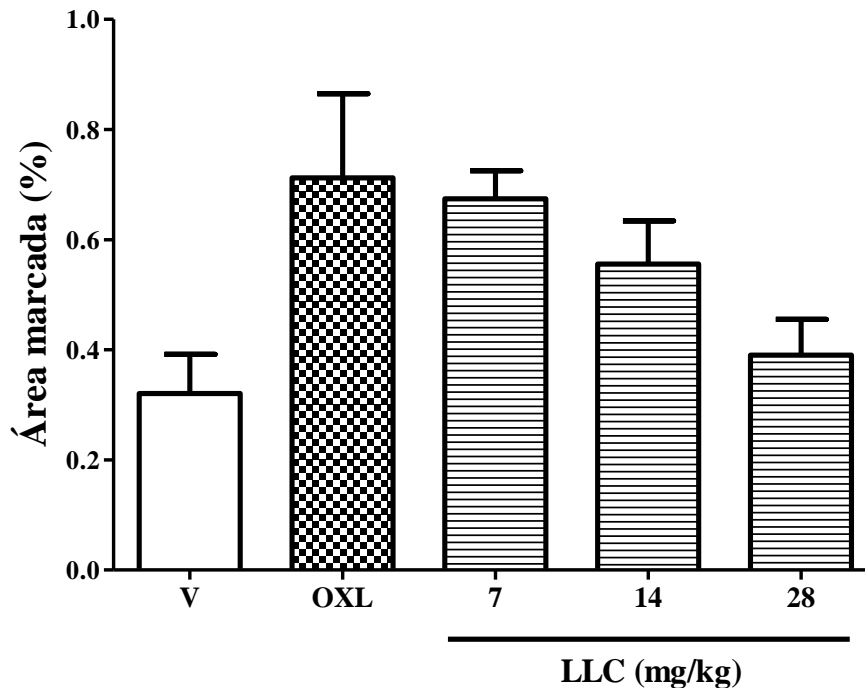
Na análise quantitativa da imunoexpressão para iNOS, no gânglio da raiz dorsal, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 9).

Figura 17 – Fotomicrografia da imunoposição de iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: iNOS; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 9 – Análise quantitativa da imunopressão para iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de iNOS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402 também são comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

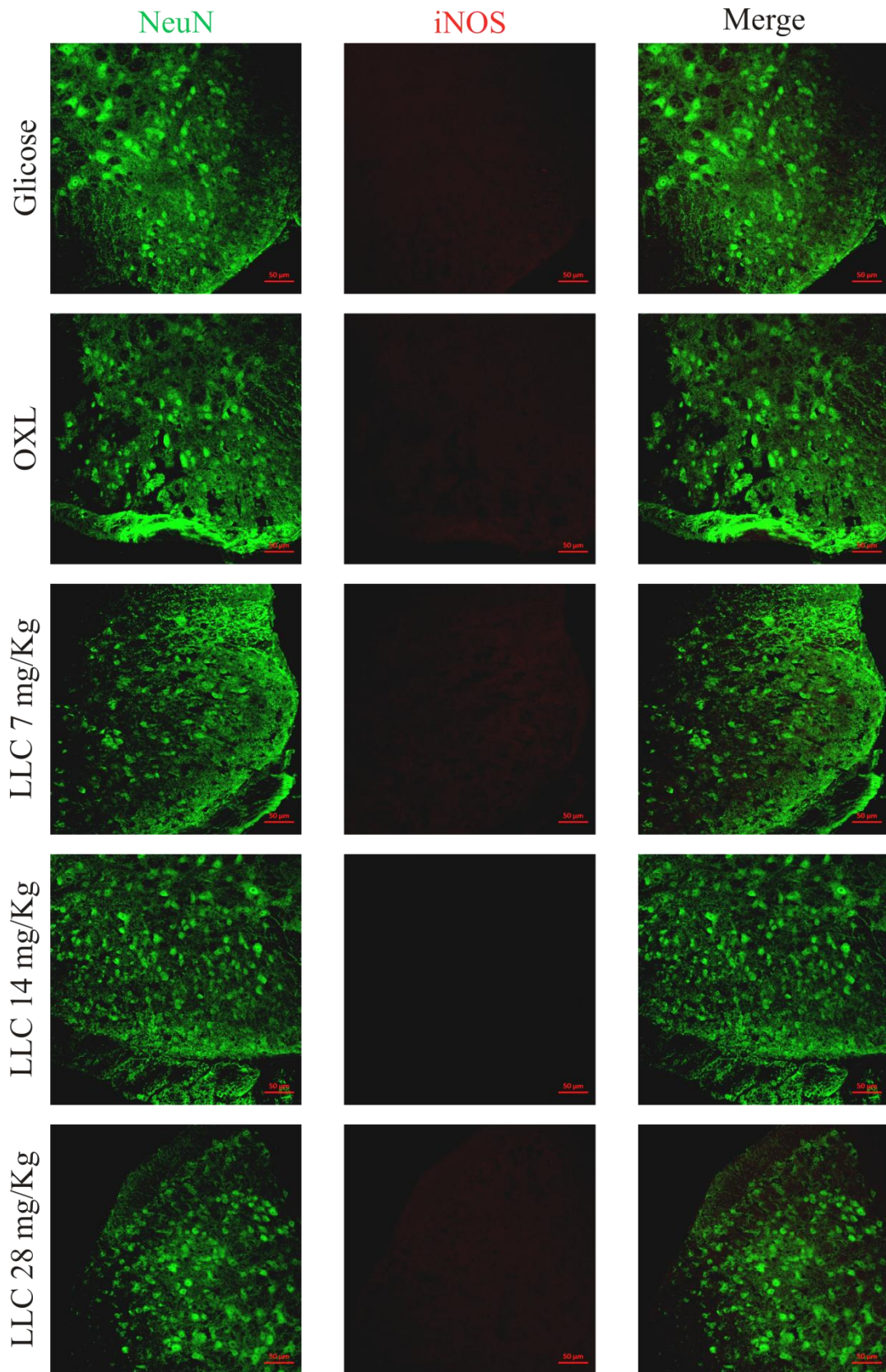
### 6.10 Imunofluorescência para iNOS em corno dorsal da medula espinal de camundongos submetidos às injeções de OXL e LLC-1402

Na imunofluorescência para iNOS, no experimento de 56 dias, no corno dorsal da medula espinal, não foi observado aumento da imunopressão nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 18).

Na análise quantitativa da imunopressão para iNOS, no corno dorsal da medula espinal, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 10).

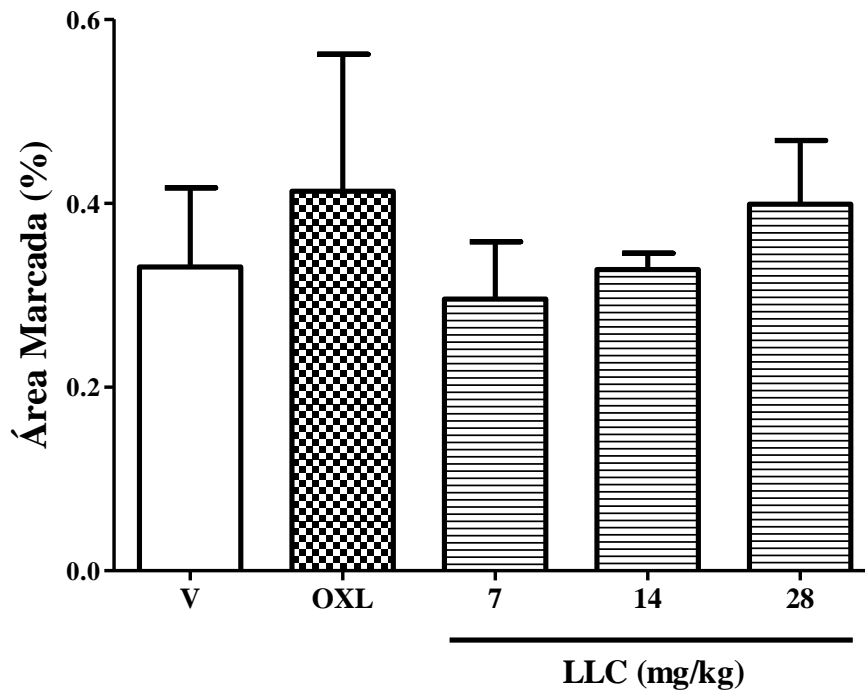


Figura 18 – Fotomicrografia da imunoexpressão de iNOS no corno dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: iNOS; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 10 – Análise quantitativa da imunoposição para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402



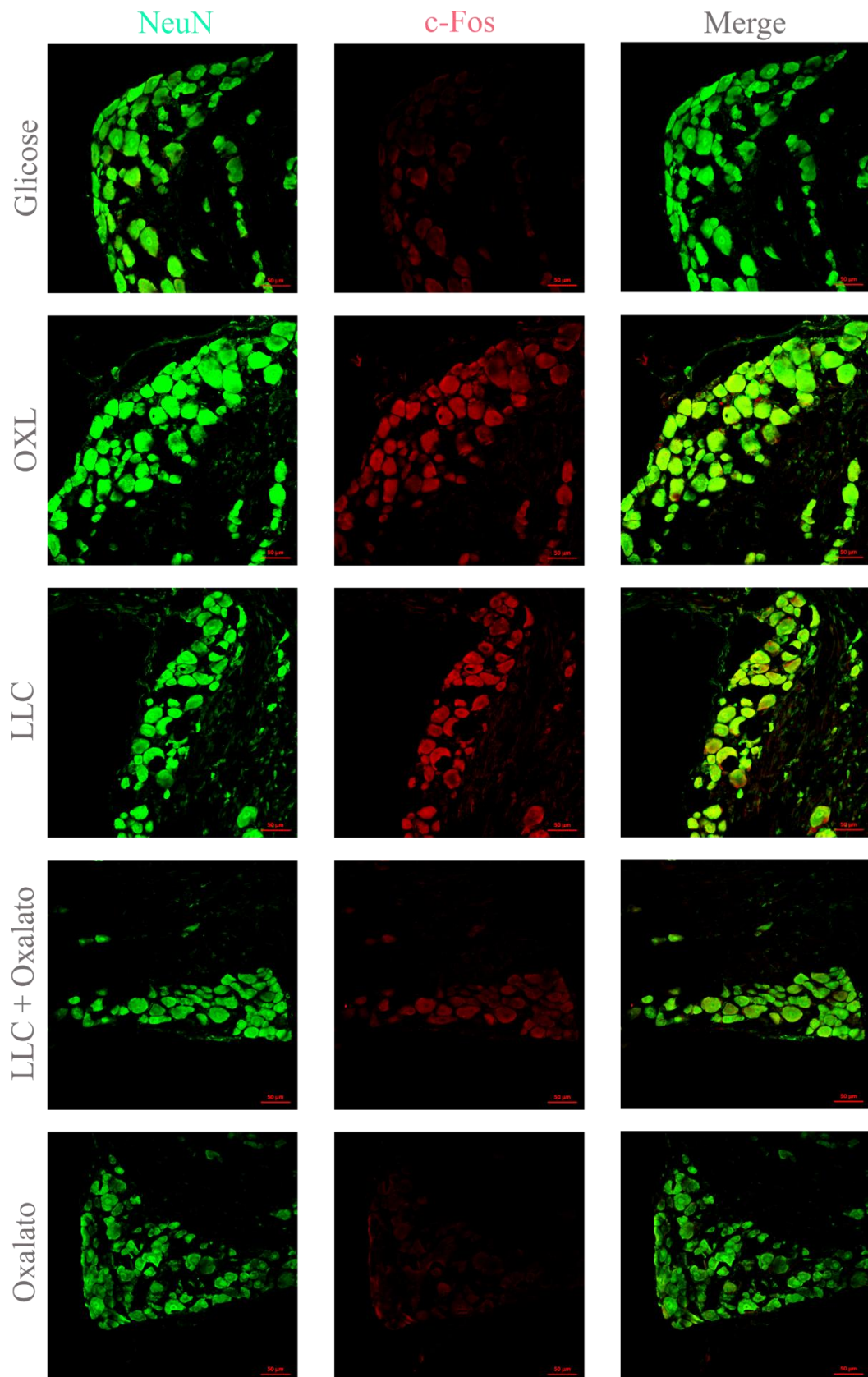
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de iNOS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402 também são comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.11 Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato

Na imunofluorescência para c-Fos, com 56 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um aumento da imunoposição nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 19).

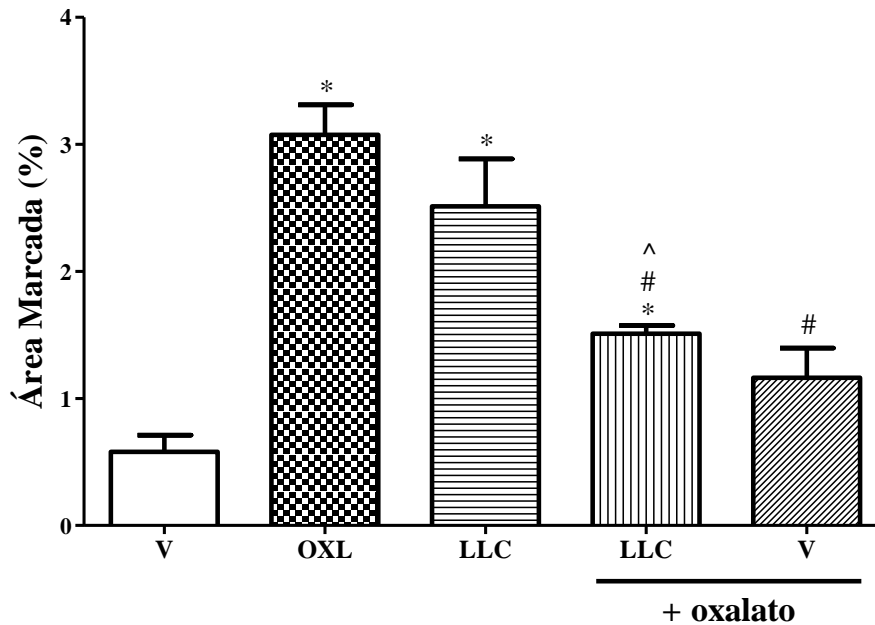
Na análise quantitativa da imunoposição para c-Fos, a quantificação da área marcada, comparando com o grupo controle, aumentou significativamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg), já o grupo tratado somente com o oxalato (1,7 mg/kg) não apresentou valores estatisticamente significativos. Houve uma diferença significativa entre os grupos tratados com LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato com a OXL e entre o grupo tratado com LLC-1402 e LLC-1402 junto com oxalato (GRÁFICO 11).

Figura 19 – Fotomicrografia da imunoposição de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 11 – Análise quantitativa da imunoposição para c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



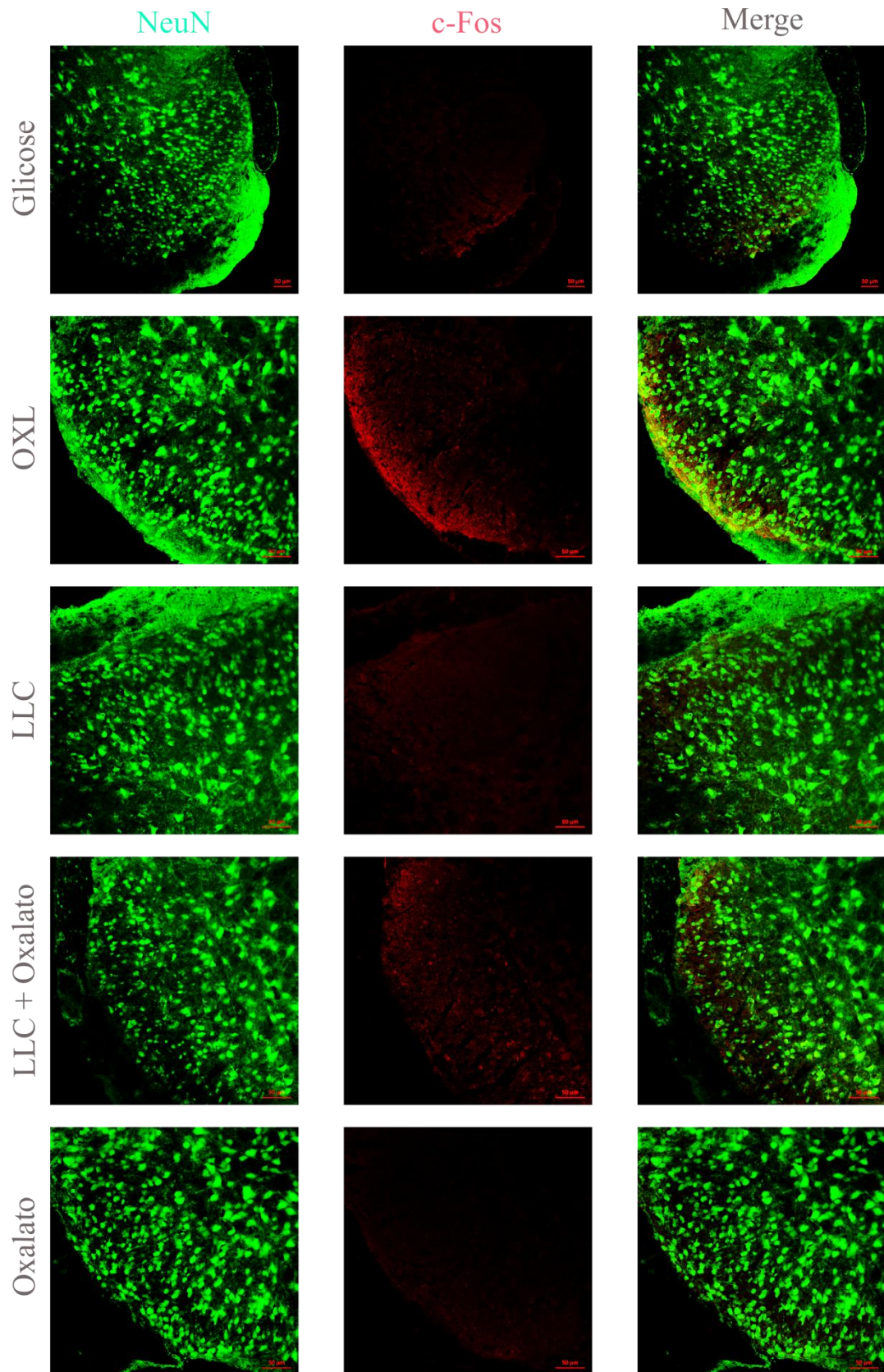
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de c-Fos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL; ^ $p < 0,05$  versus LLC (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.12 Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato

Na imunofluorescência para c-Fos, no experimento de 56 dias, no experimento no corno dorsal da medula espinhal, foi observado um leve aumento nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg), não sendo considerado significativo estatisticamente quando comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 20).

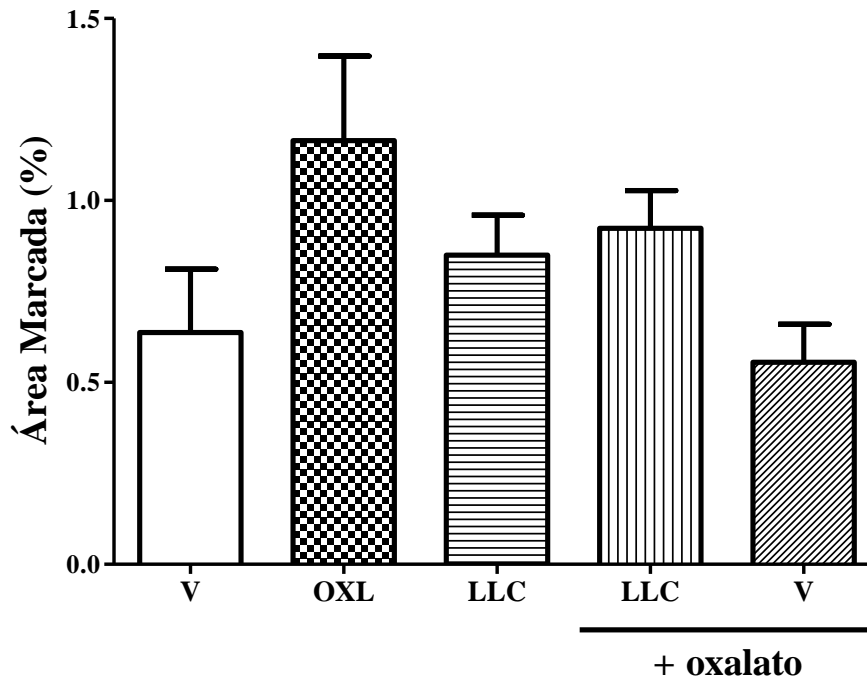
Na análise quantitativa da imunoposição para c-Fos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 12).

Figura 20 – Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 12 – Análise quantitativa da imunoposição para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



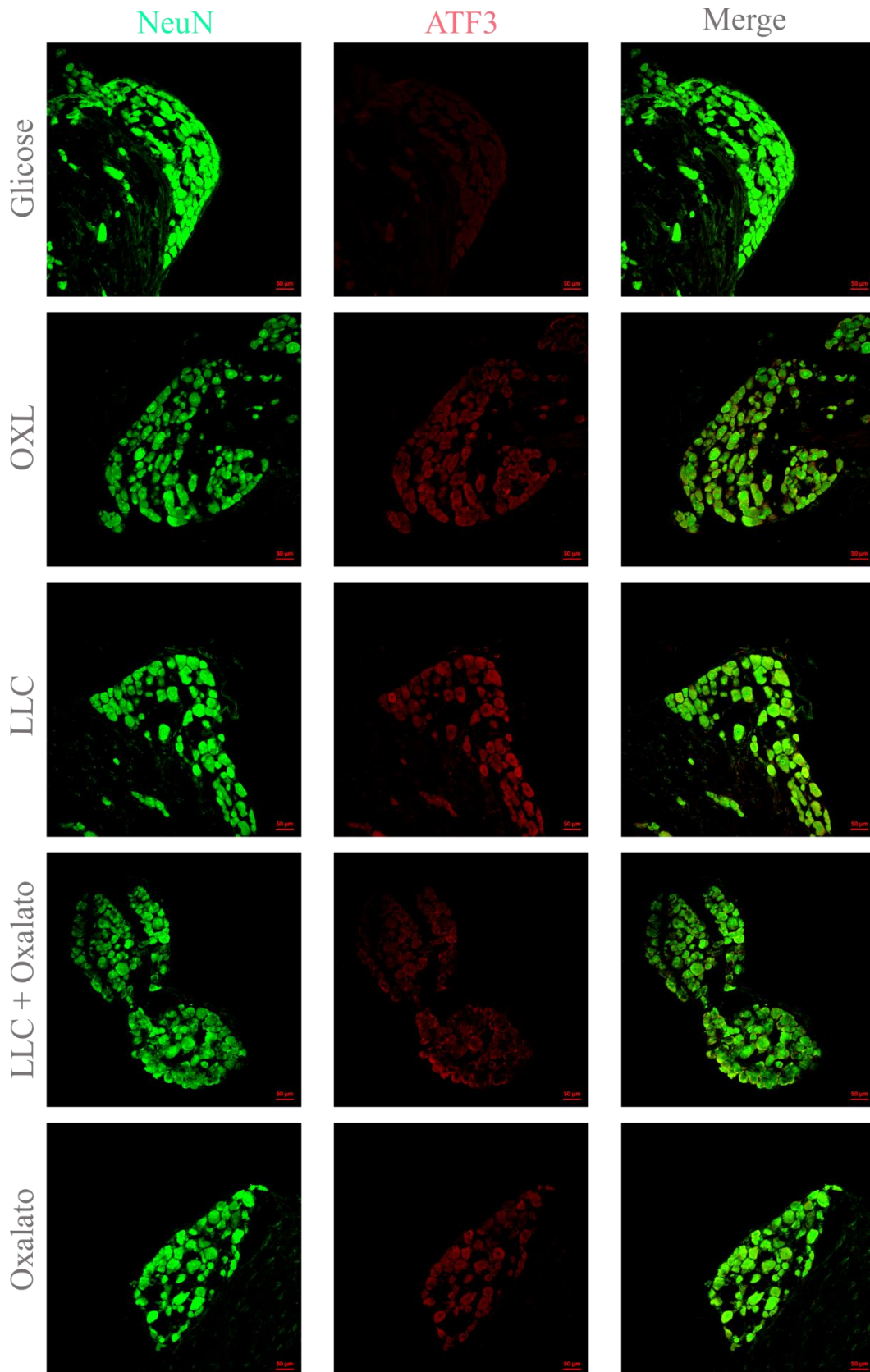
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de c-Fos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.13 Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato

Na imunofluorescência para ATF-3, no experimento de 56 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um aumento da imunoposição nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 21).

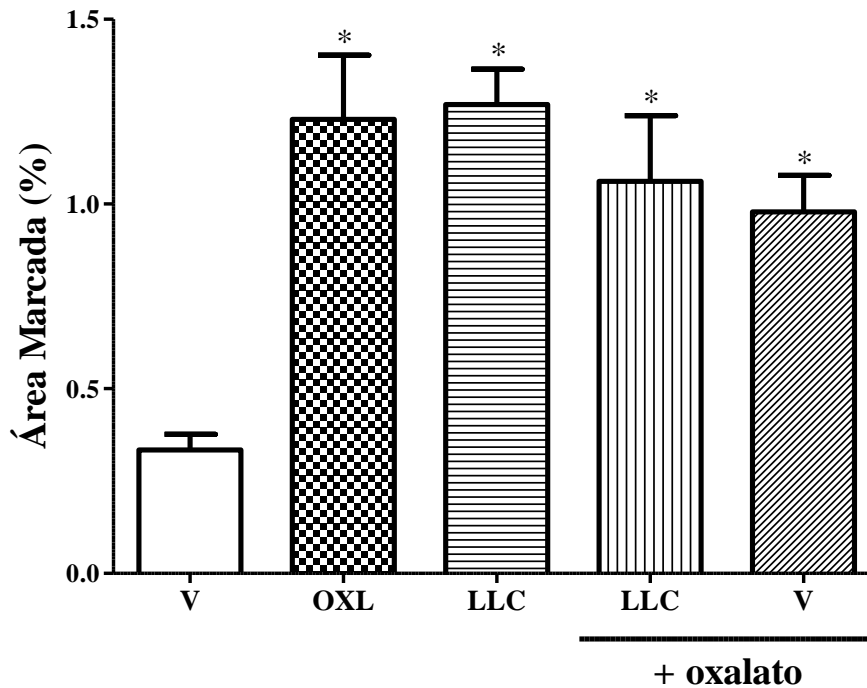
Na análise quantitativa da imunoposição para ATF-3, houve um aumento significativo estatisticamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 13).

Figura 21 – Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 100x.

Gráfico 13 – Análise quantitativa da imunoposição para ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de ATF-3. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

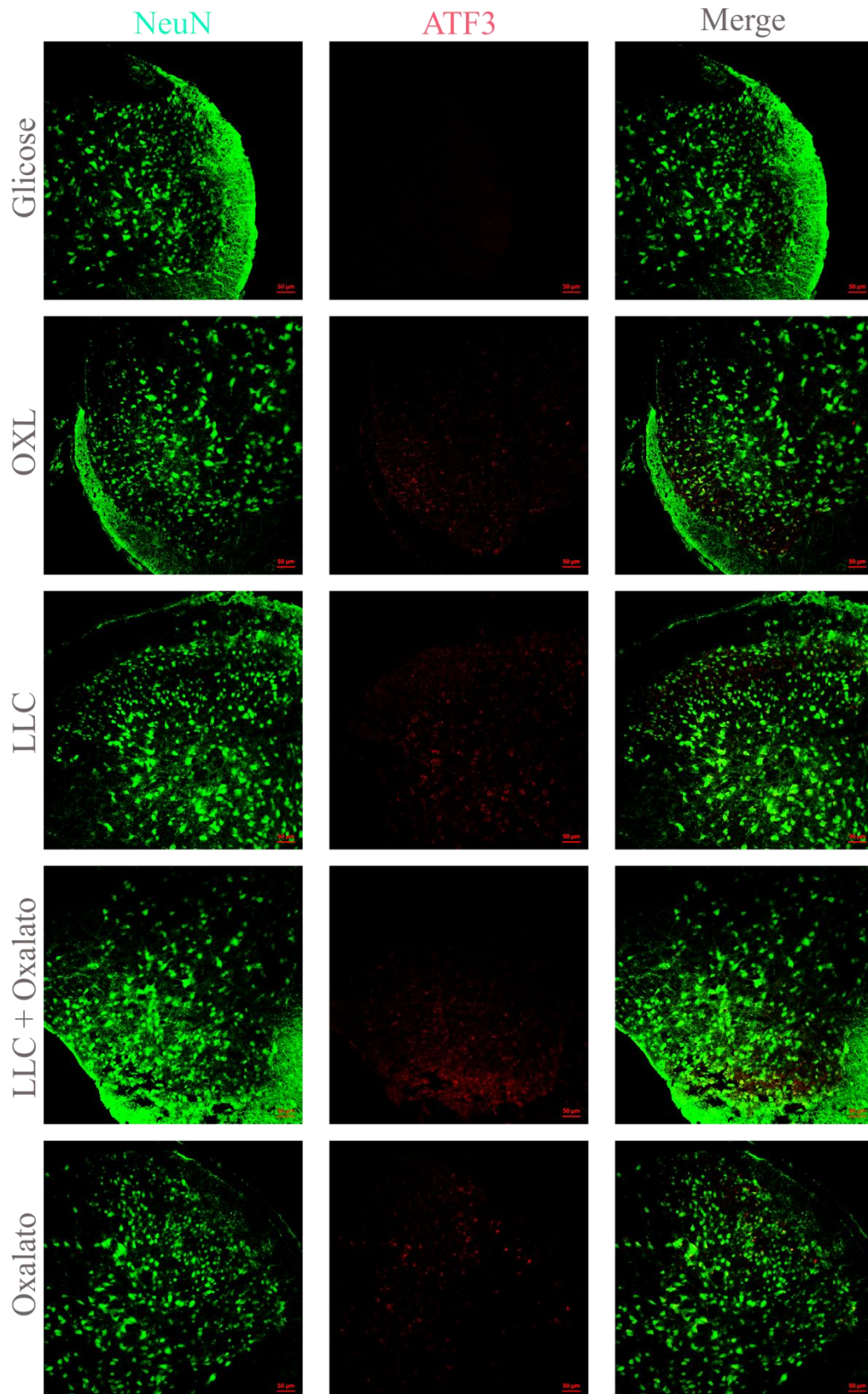
#### 6.14 Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato

Na imunofluorescência para ATF-3, no experimento de 56 dias, no corno dorsal da medula espinhal, foi observado um aumento da imunoposição nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 22).

Na análise quantitativa da imunoposição para ATF-3, houve um aumento significativo estatisticamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 14).

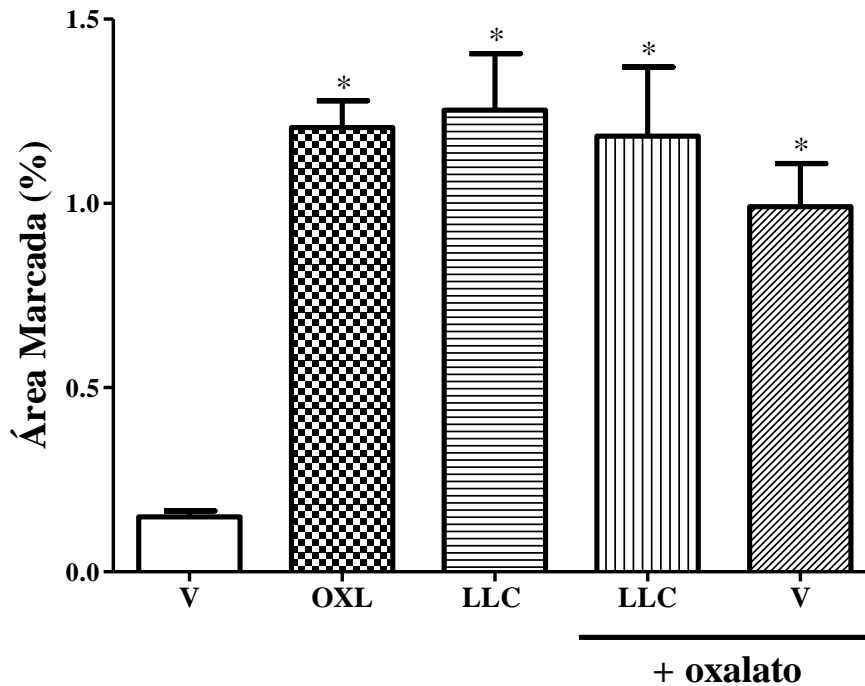


Figura 22 – Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 14 – Análise quantitativa da imunopressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



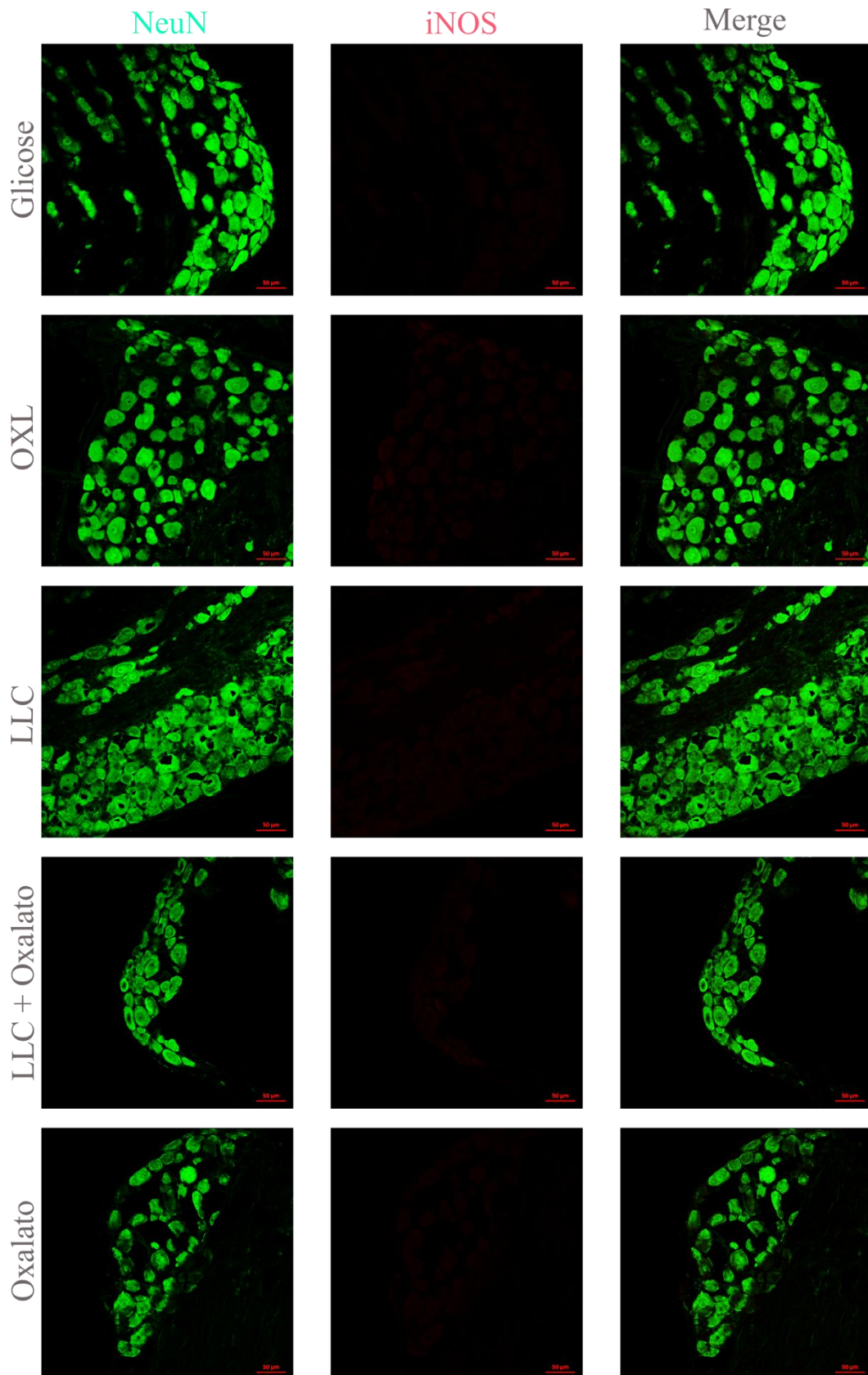
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de ATF-3. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.15 Imunofluorescência para iNOS em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato

Na imunofluorescência para iNOS, no experimento de 56 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um leve aumento da imunopressão nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 23).

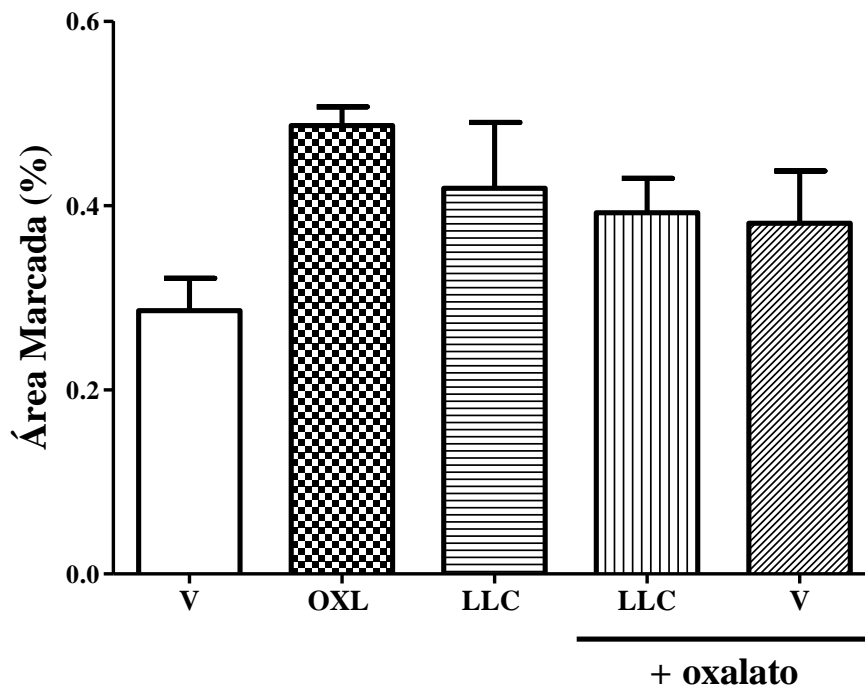
Na análise quantitativa da imunopressão para iNOS, no gânglio da raiz dorsal, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 15).

Figura 23 – Fotomicrografia da imunoposição de iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: iNOS; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 15 – Análise quantitativa da imunoposição para iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



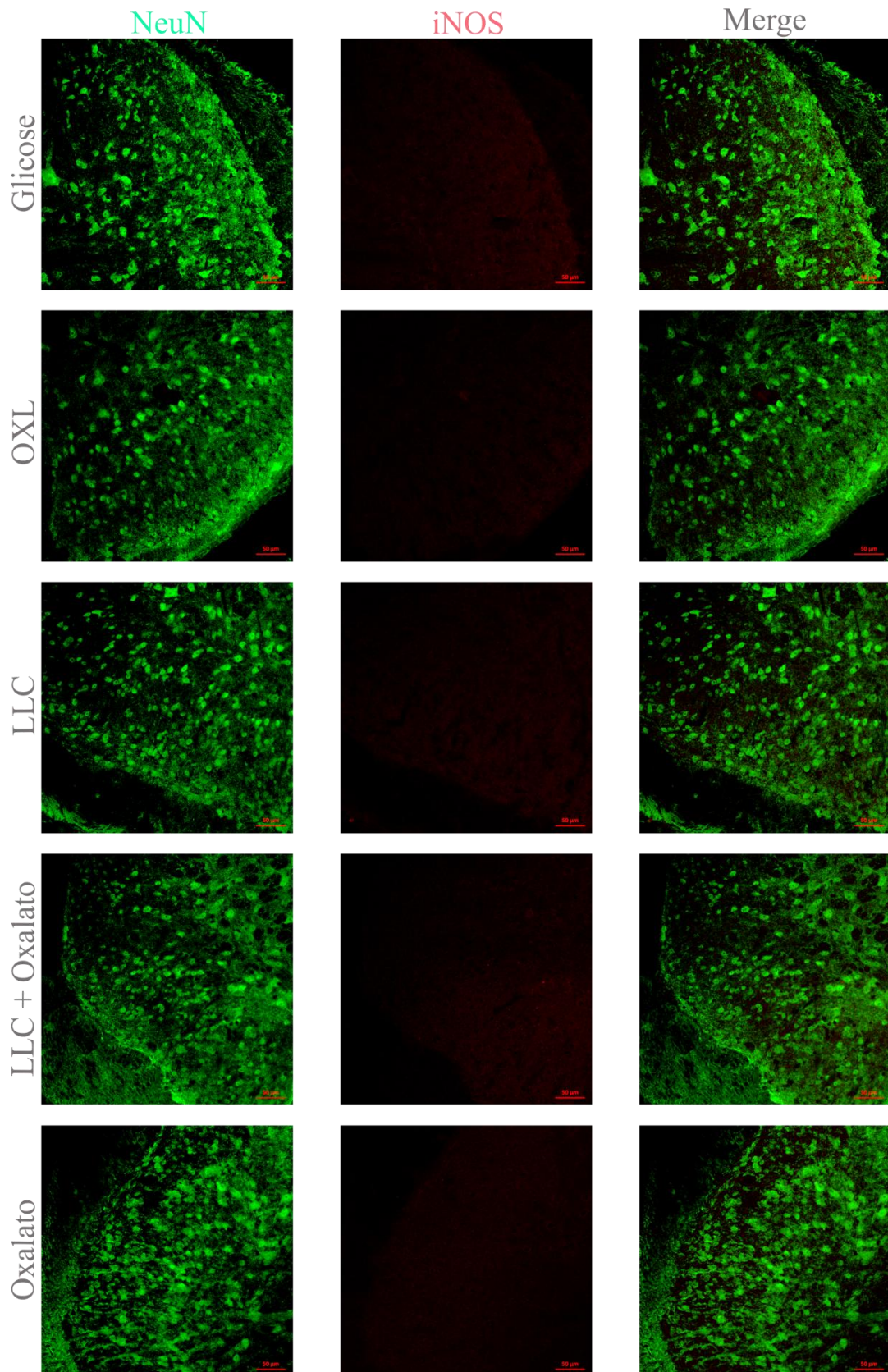
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de iNOS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.16 Imunofluorescência para iNOS em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato

Na imunofluorescência para iNOS, no experimento de 56 dias, no corno dorsal da medula espinhal, não foi observado aumento da imunoposição nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 24).

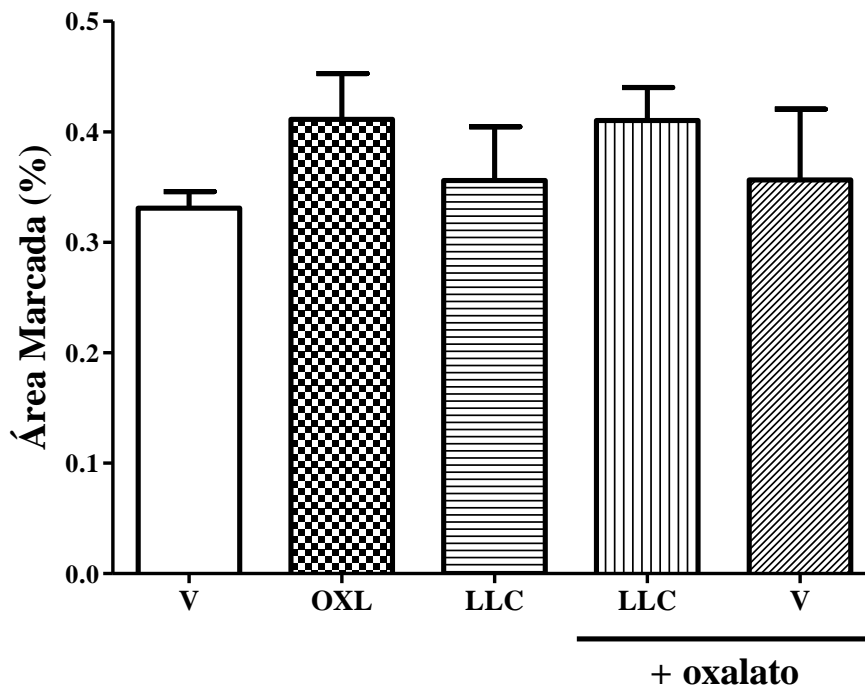
Na análise quantitativa da imunoposição para iNOS, no corno dorsal da medula espinhal, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 16).

Figura 24 – Fotomicrografia da imunoexpressão de iNOS no corno dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: iNOS; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 56 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 16 – Análise quantitativa da imunoposição para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato



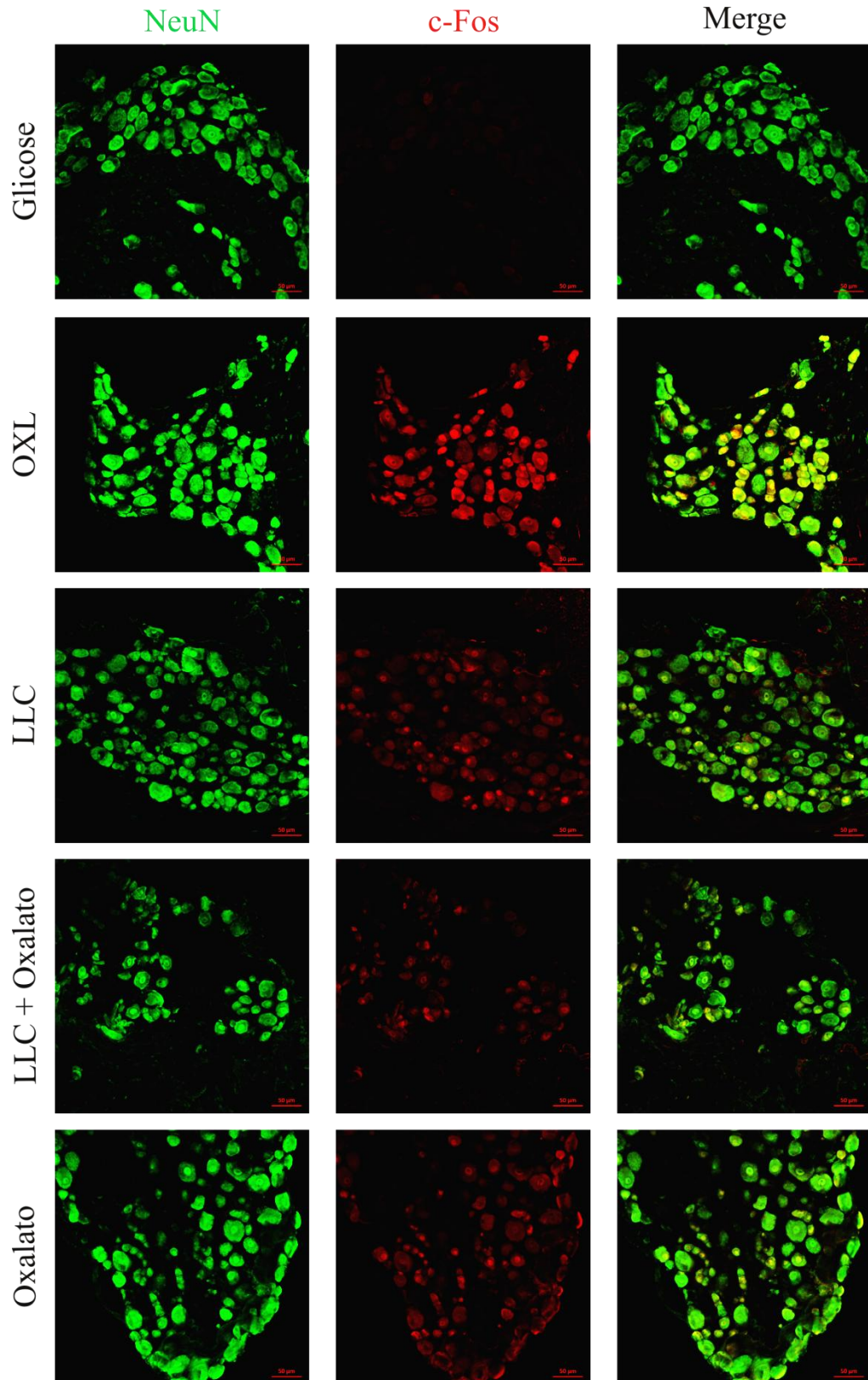
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de iNOS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 56 dias.

### 6.17 Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias

Na imunofluorescência para c-Fos, no experimento de 28 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um aumento da imunoposição nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 25).

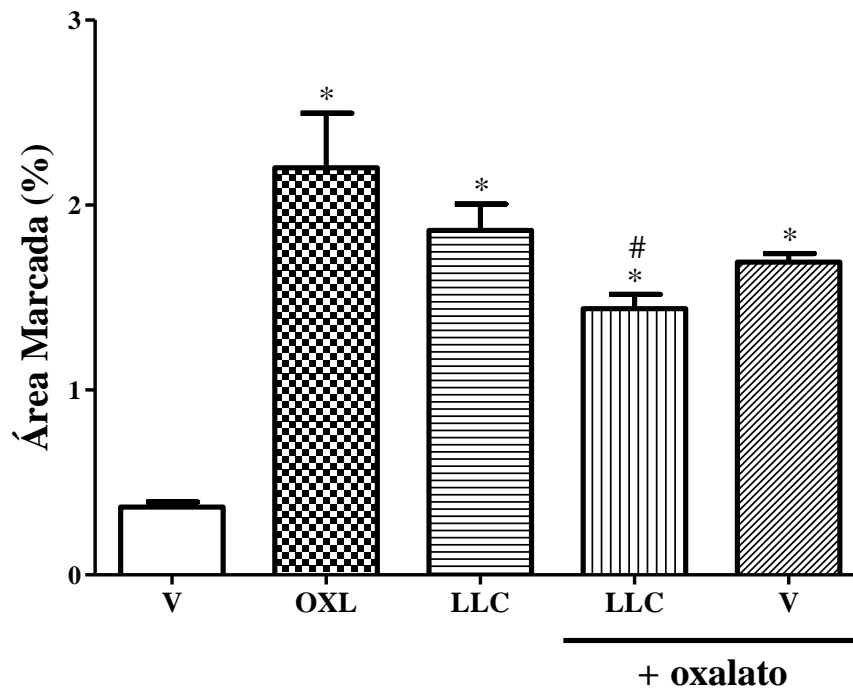
Na análise quantitativa da imunoposição para c-Fos, houve um aumento significativo estatisticamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle. Houve uma diferença significativa entre o grupo tratado com LLC-1402 junto com oxalato e com a OXL (GRÁFICO 17).

Figura 25 – Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 28 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 17 – Análise quantitativa da imunoposição para c-Fos no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de c-Fos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 28 dias.

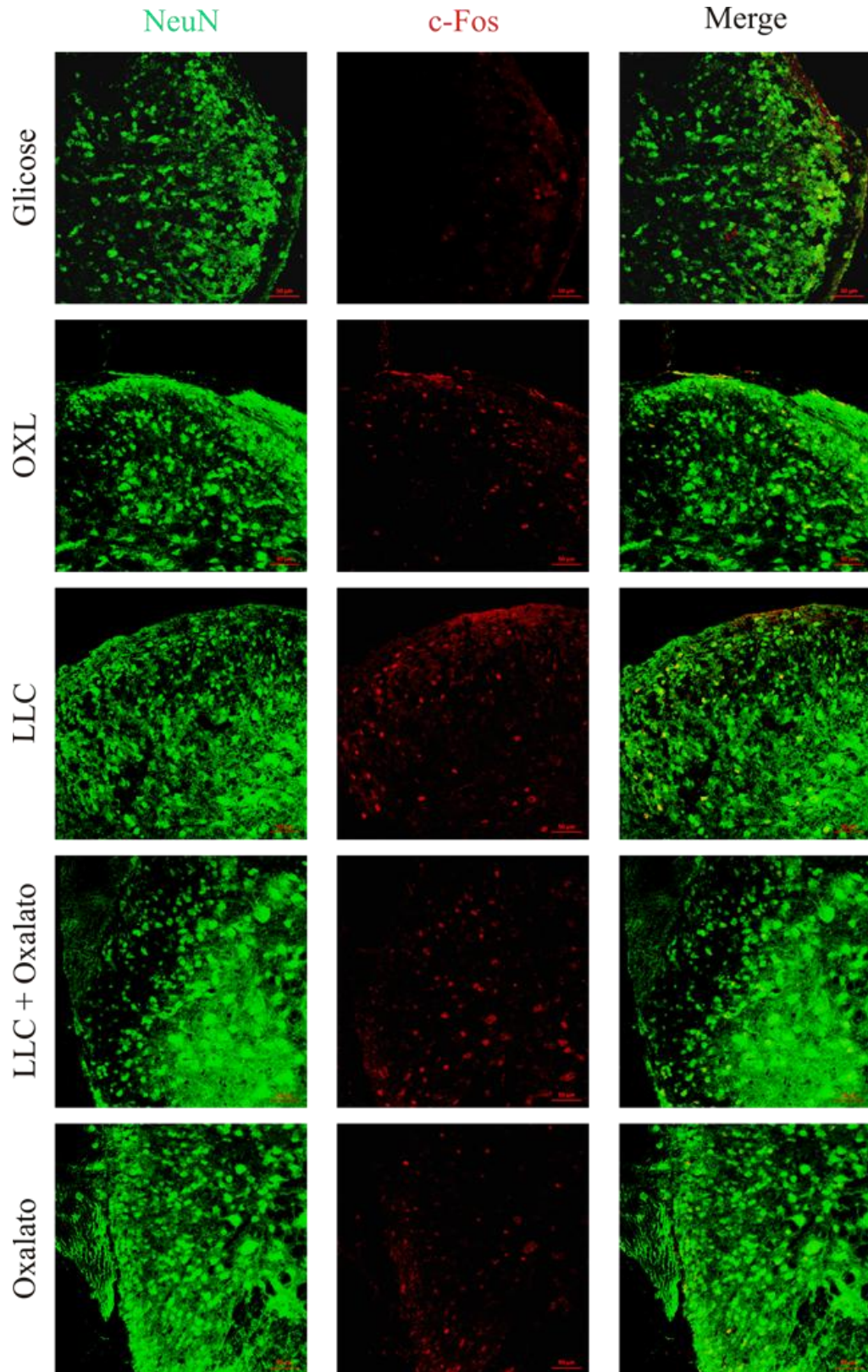
### 6.18 Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias

Na imunofluorescência para c-Fos, no experimento de 28 dias, no corno dorsal da medula espinhal, foi observado um aumento da imunoposição nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle (FIGURA 26).

Na análise quantitativa, houve um aumento significativo da imunoposição de c-Fos nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle. Houve uma diferença significativa entre o grupo tratado com oxalato e LLC (GRÁFICO 18).

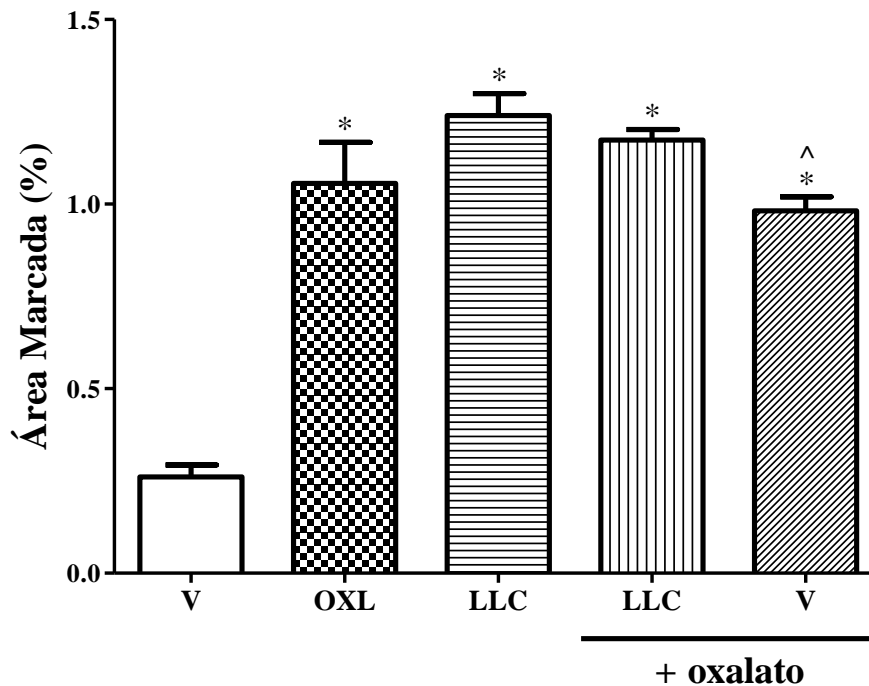


Figura 26 – Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 28 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 18 – Análise quantitativa da imunoposição para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



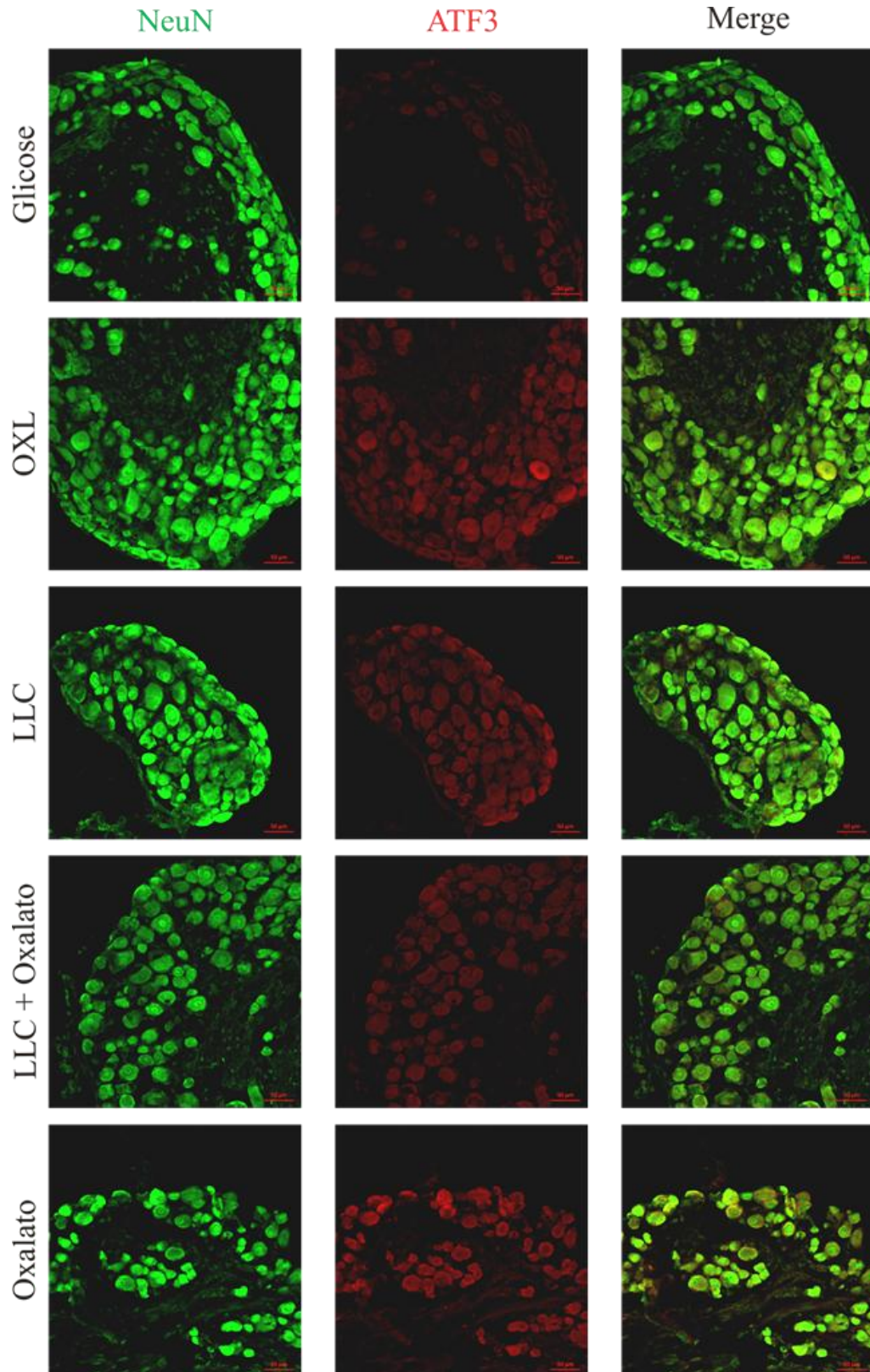
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de c-Fos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; ^ $p < 0,05$  versus LLC (teste Newman-Keuls). Experimento 28 dias.

### 6.19 Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias

Na imunofluorescência para ATF-3, no experimento de 28 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um aumento da imunoposição nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 27).

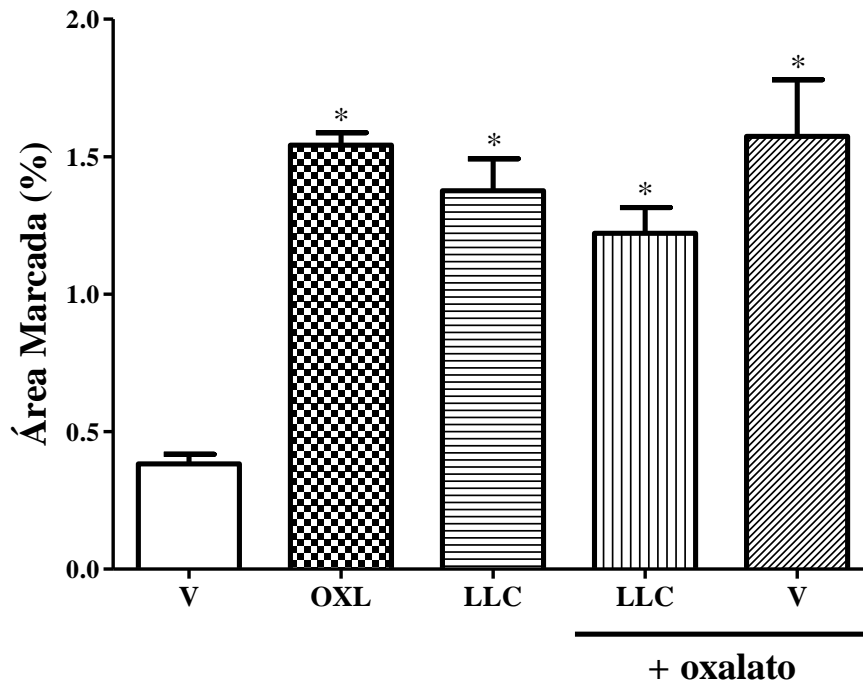
Na análise quantitativa da imunoposição para ATF-3, houve um aumento significativo estatisticamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 19).

Figura 27 – Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 28 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 19 – Análise quantitativa da imunopressão para ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



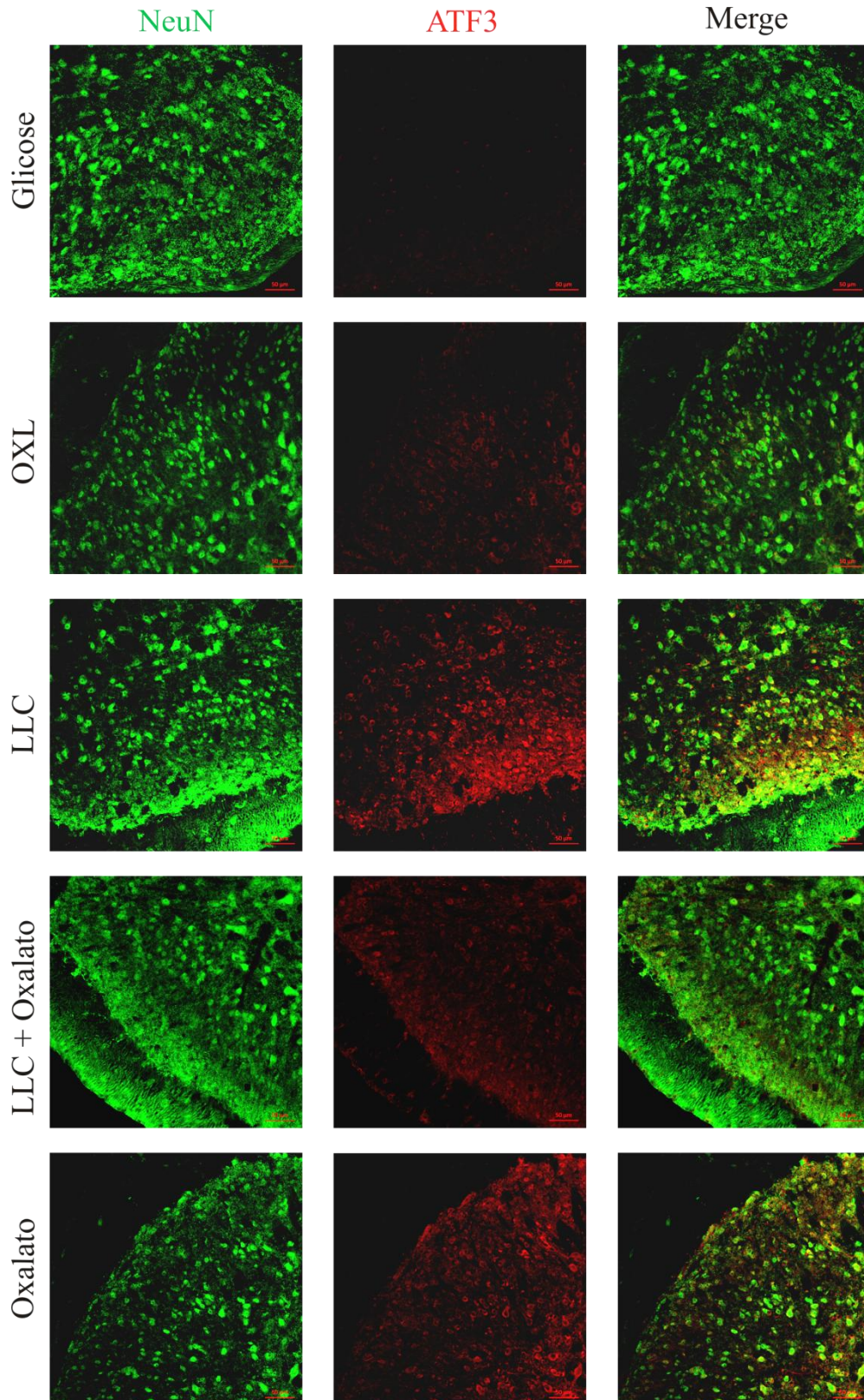
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de ATF-3. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo (teste Newman-Keuls). Experimento 28 dias.

### 6.20 Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias

Na imunofluorescência para ATF-3, no experimento de 28 dias, no corno dorsal da medula espinhal, foi observado um aumento da imunopressão nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle (FIGURA 28).

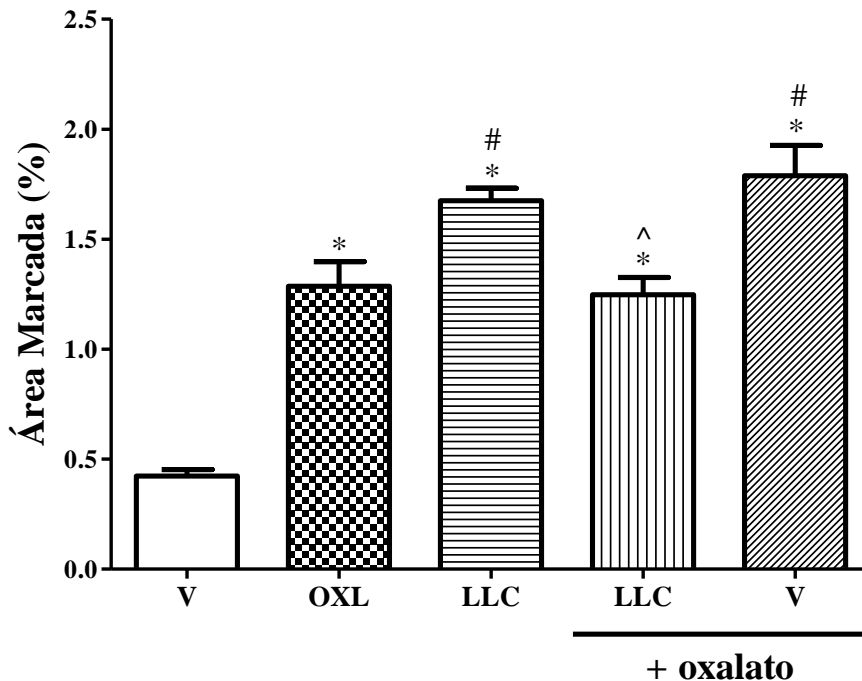
Na análise quantitativa da imunopressão para ATF-3, houve um aumento significativo estatisticamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle. Houve diferença estatística entre os grupos tratados com LLC-1402 e somente oxalato e a OXL. Houve diferença estatística também entre o grupo tratado com LLC junto com oxalato e LLC (GRÁFICO 20).

Figura 28 – Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 28 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 20 – Análise quantitativa da imunopressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



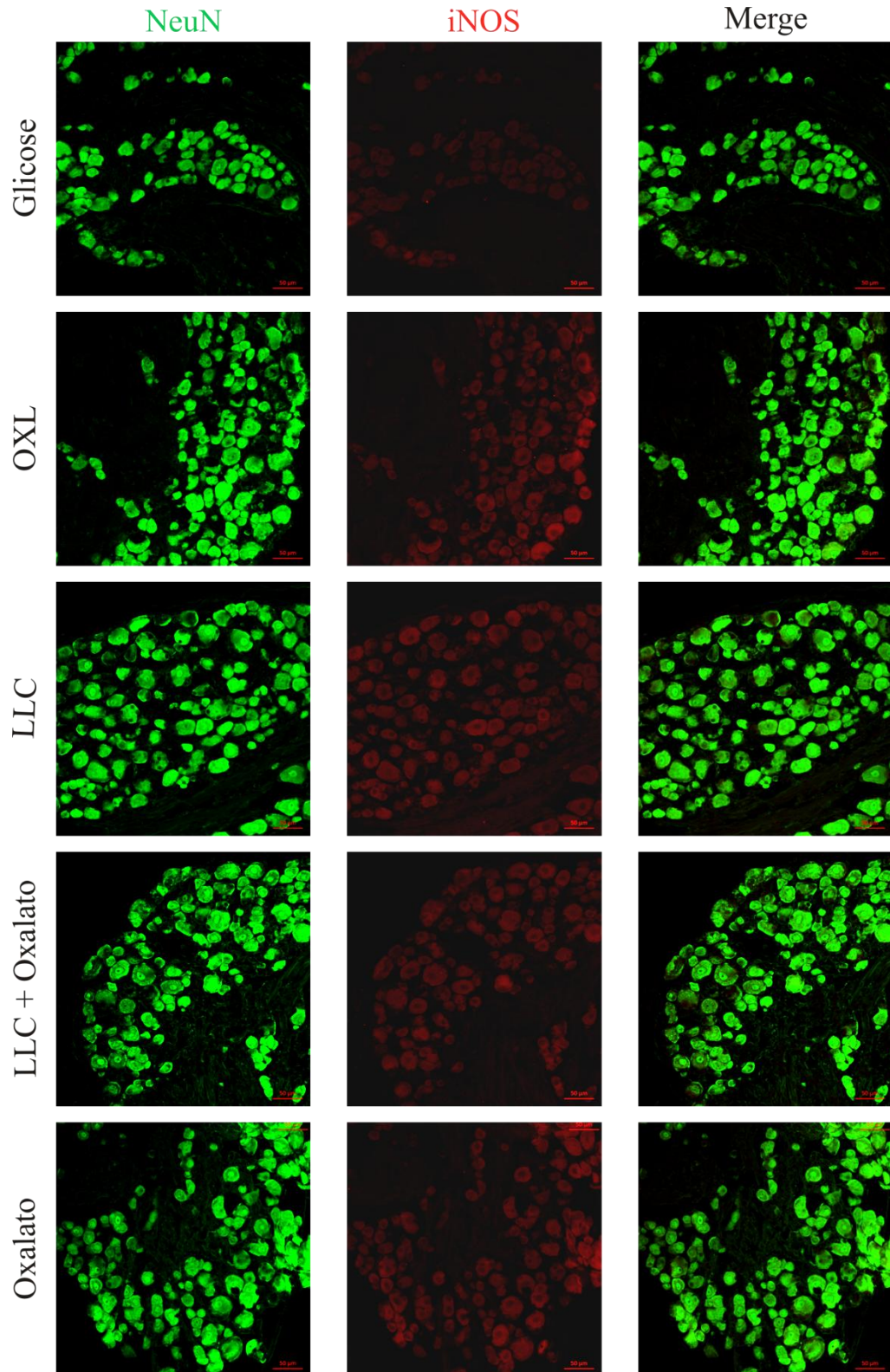
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de ATF-3. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL; ^ $p < 0,05$  versus LLC (teste Newman-Keuls). Experimento 28 dias.

### 6.21 Imunofluorescência para iNOS em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias

Na imunofluorescência para iNOS, no experimento de 28 dias, no gânglio da raiz dorsal, foi observado um aumento da imunopressão nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle (FIGURA 29).

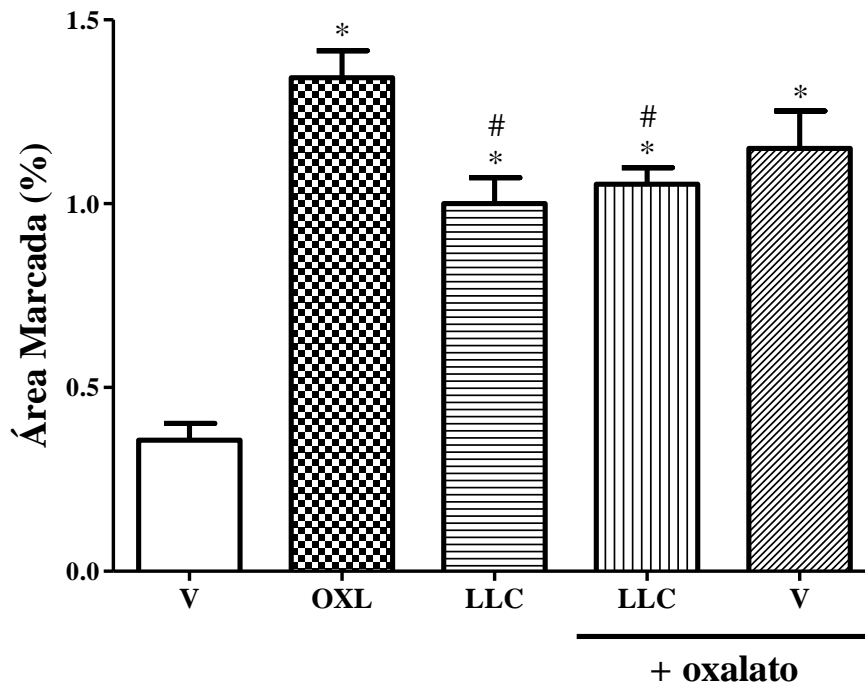
Na análise quantitativa da imunopressão para iNOS, houve um aumento significativo estatisticamente nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle. Houve diferença estatística entre os grupos tratados com LLC-1402 e LLC-1402 junto com oxalato e a OXL (GRÁFICO 21).

Figura 29 – Fotomicrografia da imunopressão de iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: iNOS; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 28 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 21 – Análise quantitativa da imunopressão para iNOS no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de iNOS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 28 dias.

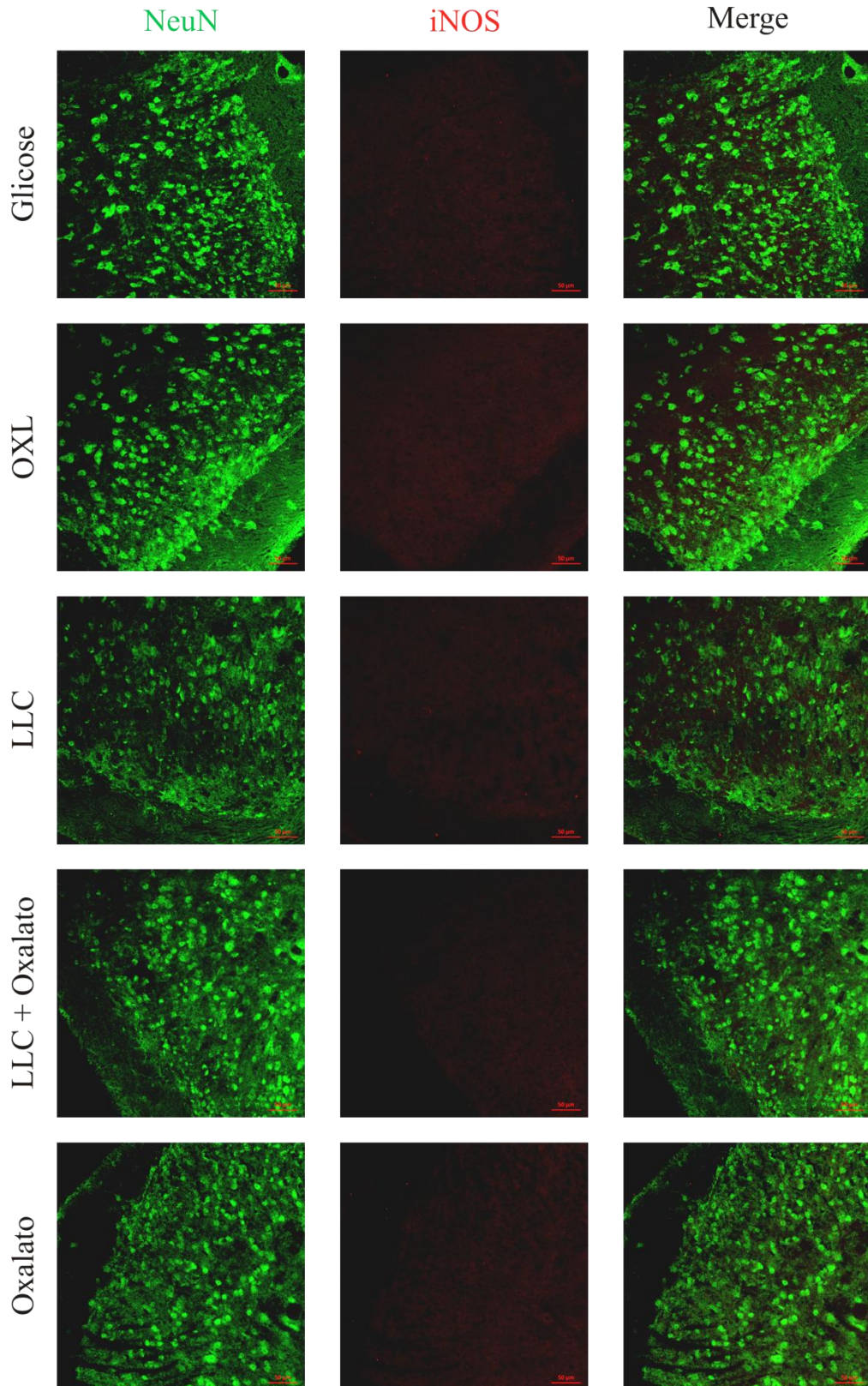
## 6.22 Imunofluorescência para iNOS em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos às injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias

Na imunofluorescência para iNOS, no experimento de 28 dias, no corno dorsal da medula espinhal, não foi observado aumento da imunopressão nos grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparado com o grupo controle, o qual foi tratado com solução de glicose 5% (FIGURA 30).

Na análise quantitativa da imunopressão para iNOS, no corno dorsal da medula espinhal, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) juntamente com oxalato (1,7 mg/kg) e somente oxalato (1,7 mg/kg), comparando com o grupo controle (GRÁFICO 22). Na TABELA 6, segue um resumo dos resultados de todas as imunofluorescências realizadas.

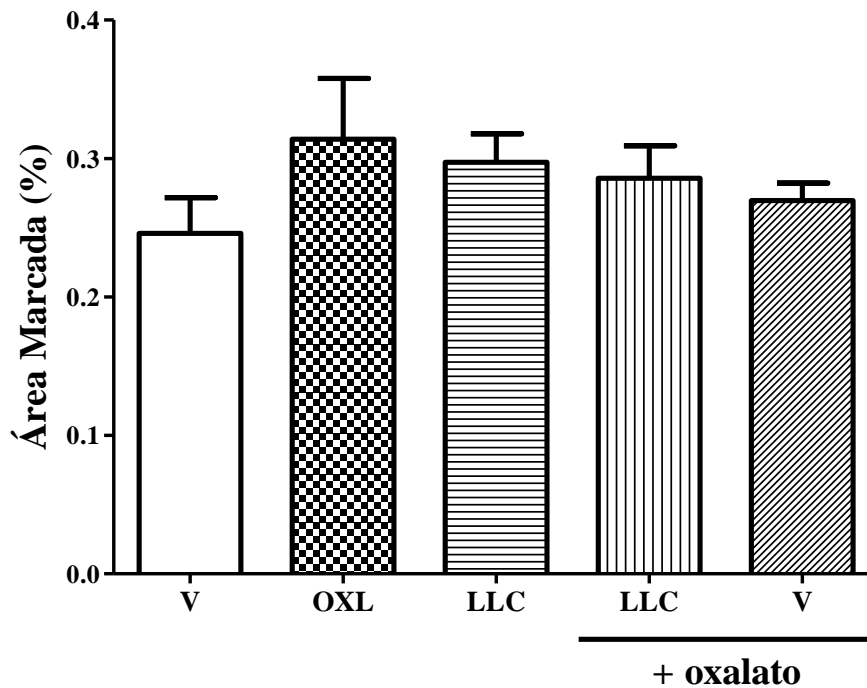


Figura 30 – Fotomicrografia da imunoexpressão de iNOS no corno dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: iNOS; laranja: fusão; OXL: oxaliplatina; LLC: análogo da oxaliplatina. Experimento 28 dias. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Gráfico 22 – Análise quantitativa da imunopressão para iNOS no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato – experimento 28 dias



O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de iNOS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são também comparados com o grupo tratado com OXL. \* $p < 0,05$  versus veículo; # $p < 0,05$  versus OXL (teste Newman-Keuls). Experimento 28 dias.

Tabela 6 – Resumo dos resultados das imunofluorescências realizadas

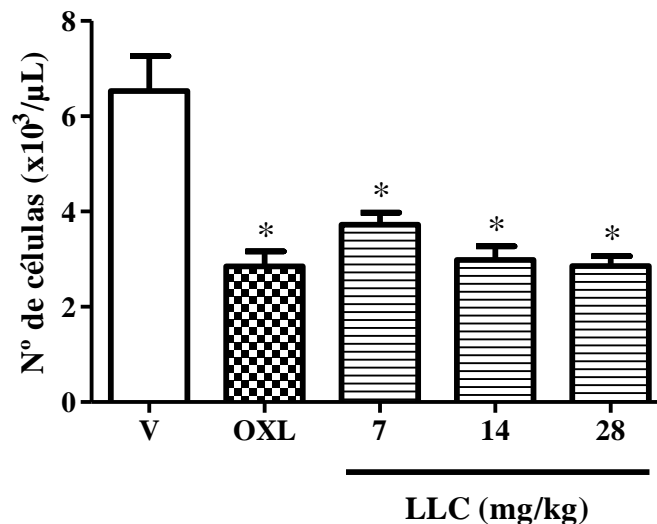
Resultados imunofluorescência						
Experimento	Aumento da imunoe expressão					
56 dias	c-Fos		ATF-3		iNOS	
Grupos	Gânglio	Medula	Gânglio	Medula	Gânglio	Medula
Glicose	N	N	N	N	N	N
OXL	S	N	S	S	N	N
LLC 7	S	N	S	S	N	N
LLC 14	S	N	S	S	N	N
LLC 28	S	N	S	S	N	N
Experimento						
56 dias						
Glicose	N	N	N	N	N	N
OXL	S	N	S	S	N	N
LLC	S	N	S	S	N	N
LLC + Oxalato	S	N	S	S	N	N
Oxalato	N	N	S	S	N	N
Experimento						
28 dias						
Glicose	N	N	N	N	N	N
OXL	S	S	S	S	S	N
LLC	S	S	S	S	S	N
LLC + Oxalato	S	S	S	S	S	N
Oxalato	S	S	S	S	S	N

Fonte: elaborado pelo autor. S: Sim; N: Não.

### 6.23 Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402

No 28º dia do experimento, foi realizada a coleta de sangue dos animais submetidos às injeções de glicose, OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg) para contagem total de leucócitos. Os resultados obtidos mostraram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do número de células nos grupos tratados com OXL e LLC-1402 em comparação com o grupo controle (glicose) (GRÁFICO 23).

Gráfico 23 – Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à injeção de OXL e LLC-1402



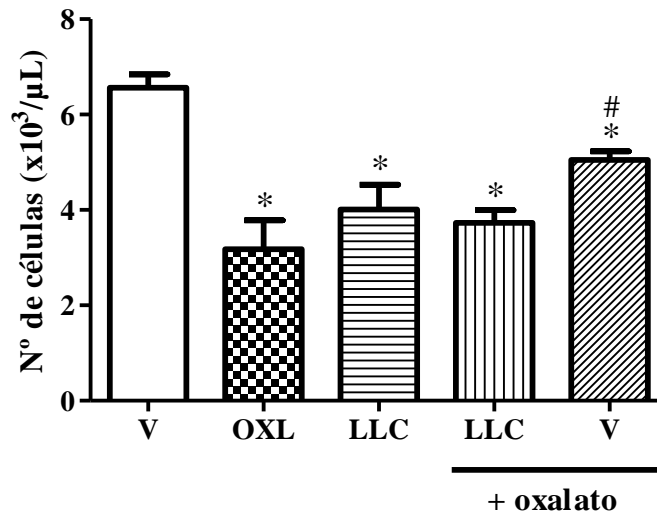
O gráfico representa a contagem total de leucócitos de camundongos submetidos às injeções de OXL (2 mg/kg) e LLC (7, 14, 28 mg/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo (teste Newman-Keuls).

### 6.24 Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato

No 28º dia do experimento, foi realizada a coleta de sangue dos animais submetidos às injeções de glicose, OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e oxalato (1,7 mg/kg) para contagem total de leucócitos. Os resultados adquiridos mostraram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do número de células nos grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 juntamente com o oxalato e somente o oxalato em comparação com o grupo controle

(glicose). Houve uma diferença significativa entre o grupo tratado com oxalato e OXL (GRÁFICO 24).

Gráfico 24 – Contagem total de leucócitos de camundongos submetidos à injeção de OXL, LLC-1402 e oxalato

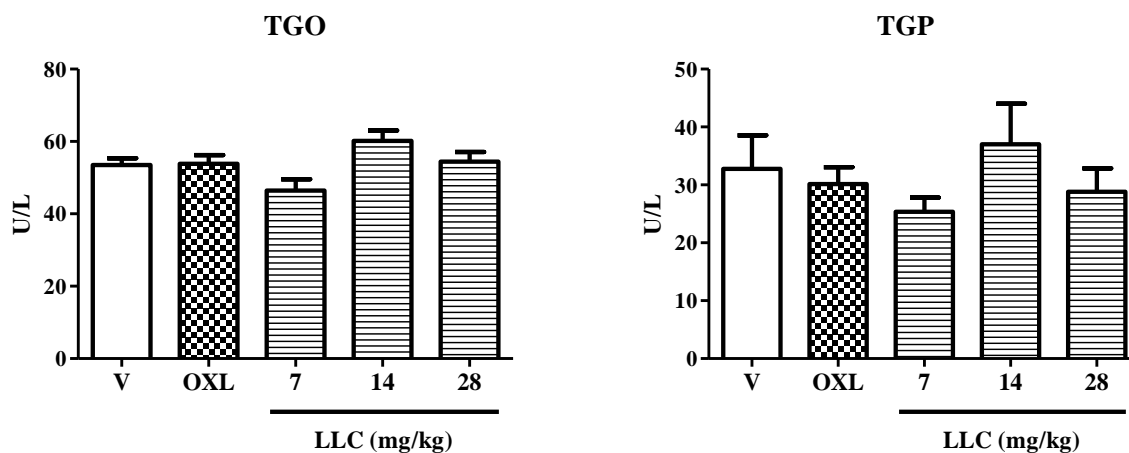


O gráfico representa a contagem total de leucócitos de camundongos submetidos às injeções de OXL (2 mg/kg), LLC (14 mg/kg) e oxalato (1,7 mg/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 juntamente com o oxalato e somente o oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo (teste Newman-Keuls).

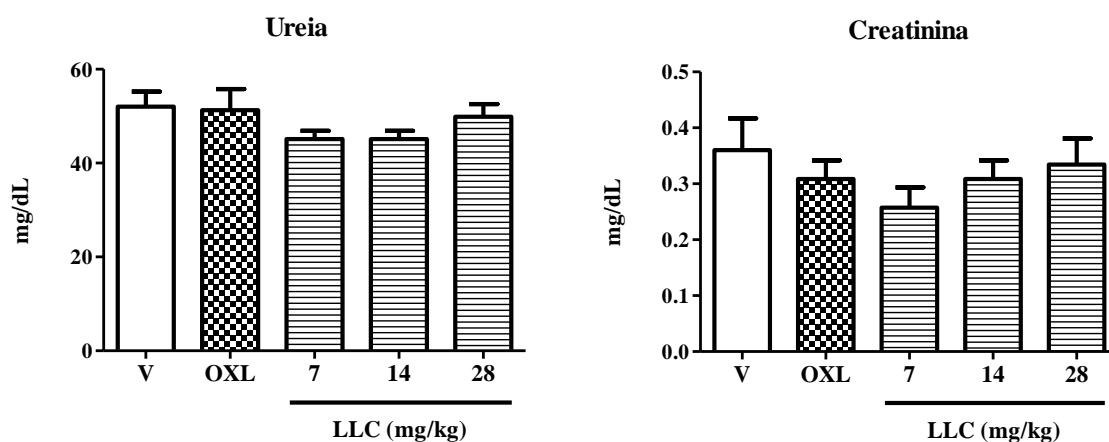
### 6.25 Dosagens bioquímicas para TGO, TGP, ureia e creatinina de camundongos submetidos à administração de OXL e LLC-1402

No 28º dia do experimento, foi realizada a coleta de sangue dos animais submetidos às injeções de glicose, OXL (2 mg/kg) e LLC-1402 (7, 14 e 28 mg/kg) para a realização de dosagens bioquímicas para a avaliação da função hepática (TGO, TGP) e da função renal (ureia, creatinina). Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos (GRÁFICOS 25, 26, 27 e 28).

Gráficos 25, 26, 27 e 28 – Dosagens bioquímicas para avaliar funções hepática e renal de camundongos submetidos a injeções de OXL e LLC-1402



Os gráficos 25 e 26 representam as dosagens bioquímicas para TGO e TGP (função hepática) de camundongos submetidos a injeções de glicose (veículo), OXL e LLC-1402. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo (teste Newman-Keuls).



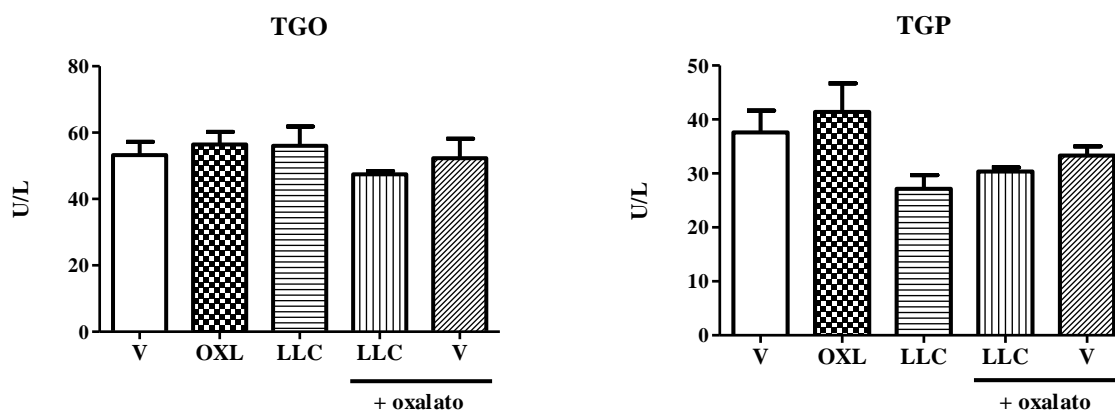
Os gráficos 27 e 28 representam as dosagens bioquímicas para ureia e creatinina (função renal) de camundongos submetidos a injeções de glicose (veículo), OXL e LLC-1402. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL e LLC-1402 são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo (teste Newman-Keuls).

## 6.26 Dosagens bioquímicas para TGO, TGP, ureia e creatinina de camundongos submetidos à administração de OXL, LLC-1402 e oxalato

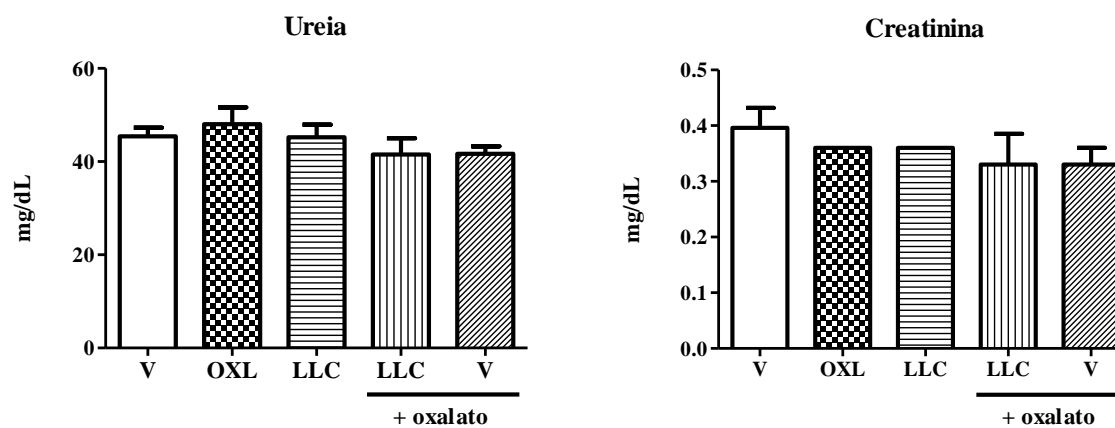
No 28º dia do experimento, foi realizada a coleta de sangue dos animais submetidos às injeções de glicose, OXL (2 mg/kg), LLC-1402 (14 mg/kg) e oxalato (1,7 mg/kg) para a realização de dosagens bioquímicas para a avaliação das funções hepática

(TGO, TGP) e renal (ureia, creatinina). Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos (GRÁFICOS 29, 30, 31 e 32).

Gráficos 29, 30, 31 e 32 – Dosagens bioquímicas para avaliar funções hepática e renal de camundongos submetidos a injeções de OXL, LLC-1402 e oxalato.



Os gráficos 29 e 30 representam as dosagens bioquímicas para TGO e TGP (função hepática) de camundongos submetidos a injeções de glicose (veículo), OXL, LLC-1402 e oxalato. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo (teste Newman-Keuls).



Os gráficos 31 e 32 representam as dosagens bioquímicas para ureia e creatinina (função renal) de camundongos submetidos a injeções de glicose (veículo), OXL, LLC-1402 e oxalato. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato são comparados ao grupo controle (veículo). \* $p < 0,05$  versus veículo (teste Newman-Keuls).

## 7 DISCUSSÃO

No estudo, foi utilizado o modelo de neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL desenvolvido no LAFICA por ocasião da publicação de Azevedo *et al.* (2013), que tomou por base os modelos desenvolvidos por Ling *et al.* (2007a). Este realizou um estudo em ratos, mostrando que o tratamento com OXL desenvolve uma duradoura e dolorosa neuropatia, através do uso de testes nociceptivos mecânicos e térmicos. Eles usaram as doses de 1, 2 e 4 mg/kg de OXL em injeções repetidas por via intravenosa. O trabalho de Azevedo *et al.* (2013) desenvolveu e adaptou este modelo experimental para utilização em camundongos, contudo seus resultados não avaliaram de forma mais detalhada os danos neuronais. No nosso estudo, optamos por uma dose mais elevada no intuito de observar melhor os danos neuronais e também por estar mais consonante com a maioria dos artigos publicados. Desse modo, para o presente estudo foi escolhida a dose de 2 mg/kg para a indução da neuropatia sensitiva periférica.

Pesquisadores têm investigado os possíveis mecanismos do desenvolvimento da neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015; JAGGI; SINGH, 2012; SISIGNANO *et al.*, 2014). Alguns estudos dão relevância para o oxalato, metabólito da OXL, pois se sabe que o oxalato pode ser tóxico para diversos tecidos, inclusive o tecido nervoso, e que está relacionado à via da NADPH oxidase, umas das principais enzimas que catalisa a produção de superóxidos e de outras espécies reativas do oxigênio (JOSHI; PECK; KHAN, 2013; LIU *et al.*, 2013; SAKURAI *et al.*, 2009). Além disso, investigadores sugerem que o oxalato, por ser conhecido como um quelante de cálcio e magnésio, pode estar envolvido no mecanismo que ocasiona a neuropatia periférica provocada por OXL, através da depleção celular dos níveis de cálcio e magnésio e, conseqüentemente, alterando a cinética de alguns canais iônicos, como os canais de sódio dependentes de voltagem sensíveis ao cálcio (AVAN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2013). Dessa forma, procuramos investigar a importância do oxalato no desenvolvimento da neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL, bem como sua participação em outros possíveis efeitos colaterais, como alterações na contagem de leucócitos e nas funções hepática e renal.

O análogo livre de oxalato, LLC-1402, foi desenvolvido e produzido por ocasião da publicação de Liu *et al.* (2013). O Dr. Weiping Liu, do Instituto de Metais Preciosos de Kunming, Yunnan (China), autor da publicação, gentilmente cedeu uma amostra do composto para que pudesse ser testado. No estudo, o autor utiliza uma dose de OXL 4,5 vezes maior que a comumente encontrada na literatura e usada em nosso trabalho (2 mg/kg); entretanto, o



estudo realizado foi agudo, sendo a dose utilizada pelo autor incompatível para a realização de um estudo crônico. Baseado neste trabalho, foram escolhidas as doses de 7, 14 e 28 mg/kg para a realização do experimento com o análogo da OXL e, posteriormente, diante dos resultados obtidos nos experimentos de hiperalgesia mecânica, avaliada pelo Von Frey eletrônico, e alodínia térmica, pelo teste de imersão da cauda, durante 56 dias, foi escolhida a dose de 14 mg/kg, que mostrou ser a mais próxima da OXL em relação à neuropatia. Além disso, foi feita a administração do oxalato juntamente com o análogo e somente o oxalato. Fundamentado no trabalho de *Zhao et al.* (2012), foi escolhida a dose de 1,7 mg/kg, administrada via intraperitoneal, para o oxalato.

No presente estudo, foi observado que tanto a OXL quanto as três doses administradas do análogo LLC-1402 diminuíram o limiar de retirada da pata no teste Von Frey eletrônico, indicando que houve o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, inclusive no período posterior ao término das injeções. No teste de imersão da cauda, foi constatado que houve uma redução do tempo de retirada da cauda nos grupos tratados com OXL e LLC-1402, mostrando que houve o desenvolvimento de alodínia térmica nos camundongos. Além disso, nos grupos tratados com LLC-1402 juntamente com o oxalato e somente o oxalato, os testes nociceptivos mostraram que houve a manifestação tanto de hiperalgesia mecânica quanto alodínia térmica, sendo esse efeito mais intenso no grupo tratado com OXL.

Em um estudo de *Zhao et al.* (2012), foi demonstrado que a injeção intraperitoneal tanto de OXL quanto de oxalato provocou hipersensibilidade ao frio em camundongos. Além do mais, *Sakurai et al.* (2009) mostraram, através da injeção intraperitoneal de oxalato em ratos, que o oxalato pode estar envolvido na alodínia ao frio. Em outro trabalho de *Ueno et al.* (2014), em que foram produzidas nanopartículas micelares poliméricas incorporadas com 1,2-diaminociclo-hexano (NC-4016) isentas de oxalato, observou-se uma diminuição da alodínia ao frio em ratos tratados com NC-4016. Esses estudos corroboram com o que foi encontrado em nossos resultados, entretanto nossa pesquisa mostrou que o oxalato está envolvido parcialmente, pois tanto o análogo da OXL, livre de oxalato, quanto o oxalato provocaram alodínia térmica e hiperalgesia mecânica. Além disso, nos testes nociceptivos não houve diferença entre o grupo tratado com LLC-1402 e LLC-1402 juntamente com oxalato.

Na contagem total de leucócitos, realizada com 28 dias de experimento, observou-se que tanto a OXL quanto as três doses do LLC-1402 foram capazes de diminuir o número total de leucócitos, comparado ao grupo controle. Além do mais, nos grupos tratados com LLC-1402 juntamente com oxalato e somente o oxalato, foi mostrado que houve um

decréscimo na contagem total de leucócitos. Assim, os resultados mostraram que o oxalato pode ter participação no desenvolvimento da leucopenia. Sabe-se que a OXL tem toxicidade hematológica média, entretanto quando em monoterapia pode causar efeitos indesejáveis, como leucopenia, granulocitopenia, trombocitopenia e anemia; quando associada a 5-fluorouracil, há um aumento da toxicidade quanto à neutropenia e trombocitopenia (Bula Eloxatin, 2015).

As dosagens bioquímicas para marcadores de função hepática (TGO e TGP) e renal (ureia e creatinina) foram realizadas com 28 dias de experimento, depois da última injeção de OXL. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos que receberam OXL, LLC-1402 e oxalato e o grupo controle, tratado apenas com glicose 5%, tanto para os marcadores de função renal quanto para os marcadores de função hepática. Dados da literatura indicam que a OXL tem efeito nefrotóxico insignificante comparada aos compostos platinos de 1ª geração, cisplatina, e 2ª geração, carboplatina, em que esse efeito é considerado grave (ARGYRIOU *et al.*, 2008).

O tratamento com OXL pode levar ao aparecimento de distúrbios no fígado, que são considerados efeitos adversos muito raros, como a síndrome de obstrução hepática sinusoidal, possivelmente provocada pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e depleção de glutathione em células endoteliais sinusoidais, ocorrendo o aumento da apoptose nessas células e o dano hepático (MCWHIRTER *et al.*, 2013). Os regimes de tratamento do câncer colorretal baseado em OXL têm sido associados com o desenvolvimento de lesão do parênquima hepático, sob a forma de síndrome obstrutiva sinusoidal. Esta é caracterizada pela dilatação hepática sinusoidal, atrofia dos hepatócitos, fibrose peri-sinusoidal e hiperplasia nodular regenerativa. Estas alterações histológicas podem estar presentes em até 40% dos pacientes que foram submetidos à ressecção hepática e tratados com regimes baseados em OXL. O estresse oxidativo parece desempenhar um papel importante na patogênese de indução da síndrome obstrutiva sinusoidal pelo regime de tratamento FOLFOX (ROBINSON *et al.*, 2013).

No estudo, foi demonstrado um aumento da imunexpressão de c-Fos, marcador de ativação neuronal, no gânglio da raiz dorsal tanto no grupo tratado com OXL quanto nos grupos tratados com as três doses do análogo da OXL (LLC-1402), com 56 dias de experimento; já, no corno dorsal da medula espinhal, não houve aumento da imunexpressão de c-Fos em todos os grupos. No experimento de 56 dias o qual foi escolhida a dose de 14 mg/kg do LLC-1402 para a adição do oxalato, foi demonstrado também, no gânglio da raiz dorsal, um aumento da imunexpressão de c-Fos nos grupos tratados com OXL, LLC-1402 e

LLC-1402 juntamente com oxalato, havendo diferença da imunexpressão de c-Fos entre o grupo tratado com LLC-1402 junto com oxalato e OXL e entre o grupo tratado com LLC-1402 junto com oxalato e LLC1402; entretanto, no grupo tratado somente com oxalato, não houve esse aumento; no corno dorsal da medula espinhal, não houve aumento da imunexpressão de c-Fos em todos os grupos; já no experimento de 28 dias, observou-se um aumento da imunexpressão de c-Fos tanto no gânglio da raiz dorsal quanto no corno dorsal da medula espinhal nos grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 junto com oxalato e somente oxalato.

Fos é o produto proteico do gene precoce imediato c-fos, que é encontrado em núcleos neuronais. Na maioria dos neurônios, os níveis de Fos são baixos em condições basais, entretanto mudanças em insumos aferentes e/ou alterações nos estímulos externos podem induzir a expressão de c-fos, resultando em reprogramação fenotípica da célula. Desse modo, Fos é um marcador útil para rastrear os efeitos de estímulos farmacológicos, elétricos e fisiológicos no sistema nervoso e tem sido utilizado para indicar dor e neuroplasticidade (AZEVEDO *et al.*, 2013). Diante disso, a realização da imunofluorescência para c-fos, no corno dorsal da medula espinhal e gânglio da raiz dorsal, trouxeram resultados importantes para o estudo, como a indução do aumento da imunexpressão de c-Fos em neurônios pela OXL, LLC e oxalato, indicando ativação neuronal após estímulos nocivos; a expressão de c-Fos está relacionada à atividade neuronal e à intensidade da dor (TEIXEIRA, 2009). No estudo, observou-se que somente com 28 dias de experimento houve o aumento da expressão de c-fos no corno dorsal da medula espinhal, sendo esse aumento mais evidente no gânglio da raiz dorsal tanto com 28 dias quanto com 56 dias, onde já havia terminado as injeções. Observa-se que as alterações causadas pela OXL atinge principalmente o sistema nervoso periférico, devido à penetração da OXL no SNC ser limitada (JACOBS *et al.*, 2010).

Desse modo, por atingir principalmente o SNP, a OXL pode provocar alterações nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, levando à hiperresponsividade desses neurônios. Essa responsividade aumentada pode estimular a liberação de neurotransmissores, como o glutamato, em neurônios do corno dorsal da medula espinhal. A neurotoxicidade induz uma atividade neuronal excessiva e um aumento da liberação de glutamato. A estimulação nociceptiva repetitiva e os estados patológicos resultam em liberação de glutamato e pode levar a alterações no volume do espaço extracelular e arquitetura, aumentando a neurotoxicidade do glutamato e ocorrendo lesão neuronal (VARGOVÁ *et al.*, 2001).

No estudo, foi demonstrado um aumento da imunexpressão de ATF-3, marcador de injúria neuronal, com 56 dias de experimento, tanto no gânglio da raiz dorsal quanto no

cornos dorsais da medula espinhal, nos grupos tratados com OXL e LLC-1402, comparando com o grupo controle, havendo uma diferença da imunoeexpressão de ATF-3 entre o grupo tratado com LLC-1402 (14mg/kg) e OXL. No experimento o qual foi escolhida a dose de 14 mg/kg do LLC-1402 para a adição do oxalato, também foi observado um aumento da imunoeexpressão de ATF-3 tanto no gânglio da raiz dorsal quanto no corno dorsal da medula espinhal nos grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 juntamente com oxalato e somente oxalato, nos experimentos de 28 e 56 dias. Em um trabalho de Di Cesare Mannelli *et al.* (2015), foi mostrado que há um aumento da expressão de ATF-3, por imunohistoquímica, no nervo ciático e gânglios da raiz dorsal com 21 dias de tratamento com OXL em um modelo de neuropatia em ratos, corroborando com os resultados encontrados em nossa pesquisa, onde foi demonstrado que com 56 dias de experimento, há um aumento da imunoeexpressão de ATF-3 tanto nos gânglios da raiz dorsal quanto no corno dorsal da medula espinhal.

O fator de transcrição de ativação 3 (ATF-3), membro da família ATF/CREB (fatores de transcrição de ativação/proteína de ligação a elemento responsivo ao cAMP) de fatores de transcrição, é induzido em uma variedade de tecidos estressados. O ATF-3 regula a transcrição por ligação a locais do DNA com um homodímero ou heterodímero com proteínas Jun. O ATF-3 não é expresso no tecido intacto, mas sim no tecido exposto ao sinal de estresse. A indução do ATF-3 pode ser uma resposta celular comum a sinais de estresse, em que essa resposta não é específica de tecido nem de estresse específico. Além disso, o ATF-3 não é expresso de forma constitutiva em gânglios da raiz dorsal e medula espinhal, sendo induzido de forma considerável em neurônios submetidos à axotomia. Desse modo, o ATF-3 pode desempenhar papéis importantes na resposta ao estresse em geral, sendo induzido em neurônios sensoriais e motores da medula espinhal após a lesão do nervo e considerado um marcador de injúria neuronal (TSUJINO *et al.*, 2000).

No experimento de 56 dias, também foi realizada a imunofluorescência para iNOS, no entanto os resultados mostraram que não houve um aumento significativo da imunoeexpressão de iNOS, no gânglio da raiz dorsal nem no corno dorsal da medula espinhal, nos grupos tratados com OXL e LLC-1402, comparando com o grupo controle. Além do mais, no experimento o qual foi escolhida a dose de 14 mg/kg do LLC-1402 para a adição do oxalato, não houve um aumento considerável da imunoeexpressão de iNOS, tanto no gânglio da raiz dorsal quanto no corno dorsal da medula espinhal, nos grupos tratados com OXL, LLC-1402, LLC-1402 juntamente com oxalato e somente oxalato, no experimento de 56 dias; entretanto foi observado um aumento da imunoeexpressão de iNOS no gânglio da raiz no

experimento de 28 dias nos grupos tratados; esse aumento não foi observado no corno dorsal da medula espinhal.

Em um trabalho de Azevedo *et al.* (2013), foi demonstrado, através de imunohistoquímica, um aumento da expressão de iNOS no corno dorsal da medula espinhal com 14 dias de tratamento com a OXL, mostrando uma participação da iNOS nos estágios iniciais da neuropatia causada pela OXL. Esse aumento da expressão de iNOS na região do corno dorsal da medula espinhal foi inibido pelos flavonoides rutina e quercetina, conhecidos por terem ação antioxidante e anti-inflamatória, sendo possível que o efeito protetor desses flavonoides na neurotoxicidade da OXL seja, em parte, devido a esta ação. O estudo também correlaciona o aumento da expressão da iNOS com o da marcação por peroxinitrito no tecido neural, o que liga o aumento da iNOS com o aumento do estresse nitrosativo.

De acordo com Vareniuk, Pavlov e Obrosova (2008), a deficiência do gene da óxido nítrico sintase induzida neutraliza várias manifestações de neuropatia periférica, em um modelo de diabetes induzida por estreptozocina em ratos. Além disso, em condições de estresse oxidativo, há o aumento da iNOS. Em adição, o aumento da expressão da iNOS causa um aumento da produção de NO; que, por sua vez, é uma espécie altamente reativa e gera compostos que causam danos ao DNA celular, como é o caso do radical peroxinitrito. Em um estudo de Amrouni *et al.* (2010), foi revelada uma clara atividade da iNOS em neurônios de áreas cerebrais de ratos infectados com *Trypanosoma b. brucei*; evidenciando que, após um insulto neuronal, a expressão de iNOS aumenta no corpo celular dos neurônios.

Sabe-se que a OXL, quando injetada na corrente sanguínea de um organismo, sofre uma conversão não enzimática espontânea. O grupo oxalato é deslocado por nucleófilos fracos, como bicarbonato e di-hidrogenofosfato, para formar intermediários instáveis (SALTZ, 2002). A NSP provocada pela OXL é descrita por uma forma aguda e crônica, além de uma síndrome de dor, a qual não é ocasionada pelos outros compostos platinos. Os outros agentes platinos, como cisplatina e carboplatina liberam outros tipos de ligantes, diferentemente da OXL, que libera o oxalato (MESSORI; MARZO; MERLINO, 2015).

Assim, pesquisadores sugerem que o oxalato, por ser conhecido como um quelante de cálcio e magnésio, pode estar envolvido no mecanismo que ocasiona a neuropatia periférica provocada por OXL, através da depleção celular dos níveis de cálcio e magnésio e, conseqüentemente, alterando a cinética de alguns canais iônicos, como os canais de sódio dependentes de voltagem sensíveis ao cálcio (AVAN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2013). Além do mais, de acordo com Takeshita *et al.* (2011), estudos “in vitro” têm relatado um papel para os canais de sódio no aumento da excitabilidade neuronal, induzida por OXL, atribuída à

modulação dos canais de sódio dependentes de voltagem e à redução da amplitude das correntes de sódio dependente de voltagem através da quelação do cálcio intracelular mediada por oxalato.

Em um recente estudo de Park *et al.* (2015), foi mostrado que a acumulação de alumínio aumenta a neuropatia periférica induzida por OXL, através da ativação de TRPA1, e a indução da morte celular em gânglio da raiz dorsal. O oxalato quelar cátions metálicos como cálcio e magnésio. Em contraste, o alumínio é um elemento com elevado potencial de ionização em água que pode formar um precipitado preto insolúvel de oxalato de alumínio. Desse modo, é possível que o oxalato promova a acumulação de alumínio através da quelação e da inibição da excreção de alumínio. Os protocolos para a preparação da OXL antes da sua utilização clínica incluem uma precaução contra a utilização de instrumentos que contêm alumínio para administrar o fármaco, porque pode haver a degradação de compostos de platina.

As opções preventivas e/ou terapêuticas utilizadas na neuropatia periférica provocada por quimioterapia não são totalmente eficazes na redução dos sintomas. As principais opções utilizadas são analgésicos tópicos, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina, infusões de cálcio e magnésio, entre outras (PICCOLO; KOLESAR, 2014). Desse modo, supõe-se que infusões de cálcio e magnésio possam reabastecer os cátions bivalentes que são quelados pelo oxalato em neurônios sensoriais após a administração de OXL e, conseqüentemente, proporcionar uma proteção contra os efeitos neurotóxicos desse antineoplásico (SISIGNANO *et al.*, 2014). Estudos clínicos pequenos mostraram efeitos promissores das infusões de cálcio e magnésio; entretanto, mesmo existindo vários trabalhos que mostram que essas infusões podem reduzir as taxas de neuropatia, existem deficiências consideráveis na investigação desse efeito profilático, como uma falta de padronização no momento da avaliação da neurotoxicidade e avaliação inadequada dessa condição em longo prazo (KHATTAK, 2011).

Em um grande estudo de fase III, randomizado, controlado por placebo e duplo cego, com 353 pacientes com câncer de cólon submetidos à terapia adjuvante com FOLFOX, foi investigado o efeito da infusão de cálcio e magnésio na neurotoxicidade sensorial provocada por OXL, contudo os resultados obtidos não suportaram a continuação do uso da infusão, pois não houve uma melhora considerável dos sintomas da neuropatia nos pacientes do estudo (LOPRINZI *et al.*, 2014). Uma meta-análise de Wu *et al.* (2012), a qual foram avaliados sete estudos (quatro ensaios clínicos randomizados e três de coorte), incluindo um total de 1238 participantes, não suporta a hipótese de que a infusão de cálcio e magnésio

reduz a ocorrência de neurotoxicidade em pacientes com câncer colorretal tratados com OXL; no entanto, os resultados suportam a hipótese de que a administração desses cátions bivalentes não comprometem a eficácia da quimioterapia baseada em OXL, sendo necessário ensaios clínicos randomizados e controlados em larga escala para confirmar essas hipóteses. Em outra meta-análise de XU *et al.* (2013), envolvendo um total de 16 estudos, incluindo 1765 indivíduos, mostrou que o uso profilático de cálcio e magnésio reduziu a incidência de neuropatia causada por OXL, nos graus 1 e 2, mas não no grau 3. Essa meta-análise suporta a hipótese de que a infusão de cálcio e magnésio não altera a eficácia da quimioterapia baseada em OXL em câncer gastrointestinal, sendo necessários estudos randomizados e controlados para confirmar os resultados encontrados.

Diante dos nossos resultados, o oxalato pode ter participação parcial na neurotoxicidade induzida por OXL, pois tanto o análogo da OXL, livre de oxalato, quanto o oxalato administrado sozinho foram capazes de causar o desenvolvimento de hiperalgisia mecânica e alodínia térmica, além de aumentar a imunexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal e gânglios da raiz dorsal, indicando que houve injúria neuronal tanto em nível de sistema nervoso central quanto periférico. A hiperalgisia/alodínia, contudo, desenvolve-se mais tardiamente com o composto livre de oxalato, assim como, quando o oxalato é administrado sozinho, a intensidade de hiperalgisia/alodínia não é tão alta. De acordo com Farooq *et al.* (2014), a toxicidade do oxalato pode ser mediada através da geração de espécies reativas de oxigênio, por meio de um processo que é, em parte, dependente da disfunção mitocondrial. No presente trabalho, essa hipótese não foi investigada, entretanto é uma pergunta que será respondida com a continuação do estudo, que foi iniciada com a evidência do aumento da expressão de iNOS. Os estudos que indicam que a infusão de cálcio e magnésio não é eficaz contra a neurotoxicidade causada pela OXL sugerem que o oxalato não tem tanta influência nesse efeito, já que o cálcio e magnésio infundidos possivelmente quelariam o oxalato impedindo a sua interação com os tecidos. Entretanto, há que se questionar também se realmente essa reposição de cátions bivalentes chega ao local onde pode está ocorrendo o dano e, conseqüentemente, pode não suprir a diminuição de cálcio e magnésio, que são quelados pelo oxalato nos tecidos.

Assim, nossa contribuição para o estudo da fisiopatologia da neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina é o entendimento de que o oxalato contribui para o surgimento dessa neuropatia, mas não é fundamental. Provavelmente, o oxalato antecipa o seu surgimento, promovendo a cronificação e persistência do fenômeno de uma forma mais cedo. Possivelmente, o próprio mecanismo citotóxico antitumoral da OXL seja o principal

responsável pelo efeito neurotóxico, que acontece inicialmente a nível periférico e depois se estende para o nível central (o que é dependente do primeiro). Esse entendimento é importante para dar suporte a investigações mais avançadas que permitam uma terapia muito mais preventiva do que terapêutica.



## 8 CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados sugerem que o oxalato tem uma importância parcial na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos, pois:

- nos testes de hiperalgesia e alodínia, o análogo livre de oxalato mostrou um comportamento diferente da oxaliplatina, com o início dos sintomas ocorrendo período posterior;
- a expressão de c-fos no gânglio da raiz dorsal e corno dorsal da medula espinhal foi menor nos grupos tratados com o análogo livre de oxalato;
- não houve diferença na expressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal e corno dorsal da medula espinhal entre os grupos tratados com o análogo livre de oxalato e a oxaliplatina;
- a expressão de iNOS no gânglio da raiz dorsal foi menor nos grupos tratados com o análogo livre de oxalato.

Os efeitos hepáticos e renais não são influenciados pela presença do oxalato nem a contagem total de leucócitos no sangue, sendo semelhantes aos efeitos da oxaliplatina.

## REFERÊNCIAS

- ALEJANDRO, L. M. *et al.* Predicting acute and persistent neuropathy associated with oxaliplatin. **American journal of clinical oncology**, v. 36, n. 4, p. 331–7, ago. 2013.
- AMROUNI, D. *et al.* Cerebral and peripheral changes occurring in nitric oxide (NO) synthesis in a rat model of sleeping sickness: identification of brain iNOS expressing cells. **PLoS One**, v. 5, 2010.
- AMPTOULACH, S.; TSAVARIS, N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. **Chemotherapy research and practice**, v. 2011, p. 1–5, jan. 2011.
- ANDRÉ, T. *et al.* Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 23, p. 2343-2351, 2004.
- ARGYRIOU, A. A. *et al.* A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, n. 4, p. 368-377, 2008.
- AUTHIER, N. *et al.* Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 4, p. 620-629, 2009.
- AVAN, A. *et al.* Platinum-Induced Neurotoxicity and Preventive Strategies : Past , Present , and Future. **The Oncologist**, v. 20, p. 411–432, 2015.
- AZEVEDO, M. I. *et al.* The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular pain**, v. 9, n. 1, p. 53, 2013.
- BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet Neurol**, v. 9, p. 807-819, 2010.
- BITTENCOURT, H. N. S.; BRUNSTEIN, C. G. Fármacos antineoplásicos. *In*: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- BOYETTE-DAVIS, J.; DOUGHERTY, P. M. Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline. **Experimental Neurology**, v. 229, p. 353-357, 2011.
- BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 8, p. 131-146, 2005.
- BURZ, C. *et al.* Clinical and pharmacokinetics study of oxaliplatin in colon cancer patients. **J. Gastrointestin. Liver Dis.**, v. 18, n.1, p. 39-43, 2008.
- CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, v. 596, p. 90–107, 2015.

- CHEN, K. *et al.* Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 352, n. 1-2, p. 62–67, 2015.
- CHIDLOW, G. *et al.* Evaluation of Fluoro-Jade C as a marker of degenerating neurons in the rat retina and optic nerve. **Experimental eye research**, v. 88, n. 3, p. 426–37, mar. 2009.
- CHU, E. Oxaliplatin: The new member of the class. *In*: MARSHALL, J. The Clinical Use of Oxaliplatin: case studies and roundtable discussion. **Oncology**, v. 1, 2004.
- COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000
- CUNHA, T. M. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.
- DE GRAMONT, A. *et al.* Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **Journal Clinical of Oncology**, v. 18, p. 2938-2947, 2000.
- DI CESARE MANNELLI, L. *et al.* Antineuropathic Profile of N-Palmitoylethanolamine in a Rat Model of Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0128080, 2015.
- DIERAS, V. *et al.* Multicentre phase II study of oxaliplatin as a single-agent in cisplatin/ carboplatin ± taxane-pretreated ovarian cancer patients. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 258-266, 2002.
- ELOXATIN: solução injetável. Responsável técnico Silvia Regina Brollo. São Paulo, SP: Sanofi-Aventis, 2015. Bula de remédio.
- FAROOQ, S. M. *et al.* C-phycoyanin confers protection against oxalate-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in MDCK cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- FLOETER-WINTER, L. M. *et al.* IV Curso de Inverno: **Tópicos em Fisiologia Comparativa**. Universidade de São Paulo (USP), 2007.
- FOLTINOVÁ, V. *et al.* Mechanisms of effects of platinum (II) and (IV) complexes. Comparison of cisplatin and oxaliplatin with saraplatin and LA-12, new Pt (IV)-based drugs. A minireview. **Scripta Med. (BRNO)**, v. 81, n. 2, p. 105-116, 2008.
- GAUCHAN, P. *et al.* Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. **Neuroscience Letters**, v. 458, n. 2, p. 93–95, 2009.
- GOLDBERG, R. M. *et al.* A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 22, n. 1, p. 23–30, 1 jan. 2004.

GROTHEY, A. Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. **Seminars in Oncology**, v. 30, p. 5-13, 2003.

GROTHEY, A. Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. **Clin. Colorectal Cancer**, v. 5, p. 38-46, 2005.

HALD, A. *et al.* Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 2, p. 138-145, 2009.

HANANI, M. Satellite glial cells: more than just “rings around the neuron”. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2010.

HURWITZ, H. I. New agents in colon cancer. **Clinical advances in hematology & oncology : H&O**, v. 1, n. 7, p. 404-5, jul. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **O que é câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>> Acesso em: 8 jun. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2014**: incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

JAGGI, A. S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**, v. 291, p. 1-9, 2012.

JACOBS, S. *et al.* Extracellular fluid concentrations of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in brain, muscle, and blood measured using microdialysis in nonhuman primates. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 817-24, abr. 2010.

JERREMALM, E.; WALLIN, I.; EHRSSON, H. New insights into the biotransformation and pharmacokinetics of oxaliplatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 3879-3885, 2009.

Jl, R. R.; SUTER, M. R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 3, p. 1-9, 2007.

Jl, X. *et al.* Spinal Astrocytic Activation Contributes to Mechanical Allodynia in a Rat Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain Model. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1-12, 2013.

JOSEPH, E. K. *et al.* Oxaliplatin Acts on IB4-Positive Nociceptors to Induce an Oxidative Stress-Dependent Acute Painful Peripheral Neuropathy. **The Journal of Pain**, v. 9, p. 463-472, 2008.

JOSEPH, E. K.; LEVINE, J. D. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 10, n. 5, p. 534-41, maio 2009.

JOSHI, S.; PECK, A. B.; KHAN, S. R. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Oxalate Induced Injury in Kidneys. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 18 p., 2013.

- JUNG, D. H. *et al.* Involvement of ATF3 in the negative regulation of iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Immunologic research**, v. 62, n. 1, p. 35–45, maio 2015.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2000.
- KALEY, T. J.; DEANGELIS, L. M. *Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. **British Journal of Haematology**, v. 145, p. 3-14, 2009.
- KAWASHIRI, T. *et al.* L type Ca<sup>2+</sup> channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. **Molecular Pain**, v. 8, n. 1, p. 7, 2012.
- KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 573-584, 2007.
- KELLEY, M. R. *et al.* Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106485, 2014.
- KHATTAK, M. A. Calcium and Magnesium Prophylaxis for Oxaliplatin-Related Neurotoxicity: Is It a Trade-off Between Drug Efficacy and Toxicity? **Oncologist**, v. 16, p. 1780-1783, 2011.
- LENZ, G. **Efeito da lesão com ácido caínico sobre a fosforilação e o imuno conteúdo da proteína glial fibrilar ácida em hipocampo de ratos**. 1996. p. 74. Dissertação (Pós-graduação em bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.
- LEVI, F. *et al.* Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 38, p. 1-21, 2000.
- LING, B. *et al.* Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. **Pain**, v. 128 (3), p. 225-234, 2007a.
- LINO, J. A. **Efeito protetor da amifostina na neuropatia sensitiva periférica experimental induzida por oxaliplatina**. 2011. p. 26. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- LIU, J. J. *et al.* Neuronal expression of copper transporter 1 in rat dorsal root ganglia: Association with platinum neurotoxicity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 847–856, 2009.
- LIU, W. *et al.* cis-[PtII (1R,2R-DACH)(3-acetoxy-1,1-cyclobutanedicarboxylato)], a Water-Soluble, Oxalate-Free and Stable Analogue of Oxaliplatin: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluations. **Chem. Med. Chem.**, 2013.
- LOPRINZI, C. L. *et al.* Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of intravenous calcium and magnesium to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity (N08CB/Alliance). **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 10, p. 997–1005, 2014.
- LOUVET, C. Phase II study of oxaliplatin, fluorouracil and folic acid in locally advanced or metastatic gastric cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, p. 4543-4548, 2002.

MCWHINNEY, S. R.; GOLDBERG, R. M.; MCLEOD, H. L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, p. 10-16, 2009.

MCWHIRTER, D. *et al.* Chemotherapy induced hepatotoxicity in metastatic colorectal cancer: A review of mechanisms and outcomes. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 2, p. 404–415, 2013.

MESSORI, L.; MARZO, T.; MERLINO, A. Interactions of Carboplatin and Oxaliplatin with Proteins: Insights from X-ray structures and mass spectrometry studies of their Ribonuclease A adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 15, 21 jul. 2015.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 23-36, 2009.

MOLS, F. *et al.* Chemotherapy-induced neuropathy and its association with quality of life among 2- to 11-year colorectal cancer survivors: results from the population-based PROFILES registry. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 21, p. 2699–707, 20 jul. 2013.

NAKAGAWA, T.; KANEKO, S. Spinal Astrocytes as Therapeutic Targets for Pathological Pain. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 114, p. 347-353, 2010.

OHARA, P. T. *et al.* Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. **Neuroscientist**, v. 15, p. 450-463, 2009.

PAICE, J. A. Clinical Challenges: Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 25, p. 8-19, 2009.

PARK, S. B. *et al.* Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3081-3094, 2008.

PARK, S. B. *et al.* Oxaliplatin-induced neurotoxicity: changes in axonal excitability precede development of neuropathy. **Brain**, v. 132, n. 10, p. 2712-2723, 2009.

PARK, S. B. *et al.* Neuroprotection for oxaliplatin-induced neurotoxicity: What happened to objective assessment? **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 18, p. 16–17, 2011.

PARK, J.-H. *et al.* Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy via TRPA1 Stimulation in Mice Dorsal Root Ganglion Is Correlated with Aluminum Accumulation. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0124875, jan. 2015.

PELTIER, A. C.; RUSSEL, J. W. Recent advances in drug-induced neuropathies. **Curr Opin Neurol**, v. 15, n. 5, p. 633-630, 2002.

PETIT, T. *et al.* Phase II study of an oxaliplatin/vinorelbine combination in patients with anthracycline and taxane-treated metastatic breast cancer. **Anticancer Drugs**, v. 17, p. 337-343, 2006.

PICCOLO, J.; KOLESAR, J. M. Prevention and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists**, v. 71, n. 1, p. 19–25, 2014.

PIKE, C. T. *et al.* Healthcare Costs and Workloss Burden of Patients with Chemotherapy-Associated Peripheral Neuropathy in Breast, Ovarian, Head and Neck, and Nonsmall Cell Lung Cancer. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

ROBINSON, S. M. *et al.* Pathogenesis of FOLFOX induced sinusoidal obstruction syndrome in a murine chemotherapy model. **Journal of hepatology**, v. 59, n. 2, p. 318–26, ago. 2013.

RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. 4<sup>a</sup> ed. New York, Oxford University Press, 2007.

SAIF, M. W.; REARDON, J. Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 1, p. 249-258, 2005.

SAKURAI, M. *et al.* Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. **Pain**, v. 147, p. 165-174, 2009.

SALTZ, Leonard B. **Colorectal Cancer- Multimodality Management**. 1. ed. Humana Press, 2002. 530 p.

SCHIFF, D.; WEN, P. Y.; VAN DEN BENT, M. J. Neurological adverse effects caused by cytotoxic and targeted therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, p. 596- 603, 2009.

SCUTERI, A. *et al.* NGF protects Dorsal Root Ganglion neurons from oxaliplatin by modulating JNK/Sapk and ERK1/2. **Neuroscience Letters**, v. 486, n. 3, p. 141–145, 2010.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2006.

SISIGNANO, M. *et al.* Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 12, p. 694–707, 2014.

STILLMAN, M.; CATA, J. P. Management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Curr. Pain Headache Rep.**, v. 10, p. 279-287, 2006.

TA, L. E. *et al.* Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 6, p. 992–1002, 2006.

TEIXEIRA, M. J. **Dor: Princípios e Prática**. São Paulo-SP: Artmed Editora, 2009. 165 p.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 4 fev. 2015.

TSUJINO, H. *et al.* Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 15, n. 2, p. 170–182, 2000.

TSUTSUMI, K. *et al.* Oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve. **Neuroscience Research**, v. 80, p. 86–90, 2014.

UENO, T. *et al.* Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016). **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3005–3012, 2014.

VAN CUTSEM, E.; VERSLYPE, C.; DEMEDTS, I. The treatment of advanced colorectal cancer: where are we now and where do we go? **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 16, n. 2, p. 319–30, abr. 2002.

VARENIUK, I.; PAVLOV, I. A.; OBROSOVA, I. G. Inducible nitric oxide synthase gene deficiency counteracts multiple manifestations of peripheral neuropathy in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 2126-2133, 2008.

VARGOVÁ, L. *et al.* Glutamate, NMDA, and AMPA induced changes in extracellular space volume and tortuosity in the rat spinal cord. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 9, p. 1077–89, set. 2001.

WARWICK, R. A.; HANANI, M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 17, n. 4, p. 571–580, 2013.

WEICKHARDT, A.; WELLS, K.; MESSERSMITH, W. Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer. **Journal of Oncology**, p. 1-7, 2011.

WU, Z. *et al.* Infusion of calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 48, n. 12, p. 1791–8, ago. 2012.

XU, X. T. *et al.* Safety and efficacy of calcium and magnesium infusions in the chemoprevention of oxaliplatin-induced sensory neuropathy in gastrointestinal cancers. **Journal of digestive diseases**, v. 14, n. 6, p. 288–98, jun. 2013.

YOON, S. *et al.* Spinal Astrocyte Gap Junctions Contribute to Oxaliplatin-Induced Mechanical Hypersensitivity. **The Journal of Pain**, v. 14, p. 205-214, 2013.

ZHAO, M. *et al.* Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. **Molecular Pain**, v. 8, n. 1, p. 55, 2012.

ZHENG, H.; XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. **Experimental Neurology**, v. 232, n. 2, p. 154–161, 2011.



## APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 1

Table Analyzed	Cinética					
Two-way RM ANOVA	Matching by cols					
Source of Variation	% of total variation	P value				
Interaction	17.69	P<0.0001				
Dias	31.92	P<0.0001				
Droga	32.84	P<0.0001				
Subjects (matching)	3.4544	P<0.0001				
Source of Variation	P value summary	Significant?				
Interaction	***	Yes				
Dias	***	Yes				
Droga	***	Yes				
Subjects (matching)	***	Yes				
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F		
Interaction	32	131.0	4.093	11.88		
Dias	8	236.3	29.54	85.75		
Droga	4	243.1	60.77	61.79		
Subjects (matching)	26	25.57	0.9835	2.855		
Residual	208	71.65	0.3445			
Number of missing values	0					
Bonferroni posttests						
Veículo vs OXL						
Droga	Veículo	OXL	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.18	10.90	-0.2786	-1.600 to 1.043	P > 0.05	ns
7.000	10.88	11.28	0.3950	-0.9263 to 1.716	P > 0.05	ns
14.00	11.14	9.657	-1.483	-2.804 to -0.1616	P<0.01	**
21.00	11.02	8.179	-2.836	-4.158 to -1.515	P<0.001	***
28.00	10.95	6.768	-4.182	-5.503 to -2.861	P<0.001	***
35.00	10.20	5.504	-4.691	-6.013 to -3.370	P<0.001	***
42.00	10.89	6.261	-4.629	-5.951 to -3.308	P<0.001	***
49.00	10.91	6.914	-3.991	-5.312 to -2.669	P<0.001	***
56.00	11.31	6.871	-4.439	-5.760 to -3.117	P<0.001	***
Veículo vs LLC 7 mg/kg						
Droga	Veículo	LLC 7 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.18	11.13	-0.05000	-1.416 to 1.316	P > 0.05	ns
7.000	10.88	10.67	-0.2133	-1.580 to 1.153	P > 0.05	ns
14.00	11.14	10.65	-0.4942	-1.861 to 0.8722	P > 0.05	ns
21.00	11.02	10.13	-0.8858	-2.252 to 0.4805	P > 0.05	ns
28.00	10.95	9.733	-1.217	-2.583 to 0.1497	P < 0.05	*
35.00	10.20	9.650	-0.5450	-1.911 to 0.8214	P > 0.05	ns
42.00	10.89	9.400	-1.490	-2.856 to -0.1236	P<0.01	**
49.00	10.91	9.096	-1.809	-3.176 to -0.4428	P<0.001	***
56.00	11.31	8.804	-2.506	-3.872 to -1.139	P<0.001	***

Veículo vs LLC 14 mg/kg						
Droga	Veículo	LLC 14 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.18	10.98	-0.1917	-1.558 to 1.175	P > 0.05	ns
7.000	10.88	10.74	-0.1425	-1.509 to 1.224	P > 0.05	ns
14.00	11.14	10.03	-1.111	-2.477 to 0.2555	P < 0.05	*
21.00	11.02	9.838	-1.178	-2.544 to 0.1889	P < 0.05	*
28.00	10.95	9.808	-1.142	-2.508 to 0.2247	P < 0.05	*
35.00	10.20	8.592	-1.603	-2.970 to -0.2370	P<0.001	***
42.00	10.89	8.033	-2.857	-4.223 to -1.490	P<0.001	***
49.00	10.91	7.471	-3.434	-4.801 to -2.068	P<0.001	***
56.00	11.31	8.321	-2.989	-4.356 to -1.623	P<0.001	***
Veículo vs LLC 28 mg/kg						
Droga	Veículo	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.18	10.90	-0.2786	-1.600 to 1.043	P > 0.05	ns
7.000	10.88	10.86	-0.01928	-1.341 to 1.302	P > 0.05	ns
14.00	11.14	10.40	-0.7400	-2.061 to 0.5813	P > 0.05	ns
21.00	11.02	10.14	-0.8793	-2.201 to 0.4420	P > 0.05	ns
28.00	10.95	9.907	-1.043	-2.364 to 0.2784	P > 0.05	ns
35.00	10.20	9.307	-0.8879	-2.209 to 0.4334	P > 0.05	ns
42.00	10.89	8.821	-2.069	-3.390 to -0.7473	P<0.001	***
49.00	10.91	8.557	-2.348	-3.669 to -1.027	P<0.001	***
56.00	11.31	8.736	-2.574	-3.896 to -1.253	P<0.001	***
OXL vs LLC 7 mg/kg						
Droga	OXL	LLC 7 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	10.90	11.13	0.2286	-1.027 to 1.484	P > 0.05	ns
7.000	11.28	10.67	-0.6083	-1.864 to 0.6471	P > 0.05	ns
14.00	9.657	10.65	0.9887	-0.2667 to 2.244	P > 0.05	ns
21.00	8.179	10.13	1.951	0.6952 to 3.206	P<0.001	***
28.00	6.768	9.733	2.965	1.710 to 4.221	P<0.001	***
35.00	5.504	9.650	4.146	2.891 to 5.402	P<0.001	***
42.00	6.261	9.400	3.139	1.884 to 4.395	P<0.001	***
49.00	6.914	9.096	2.182	0.9262 to 3.437	P<0.001	***
56.00	6.871	8.804	1.933	0.6773 to 3.188	P<0.001	***
OXL vs LLC 14 mg/kg						
Droga	OXL	LLC 14 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	10.90	10.98	0.08691	-1.168 to 1.342	P > 0.05	ns
7.000	11.28	10.74	-0.5375	-1.793 to 0.7179	P > 0.05	ns
14.00	9.657	10.03	0.3720	-0.8834 to 1.627	P > 0.05	ns
21.00	8.179	9.838	1.659	0.4035 to 2.914	P<0.001	***
28.00	6.768	9.808	3.040	1.785 to 4.296	P<0.001	***
35.00	5.504	8.592	3.088	1.833 to 4.343	P<0.001	***
42.00	6.261	8.033	1.773	0.5172 to 3.028	P<0.001	***
49.00	6.914	7.471	0.5565	-0.6988 to 1.812	P > 0.05	ns
56.00	6.871	8.321	1.449	0.1940 to 2.705	P<0.001	***
OXL vs LLC 28 mg/kg						
Droga	OXL	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	10.90	10.90	0.0000	-1.206 to 1.206	P > 0.05	ns
7.000	11.28	10.86	-0.4143	-1.620 to 0.7919	P > 0.05	ns
14.00	9.657	10.40	0.7429	-0.4633 to 1.949	P > 0.05	ns
21.00	8.179	10.14	1.957	0.7510 to 3.163	P<0.001	***
28.00	6.768	9.907	3.139	1.933 to 4.345	P<0.001	***
35.00	5.504	9.307	3.804	2.597 to 5.010	P<0.001	***
42.00	6.261	8.821	2.561	1.355 to 3.767	P<0.001	***
49.00	6.914	8.557	1.643	0.4367 to 2.849	P<0.001	***
56.00	6.871	8.736	1.864	0.6581 to 3.070	P<0.001	***

LLC 7 mg/kg vs LLC 14 mg/kg						
Droga	LLC 7 mg/kg	LLC 14 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.13	10.98	-0.1417	-1.444 to 1.161	P > 0.05	ns
7.000	10.67	10.74	0.07083	-1.232 to 1.374	P > 0.05	ns
14.00	10.65	10.03	-0.6167	-1.919 to 0.6861	P > 0.05	ns
21.00	10.13	9.838	-0.2917	-1.594 to 1.011	P > 0.05	ns
28.00	9.733	9.808	0.07500	-1.228 to 1.378	P > 0.05	ns
35.00	9.650	8.592	-1.058	-2.361 to 0.2444	P < 0.05	*
42.00	9.400	8.033	-1.367	-2.669 to -0.06389	P < 0.01	**
49.00	9.096	7.471	-1.625	-2.928 to -0.3222	P < 0.001	***
56.00	8.804	8.321	-0.4833	-1.786 to 0.8194	P > 0.05	ns
LLC 7 mg/kg vs LLC 28 mg/kg						
Droga	LLC 7 mg/kg	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.13	10.90	-0.2286	-1.484 to 1.027	P > 0.05	ns
7.000	10.67	10.86	0.1940	-1.061 to 1.449	P > 0.05	ns
14.00	10.65	10.40	-0.2458	-1.501 to 1.010	P > 0.05	ns
21.00	10.13	10.14	0.006548	-1.249 to 1.262	P > 0.05	ns
28.00	9.733	9.907	0.1738	-1.082 to 1.429	P > 0.05	ns
35.00	9.650	9.307	-0.3429	-1.598 to 0.9125	P > 0.05	ns
42.00	9.400	8.821	-0.5786	-1.834 to 0.6768	P > 0.05	ns
49.00	9.096	8.557	-0.5387	-1.794 to 0.7167	P > 0.05	ns
56.00	8.804	8.736	-0.06845	-1.324 to 1.187	P > 0.05	ns
LLC 14 mg/kg vs LLC 28 mg/kg						
Droga	LLC 14 mg/kg	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	10.98	10.90	-0.08691	-1.342 to 1.168	P > 0.05	ns
7.000	10.74	10.86	0.1232	-1.132 to 1.379	P > 0.05	ns
14.00	10.03	10.40	0.3708	-0.8846 to 1.626	P > 0.05	ns
21.00	9.838	10.14	0.2982	-0.9572 to 1.554	P > 0.05	ns
28.00	9.808	9.907	0.09881	-1.157 to 1.354	P > 0.05	ns
35.00	8.592	9.307	0.7155	-0.5399 to 1.971	P > 0.05	ns
42.00	8.033	8.821	0.7881	-0.4673 to 2.043	P > 0.05	ns
49.00	7.471	8.557	1.086	-0.1691 to 2.342	P < 0.05	*
56.00	8.321	8.736	0.4149	-0.8405 to 1.670	P > 0.05	ns

Fonte: GraphPad Prism 5.0.

## APÊNDICE B – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 2

Table Analyzed	Cinética					
Two-way RM ANOVA	Matching by cols					
Source of Variation	% of total variation	P value				
Interaction	8.63	0.0039				
Dias	36.17	P<0.0001				
Droga	15.43	P<0.0001				
Subjects (matching)	7.6044	0.0027				
Source of Variation	P value summary	Significant?				
Interaction	**	Yes				
Dias	***	Yes				
Droga	***	Yes				
Subjects (matching)	**	Yes				
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F		
Interaction	32	17610	550.5	1.908		
Dias	8	73790	9224	31.98		
Droga	4	31480	7869	13.19		
Subjects (matching)	26	15510	596.7	2.068		
Residual	208	60000	288.5			
Number of missing values	0					
Bonferroni posttests						
Veículo vs OXL						
Droga	Veículo	OXL	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	94.00	89.86	-4.143	-40.97 to 32.68	P > 0.05	ns
7.000	96.60	81.71	-14.89	-51.71 to 21.94	P > 0.05	ns
14.00	92.60	73.00	-19.60	-56.42 to 17.22	P > 0.05	ns
21.00	73.20	35.43	-37.77	-74.59 to -0.9481	P<0.01	**
28.00	79.20	32.43	-46.77	-83.59 to -9.948	P<0.001	***
35.00	87.20	30.43	-56.77	-93.59 to -19.95	P<0.001	***
42.00	76.60	31.14	-45.46	-82.28 to -8.634	P<0.001	***
49.00	81.20	38.14	-43.06	-79.88 to -6.234	P<0.001	***
56.00	74.80	41.86	-32.94	-69.77 to 3.880	P < 0.05	*
Veículo vs LLC 7 mg/kg						
Droga	Veículo	LLC 7 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	94.00	92.33	-1.667	-39.75 to 36.41	P > 0.05	ns
7.000	96.60	98.67	2.067	-36.01 to 40.15	P > 0.05	ns
14.00	92.60	80.83	-11.77	-49.85 to 26.31	P > 0.05	ns
21.00	73.20	82.83	9.633	-28.45 to 47.71	P > 0.05	ns
28.00	79.20	65.00	-14.20	-52.28 to 23.88	P > 0.05	ns
35.00	87.20	51.83	-35.37	-73.45 to 2.714	P < 0.05	*
42.00	76.60	52.83	-23.77	-61.85 to 14.31	P > 0.05	ns
49.00	81.20	50.83	-30.37	-68.45 to 7.714	P > 0.05	ns
56.00	74.80	38.67	-36.13	-74.21 to 1.947	P<0.01	**

Veículo vs LLC 14 mg/kg						
Droga	Veículo	LLC 14 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	94.00	84.50	-9.500	-47.58 to 28.58	P > 0.05	ns
7.000	96.60	91.83	-4.767	-42.85 to 33.31	P > 0.05	ns
14.00	92.60	78.33	-14.27	-52.35 to 23.81	P > 0.05	ns
21.00	73.20	69.33	-3.867	-41.95 to 34.21	P > 0.05	ns
28.00	79.20	74.50	-4.700	-42.78 to 33.38	P > 0.05	ns
35.00	87.20	43.33	-43.87	-81.95 to -5.786	P<0.001	***
42.00	76.60	36.00	-40.60	-78.68 to -2.520	P<0.01	**
49.00	81.20	49.50	-31.70	-69.78 to 6.380	P < 0.05	*
56.00	74.80	40.50	-34.30	-72.38 to 3.780	P < 0.05	*
Veículo vs LLC 28 mg/kg						
Droga	Veículo	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	94.00	97.00	3.000	-33.82 to 39.82	P > 0.05	ns
7.000	96.60	95.57	-1.029	-37.85 to 35.79	P > 0.05	ns
14.00	92.60	81.57	-11.03	-47.85 to 25.79	P > 0.05	ns
21.00	73.20	71.14	-2.057	-38.88 to 34.77	P > 0.05	ns
28.00	79.20	74.00	-5.200	-42.02 to 31.62	P > 0.05	ns
35.00	87.20	53.71	-33.49	-70.31 to 3.338	P < 0.05	*
42.00	76.60	49.00	-27.60	-64.42 to 9.223	P > 0.05	ns
49.00	81.20	50.86	-30.34	-67.17 to 6.481	P < 0.05	*
56.00	74.80	57.86	-16.94	-53.77 to 19.88	P > 0.05	ns
OXL vs LLC 7 mg/kg						
Droga	OXL	LLC 7 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	89.86	92.33	2.476	-32.51 to 37.46	P > 0.05	ns
7.000	81.71	98.67	16.95	-18.04 to 51.94	P > 0.05	ns
14.00	73.00	80.83	7.833	-27.15 to 42.82	P > 0.05	ns
21.00	35.43	82.83	47.40	12.42 to 82.39	P<0.001	***
28.00	32.43	65.00	32.57	-2.416 to 67.56	P < 0.05	*
35.00	30.43	51.83	21.40	-13.58 to 56.39	P > 0.05	ns
42.00	31.14	52.83	21.69	-13.30 to 56.68	P > 0.05	ns
49.00	38.14	50.83	12.69	-22.30 to 47.68	P > 0.05	ns
56.00	41.86	38.67	-3.190	-38.18 to 31.80	P > 0.05	ns
OXL vs LLC 14 mg/kg						
Droga	OXL	LLC 14 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	89.86	84.50	-5.357	-40.34 to 29.63	P > 0.05	ns
7.000	81.71	91.83	10.12	-24.87 to 45.11	P > 0.05	ns
14.00	73.00	78.33	5.333	-29.65 to 40.32	P > 0.05	ns
21.00	35.43	69.33	33.90	-1.083 to 68.89	P<0.01	**
28.00	32.43	74.50	42.07	7.084 to 77.06	P<0.001	***
35.00	30.43	43.33	12.90	-22.08 to 47.89	P > 0.05	ns
42.00	31.14	36.00	4.857	-30.13 to 39.84	P > 0.05	ns
49.00	38.14	49.50	11.36	-23.63 to 46.34	P > 0.05	ns
56.00	41.86	40.50	-1.357	-36.34 to 33.63	P > 0.05	ns
OXL vs LLC 28 mg/kg						
Droga	OXL	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	89.86	97.00	7.143	-26.47 to 40.76	P > 0.05	ns
7.000	81.71	95.57	13.86	-19.76 to 47.47	P > 0.05	ns
14.00	73.00	81.57	8.571	-25.04 to 42.19	P > 0.05	ns
21.00	35.43	71.14	35.71	2.099 to 69.33	P<0.01	**
28.00	32.43	74.00	41.57	7.956 to 75.19	P<0.001	***
35.00	30.43	53.71	23.29	-10.33 to 56.90	P > 0.05	ns
42.00	31.14	49.00	17.86	-15.76 to 51.47	P > 0.05	ns
49.00	38.14	50.86	12.71	-20.90 to 46.33	P > 0.05	ns
56.00	41.86	57.86	16.00	-17.61 to 49.61	P > 0.05	ns

LLC 7 mg/kg vs LLC 14 mg/kg						
Droga	LLC 7 mg/kg	LLC 14 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	92.33	84.50	-7.833	-44.14 to 28.47	P > 0.05	ns
7.000	98.67	91.83	-6.833	-43.14 to 29.47	P > 0.05	ns
14.00	80.83	78.33	-2.500	-38.81 to 33.81	P > 0.05	ns
21.00	82.83	69.33	-13.50	-49.81 to 22.81	P > 0.05	ns
28.00	65.00	74.50	9.500	-26.81 to 45.81	P > 0.05	ns
35.00	51.83	43.33	-8.500	-44.81 to 27.81	P > 0.05	ns
42.00	52.83	36.00	-16.83	-53.14 to 19.47	P > 0.05	ns
49.00	50.83	49.50	-1.333	-37.64 to 34.97	P > 0.05	ns
56.00	38.67	40.50	1.833	-34.47 to 38.14	P > 0.05	ns
LLC 7 mg/kg vs LLC 28 mg/kg						
Droga	LLC 7 mg/kg	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	92.33	97.00	4.667	-30.32 to 39.65	P > 0.05	ns
7.000	98.67	95.57	-3.095	-38.08 to 31.89	P > 0.05	ns
14.00	80.83	81.57	0.7381	-34.25 to 35.73	P > 0.05	ns
21.00	82.83	71.14	-11.69	-46.68 to 23.30	P > 0.05	ns
28.00	65.00	74.00	9.000	-25.99 to 43.99	P > 0.05	ns
35.00	51.83	53.71	1.881	-33.11 to 36.87	P > 0.05	ns
42.00	52.83	49.00	-3.833	-38.82 to 31.15	P > 0.05	ns
49.00	50.83	50.86	0.02381	-34.96 to 35.01	P > 0.05	ns
56.00	38.67	57.86	19.19	-15.80 to 54.18	P > 0.05	ns
LLC 14 mg/kg vs LLC 28 mg/kg						
Droga	LLC 14 mg/kg	LLC 28 mg/kg	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	84.50	97.00	12.50	-22.49 to 47.49	P > 0.05	ns
7.000	91.83	95.57	3.738	-31.25 to 38.73	P > 0.05	ns
14.00	78.33	81.57	3.238	-31.75 to 38.23	P > 0.05	ns
21.00	69.33	71.14	1.810	-33.18 to 36.80	P > 0.05	ns
28.00	74.50	74.00	-0.5000	-35.49 to 34.49	P > 0.05	ns
35.00	43.33	53.71	10.38	-24.61 to 45.37	P > 0.05	ns
42.00	36.00	49.00	13.00	-21.99 to 47.99	P > 0.05	ns
49.00	49.50	50.86	1.357	-33.63 to 36.34	P > 0.05	ns
56.00	40.50	57.86	17.36	-17.63 to 52.34	P > 0.05	ns

Fonte: GraphPad Prism 5.0.

### APÊNDICE C – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 3

Table Analyzed	cinetica					
Two-way RM ANOVA	Matching by cols					
Source of Variation	% of total variation	P value				
Interaction	11.43	P<0.0001				
Dias	34.91	P<0.0001				
Droga	34.37	P<0.0001				
Subjects (matching)	5.2741	P<0.0001				
Source of Variation	P value summary	Significant?				
Interaction	***	Yes				
Dias	***	Yes				
Droga	***	Yes				
Subjects (matching)	***	Yes				
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F		
Interaction	32	85.87	2.684	4.838		
Dias	8	262.3	32.79	59.12		
Droga	4	258.2	64.56	37.47		
Subjects (matching)	23	39.63	1.723	3.107		
Residual	184	102.1	0.5546			
Number of missing values	0					
Bonferroni posttests						
Veículo vs OXL						
Droga	Veículo	OXL	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.54	11.27	-0.2650	-2.100 to 1.570	P > 0.05	ns
7.000	11.38	10.04	-1.345	-3.180 to 0.4900	P > 0.05	ns
14.00	10.93	9.755	-1.170	-3.005 to 0.6650	P > 0.05	ns
21.00	11.70	9.050	-2.645	-4.480 to -0.8100	P<0.001	***
28.00	11.08	7.330	-3.745	-5.580 to -1.910	P<0.001	***
35.00	10.69	6.375	-4.315	-6.150 to -2.480	P<0.001	***
42.00	11.16	6.150	-5.010	-6.845 to -3.175	P<0.001	***
49.00	10.73	6.635	-4.090	-5.925 to -2.255	P<0.001	***
56.00	11.40	6.510	-4.885	-6.720 to -3.050	P<0.001	***
Veículo vs LLC						
Droga	Veículo	LLC	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.54	11.46	-0.07667	-1.834 to 1.680	P > 0.05	ns
7.000	11.38	10.70	-0.6842	-2.441 to 1.073	P > 0.05	ns
14.00	10.93	10.29	-0.6375	-2.394 to 1.119	P > 0.05	ns
21.00	11.70	9.792	-1.903	-3.660 to -0.1464	P<0.01	**
28.00	11.08	8.608	-2.467	-4.224 to -0.7098	P<0.001	***
35.00	10.69	8.333	-2.357	-4.114 to -0.5998	P<0.001	***
42.00	11.16	7.363	-3.798	-5.554 to -2.041	P<0.001	***
49.00	10.73	8.308	-2.417	-4.174 to -0.6598	P<0.001	***
56.00	11.40	8.350	-3.045	-4.802 to -1.288	P<0.001	***

Veículo vs LLC + Oxalato						
Droga	Veículo	LLC + Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.54	11.26	-0.2767	-2.034 to 1.480	P > 0.05	ns
7.000	11.38	10.41	-0.9675	-2.724 to 0.7894	P > 0.05	ns
14.00	10.93	10.20	-0.7250	-2.482 to 1.032	P > 0.05	ns
21.00	11.70	9.329	-2.366	-4.123 to -0.6089	P<0.001	***
28.00	11.08	8.358	-2.717	-4.474 to -0.9598	P<0.001	***
35.00	10.69	7.996	-2.694	-4.451 to -0.9373	P<0.001	***
42.00	11.16	7.296	-3.864	-5.621 to -2.107	P<0.001	***
49.00	10.73	8.067	-2.658	-4.415 to -0.9014	P<0.001	***
56.00	11.40	7.733	-3.662	-5.419 to -1.905	P<0.001	***
Veículo vs Oxalato						
Droga	Veículo	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.54	11.13	-0.4100	-2.167 to 1.347	P > 0.05	ns
7.000	11.38	10.82	-0.5592	-2.316 to 1.198	P > 0.05	ns
14.00	10.93	10.74	-0.1875	-1.944 to 1.569	P > 0.05	ns
21.00	11.70	10.64	-1.058	-2.814 to 0.6994	P > 0.05	ns
28.00	11.08	9.775	-1.300	-3.057 to 0.4569	P > 0.05	ns
35.00	10.69	9.800	-0.8900	-2.647 to 0.8669	P > 0.05	ns
42.00	11.16	9.504	-1.656	-3.413 to 0.1011	P < 0.05	*
49.00	10.73	9.800	-0.9250	-2.682 to 0.8319	P > 0.05	ns
56.00	11.40	9.750	-1.645	-3.402 to 0.1119	P < 0.05	*
OXL vs LLC						
Droga	OXL	LLC	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.27	11.46	0.1883	-1.569 to 1.945	P > 0.05	ns
7.000	10.04	10.70	0.6608	-1.096 to 2.418	P > 0.05	ns
14.00	9.755	10.29	0.5325	-1.224 to 2.289	P > 0.05	ns
21.00	9.050	9.792	0.7417	-1.015 to 2.499	P > 0.05	ns
28.00	7.330	8.608	1.278	-0.4786 to 3.035	P > 0.05	ns
35.00	6.375	8.333	1.958	0.2014 to 3.715	P<0.01	**
42.00	6.150	7.363	1.213	-0.5444 to 2.969	P > 0.05	ns
49.00	6.635	8.308	1.673	-0.08357 to 3.430	P<0.01	**
56.00	6.510	8.350	1.840	0.08309 to 3.597	P<0.01	**
OXL vs LLC + Oxalato						
Droga	OXL	LLC + Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.27	11.26	-0.01167	-1.769 to 1.745	P > 0.05	ns
7.000	10.04	10.41	0.3775	-1.379 to 2.134	P > 0.05	ns
14.00	9.755	10.20	0.4450	-1.312 to 2.202	P > 0.05	ns
21.00	9.050	9.329	0.2792	-1.478 to 2.036	P > 0.05	ns
28.00	7.330	8.358	1.028	-0.7286 to 2.785	P > 0.05	ns
35.00	6.375	7.996	1.621	-0.1361 to 3.378	P < 0.05	*
42.00	6.150	7.296	1.146	-0.6111 to 2.903	P > 0.05	ns
49.00	6.635	8.067	1.432	-0.3252 to 3.189	P < 0.05	*
56.00	6.510	7.733	1.223	-0.5336 to 2.980	P > 0.05	ns
OXL vs Oxalato						
Droga	OXL	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.27	11.13	-0.1450	-1.902 to 1.612	P > 0.05	ns
7.000	10.04	10.82	0.7858	-0.9711 to 2.543	P > 0.05	ns
14.00	9.755	10.74	0.9825	-0.7744 to 2.739	P > 0.05	ns
21.00	9.050	10.64	1.588	-0.1694 to 3.344	P < 0.05	*
28.00	7.330	9.775	2.445	0.6881 to 4.202	P<0.001	***
35.00	6.375	9.800	3.425	1.668 to 5.182	P<0.001	***
42.00	6.150	9.504	3.354	1.597 to 5.111	P<0.001	***
49.00	6.635	9.800	3.165	1.408 to 4.922	P<0.001	***
56.00	6.510	9.750	3.240	1.483 to 4.997	P<0.001	***



LLC vs LLC + Oxalato						
Droga	LLC	LLC + Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.46	11.26	-0.2000	-1.875 to 1.475	P > 0.05	ns
7.000	10.70	10.41	-0.2833	-1.958 to 1.392	P > 0.05	ns
14.00	10.29	10.20	-0.08750	-1.763 to 1.588	P > 0.05	ns
21.00	9.792	9.329	-0.4625	-2.138 to 1.213	P > 0.05	ns
28.00	8.608	8.358	-0.2500	-1.925 to 1.425	P > 0.05	ns
35.00	8.333	7.996	-0.3375	-2.013 to 1.338	P > 0.05	ns
42.00	7.363	7.296	-0.06667	-1.742 to 1.608	P > 0.05	ns
49.00	8.308	8.067	-0.2417	-1.917 to 1.433	P > 0.05	ns
56.00	8.350	7.733	-0.6167	-2.292 to 1.058	P > 0.05	ns
LLC vs Oxalato						
Droga	LLC	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.46	11.13	-0.3333	-2.008 to 1.342	P > 0.05	ns
7.000	10.70	10.82	0.1250	-1.550 to 1.800	P > 0.05	ns
14.00	10.29	10.74	0.4500	-1.225 to 2.125	P > 0.05	ns
21.00	9.792	10.64	0.8458	-0.8293 to 2.521	P > 0.05	ns
28.00	8.608	9.775	1.167	-0.5085 to 2.842	P > 0.05	ns
35.00	8.333	9.800	1.467	-0.2085 to 3.142	P < 0.05	*
42.00	7.363	9.504	2.142	0.4665 to 3.817	P < 0.001	***
49.00	8.308	9.800	1.492	-0.1835 to 3.167	P < 0.05	*
56.00	8.350	9.750	1.400	-0.2751 to 3.075	P < 0.05	*
LLC + Oxalato vs Oxalato						
Droga	LLC + Oxalato	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	11.26	11.13	-0.1333	-1.808 to 1.542	P > 0.05	ns
7.000	10.41	10.82	0.4083	-1.267 to 2.083	P > 0.05	ns
14.00	10.20	10.74	0.5375	-1.138 to 2.213	P > 0.05	ns
21.00	9.329	10.64	1.308	-0.3668 to 2.983	P > 0.05	ns
28.00	8.358	9.775	1.417	-0.2585 to 3.092	P < 0.05	*
35.00	7.996	9.800	1.804	0.1290 to 3.479	P < 0.01	**
42.00	7.296	9.504	2.208	0.5332 to 3.883	P < 0.001	***
49.00	8.067	9.800	1.733	0.05819 to 3.408	P < 0.01	**
56.00	7.733	9.750	2.017	0.3415 to 3.692	P < 0.001	***

Fonte: GraphPad Prism 5.0.

## APÊNDICE D – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DO GRÁFICO 4

Table Analyzed	Cinetica					
Two-way RM ANOVA	Matching by cols					
Source of Variation	% of total variation	P value				
Interaction	8.67	0.0120				
Dias	18.00	P<0.0001				
Droga	21.67	0.0031				
Subjects (matching)	22.8335	P<0.0001				
Source of Variation	P value summary	Significant?				
Interaction	*	Yes				
Dias	***	Yes				
Droga	**	Yes				
Subjects (matching)	***	Yes				
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F		
Interaction	32	14810	462.7	1.750		
Dias	8	30730	3841	14.53		
Droga	4	36990	9247	5.456		
Subjects (matching)	23	38980	1695	6.408		
Residual	184	48660	264.5			
Number of missing values	0					
Bonferroni posttests						
Veículo vs OXL						
Droga	Veículo	OXL	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	106.4	104.2	-2.200	-47.84 to 43.44	P > 0.05	ns
7.000	88.60	87.60	-1.000	-46.64 to 44.64	P > 0.05	ns
14.00	97.40	68.20	-29.20	-74.84 to 16.44	P > 0.05	ns
21.00	93.40	62.80	-30.60	-76.24 to 15.04	P > 0.05	ns
28.00	90.40	50.20	-40.20	-85.84 to 5.439	P < 0.05	*
35.00	103.2	50.20	-53.00	-98.64 to -7.361	P<0.001	***
42.00	97.80	42.60	-55.20	-100.8 to -9.561	P<0.001	***
49.00	98.40	42.80	-55.60	-101.2 to -9.961	P<0.001	***
56.00	100.2	47.40	-52.80	-98.44 to -7.161	P<0.001	***
Veículo vs LLC						
Droga	Veículo	LLC	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	106.4	92.50	-13.90	-57.60 to 29.80	P > 0.05	ns
7.000	88.60	86.67	-1.933	-45.63 to 41.76	P > 0.05	ns
14.00	97.40	75.83	-21.57	-65.26 to 22.13	P > 0.05	ns
21.00	93.40	64.00	-29.40	-73.10 to 14.30	P > 0.05	ns
28.00	90.40	55.50	-34.90	-78.60 to 8.796	P > 0.05	ns
35.00	103.2	65.17	-38.03	-81.73 to 5.663	P < 0.05	*
42.00	97.80	51.83	-45.97	-89.66 to -2.271	P<0.01	**
49.00	98.40	47.33	-51.07	-94.76 to -7.371	P<0.001	***
56.00	100.2	49.50	-50.70	-94.40 to -7.004	P<0.001	***

Veículo vs LLC + Oxalato						
Droga	Veículo	LLC + Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	106.4	89.33	-17.07	-60.76 to 26.63	P > 0.05	ns
7.000	88.60	81.50	-7.100	-50.80 to 36.60	P > 0.05	ns
14.00	97.40	84.33	-13.07	-56.76 to 30.63	P > 0.05	ns
21.00	93.40	75.17	-18.23	-61.93 to 25.46	P > 0.05	ns
28.00	90.40	56.17	-34.23	-77.93 to 9.463	P > 0.05	ns
35.00	103.2	65.83	-37.37	-81.06 to 6.329	P < 0.05	*
42.00	97.80	52.83	-44.97	-88.66 to -1.271	P < 0.01	**
49.00	98.40	55.83	-42.57	-86.26 to 1.129	P < 0.01	**
56.00	100.2	57.33	-42.87	-86.56 to 0.8293	P < 0.01	**
Veículo vs Oxalato						
Droga	Veículo	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	106.4	88.50	-17.90	-61.60 to 25.80	P > 0.05	ns
7.000	88.60	85.83	-2.767	-46.46 to 40.93	P > 0.05	ns
14.00	97.40	79.17	-18.23	-61.93 to 25.46	P > 0.05	ns
21.00	93.40	76.00	-17.40	-61.10 to 26.30	P > 0.05	ns
28.00	90.40	76.50	-13.90	-57.60 to 29.80	P > 0.05	ns
35.00	103.2	77.83	-25.37	-69.06 to 18.33	P > 0.05	ns
42.00	97.80	75.67	-22.13	-65.83 to 21.56	P > 0.05	ns
49.00	98.40	71.00	-27.40	-71.10 to 16.30	P > 0.05	ns
56.00	100.2	57.83	-42.37	-86.06 to 1.329	P < 0.01	**
OXL vs LLC						
Droga	OXL	LLC	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	104.2	92.50	-11.70	-55.40 to 32.00	P > 0.05	ns
7.000	87.60	86.67	-0.9333	-44.63 to 42.76	P > 0.05	ns
14.00	68.20	75.83	7.633	-36.06 to 51.33	P > 0.05	ns
21.00	62.80	64.00	1.200	-42.50 to 44.90	P > 0.05	ns
28.00	50.20	55.50	5.300	-38.40 to 49.00	P > 0.05	ns
35.00	50.20	65.17	14.97	-28.73 to 58.66	P > 0.05	ns
42.00	42.60	51.83	9.233	-34.46 to 52.93	P > 0.05	ns
49.00	42.80	47.33	4.533	-39.16 to 48.23	P > 0.05	ns
56.00	47.40	49.50	2.100	-41.60 to 45.80	P > 0.05	ns
OXL vs LLC + Oxalato						
Droga	OXL	LLC + Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	104.2	89.33	-14.87	-58.56 to 28.83	P > 0.05	ns
7.000	87.60	81.50	-6.100	-49.80 to 37.60	P > 0.05	ns
14.00	68.20	84.33	16.13	-27.56 to 59.83	P > 0.05	ns
21.00	62.80	75.17	12.37	-31.33 to 56.06	P > 0.05	ns
28.00	50.20	56.17	5.967	-37.73 to 49.66	P > 0.05	ns
35.00	50.20	65.83	15.63	-28.06 to 59.33	P > 0.05	ns
42.00	42.60	52.83	10.23	-33.46 to 53.93	P > 0.05	ns
49.00	42.80	55.83	13.03	-30.66 to 56.73	P > 0.05	ns
56.00	47.40	57.33	9.933	-33.76 to 53.63	P > 0.05	ns
OXL vs Oxalato						
Droga	OXL	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	104.2	88.50	-15.70	-59.40 to 28.00	P > 0.05	ns
7.000	87.60	85.83	-1.767	-45.46 to 41.93	P > 0.05	ns
14.00	68.20	79.17	10.97	-32.73 to 54.66	P > 0.05	ns
21.00	62.80	76.00	13.20	-30.50 to 56.90	P > 0.05	ns
28.00	50.20	76.50	26.30	-17.40 to 70.00	P > 0.05	ns
35.00	50.20	77.83	27.63	-16.06 to 71.33	P > 0.05	ns
42.00	42.60	75.67	33.07	-10.63 to 76.76	P > 0.05	ns
49.00	42.80	71.00	28.20	-15.50 to 71.90	P > 0.05	ns
56.00	47.40	57.83	10.43	-33.26 to 54.13	P > 0.05	ns

LLC vs LLC + Oxalato						
Droga	LLC	LLC + Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	92.50	89.33	-3.167	-44.83 to 38.50	P > 0.05	ns
7.000	86.67	81.50	-5.167	-46.83 to 36.50	P > 0.05	ns
14.00	75.83	84.33	8.500	-33.16 to 50.16	P > 0.05	ns
21.00	64.00	75.17	11.17	-30.50 to 52.83	P > 0.05	ns
28.00	55.50	56.17	0.6667	-41.00 to 42.33	P > 0.05	ns
35.00	65.17	65.83	0.6667	-41.00 to 42.33	P > 0.05	ns
42.00	51.83	52.83	1.000	-40.66 to 42.66	P > 0.05	ns
49.00	47.33	55.83	8.500	-33.16 to 50.16	P > 0.05	ns
56.00	49.50	57.33	7.833	-33.83 to 49.50	P > 0.05	ns
LLC vs Oxalato						
Droga	LLC	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	92.50	88.50	-4.000	-45.66 to 37.66	P > 0.05	ns
7.000	86.67	85.83	-0.8333	-42.50 to 40.83	P > 0.05	ns
14.00	75.83	79.17	3.333	-38.33 to 45.00	P > 0.05	ns
21.00	64.00	76.00	12.00	-29.66 to 53.66	P > 0.05	ns
28.00	55.50	76.50	21.00	-20.66 to 62.66	P > 0.05	ns
35.00	65.17	77.83	12.67	-29.00 to 54.33	P > 0.05	ns
42.00	51.83	75.67	23.83	-17.83 to 65.50	P > 0.05	ns
49.00	47.33	71.00	23.67	-18.00 to 65.33	P > 0.05	ns
56.00	49.50	57.83	8.333	-33.33 to 50.00	P > 0.05	ns
LLC + Oxalato vs Oxalato						
Droga	LLC + Oxalato	Oxalato	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0.0000	89.33	88.50	-0.8333	-42.50 to 40.83	P > 0.05	ns
7.000	81.50	85.83	4.333	-37.33 to 46.00	P > 0.05	ns
14.00	84.33	79.17	-5.167	-46.83 to 36.50	P > 0.05	ns
21.00	75.17	76.00	0.8333	-40.83 to 42.50	P > 0.05	ns
28.00	56.17	76.50	20.33	-21.33 to 62.00	P > 0.05	ns
35.00	65.83	77.83	12.00	-29.66 to 53.66	P > 0.05	ns
42.00	52.83	75.67	22.83	-18.83 to 64.50	P > 0.05	ns
49.00	55.83	71.00	15.17	-26.50 to 56.83	P > 0.05	ns
56.00	57.33	57.83	0.5000	-41.16 to 42.16	P > 0.05	ns

Fonte: GraphPad Prism 5.0.