



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

LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA

**NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM
CAMUNDONGOS: INFLUÊNCIA DO DIABETES *MELLITUS* E O EFEITO
PROTETOR DA METFORMINA**

FORTALEZA

2017

LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA

NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM
CAMUNDONGOS: INFLUÊNCIA DO DIABETES MELLITUS E O EFEITO
PROTETOR DA METFORMINA

Tese apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Lima Vale

Coorientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira
Lima Júnior

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P492n Pereira, Lus Mário da Silva.
Neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina : Influência do diabetes mellitus e o efeito protetor da metformina / Lus Mário da Silva Pereira. – 2017.
141 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.
Coorientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. Quimioterapia. 2. Compostos de platina. 3. Doenças do sistema nervoso periférico. 4. Diabetes mellitus. 5. Metformina. I. Título.

CDD 615.1


LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA

NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS: INFLUÊNCIA DO DIABETES MELLITUS E O EFEITO PROTETOR DA METFORMINA

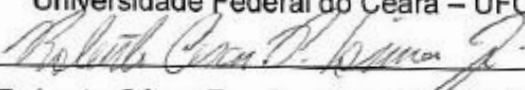
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: 18/01/2017

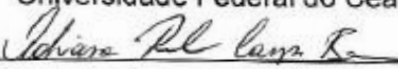
BANCA EXAMINADORA



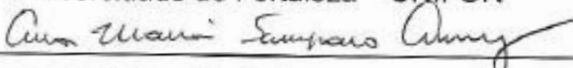
Profª Drª Mariana Lima Vale (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC



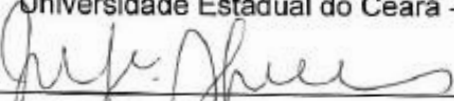
Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC



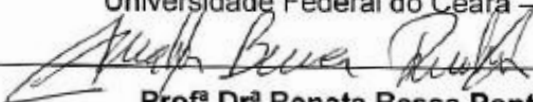
Profª Drª Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza – UNIFOR



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



Profª Drª Josenilia Maria Alves Gomes
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profª Drª Renata Bessa Pontes
Universidade Federal do Ceará - UFC

“Aos meus pais **José Maria** e **Lucineide** pela perseverança, esforço e dedicação na condução da minha formação intelectual e como ser humano.”

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as bênçãos recebidas, por me da sabedoria para vencer os desafios e ter me cercado de pessoas sábias que me auxiliaram nesta jornada.

Ao professor **Ronaldo** de Albuquerque Ribeiro "*in memoriam*" meu ilustre orientador pela oportunidade de realizar este trabalho no LAFICA. Pela atenção e confiança em mim depositada e pela relevante contribuição na minha formação científica e profissional.

A professora **Mariana** Lima Vale, minha orientadora, pela acolhida em seu laboratório, pelos valiosos conhecimentos compartilhados neste trabalho e pelo exemplo de competência e sensibilidade na condução deste trabalho.

Ao professor **Roberto César** Pereira Lima Júnior, pela relevante contribuição na minha formação científica, coorientação, apoio e gentileza em todos os momentos e relevante cooperação na realização deste trabalho.

Ao professor **Paulo** Roberto Carvalho de Almeida do departamento de patologia e medicina legal da UFC pela colaboração além dos excelentes comentários realizados.

As professoras **Ana Maria** Assreuy, **Adriana** Rolim, **Josenilia** Gomes e **Renata** Bessa que aceitaram participar da minha banca de defesa de doutorado e pela relevante contribuição neste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação: **Ana Maria** Falcão Pereira, **Mário** Lisboa, **Maraísa**, **Renan**, **Fábio**, **Deysi Won**, **Kalina** e **Camila** pela ajuda, cooperação, sugestões e incentivos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica: **Francisco Maxwell**, **Jéssica**, **Amanda** Ximenes, **Carol**, **Karla**, **Bruno**, **Cristiane**, **Diego** pelo apoio na execução dos experimentos em todos os momentos prontos para auxiliar.

As nossas técnicas de laboratório **Denilde**, **Jaqueline** e **Vandinha** pela colaboração em momentos de execução do nosso trabalho.

Aos Veterinários Dr^a **Gabriela**, Dr. **Wesley** e **Haroldo** (técnico) do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e biotério do NPDM pelo empenho na solicitação e guarda dos animais tão preciosos no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de trabalho: **Monique** (Hospital São Carlos), **Liduína** Pinto Braga e **Ana Paula** Santos do Carmo (Hospital Universitário Walter Cantídio) pelo apoio e compreensão.

A minha querida e amada esposa **Fernandinha** por entender a importância deste trabalho em minha vida abdicando frequentemente de momentos em família.

Aos meus filhos **Ana Livia** e ao meu caçula, **Inácio** por fortaleceres o meu coração de alegria.

A todos os **professores** do curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC pelos relevantes conhecimentos compartilhados durante o curso deste trabalho.

A bibliotecária **Nicássia** pelas orientações na normalização deste trabalho.

A todos os **meus colegas** do programa de Pós-Graduação em Farmacologia e outros que contribuíram de alguma forma para enriquecer-me de seus conhecimentos.

À **CAPES** e **FUNCAP**, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade.

“Buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça,
e todas as coisas vos serão acrescentadas”

Mateus 6: 33 – Bíblia Sagrada.

“ Senhor obrigado porque até aqui tua mão me
guiou, me sustentou (...) que mesmo em meio a
lutas desafios se cheguei até aqui e venci mais
este dia, foi por que o teu amor infinito tem sido
meu sustento.”

Samuel 7:12 – Bíblia Sagrada.

RESUMO

Estudos clínicos retrospectivos mostraram não haver diferença estatística significativa entre pacientes diabéticos e não diabéticos em apresentar neuropatia sensitiva periférica (NSP) em uso de doses cumulativas de oxaliplatina (OXL). Estes estudos, porém apresentam limitações quanto ao número pequeno de pacientes investigados e dificuldade de se obter um grupo controle compatível com o grupo tratado e exclusão de pacientes com graus iniciais de neuropatia. A metformina (MTF) é um fármaco anti-hiperglicêmico oral bastante utilizado no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Estudos mostraram também importante papel da MTF no combate do câncer e neuropatia provocada por quimioterapia. No presente estudo, objetivou-se estudar se uma condição pré-existente de diabetes mellitus (DM) poderia influenciar o início e/ou curso da NSP induzida por OXL e o efeito protetor da MTF nessa condição. O DM e a NSP foram induzidas respectivamente com aloxano (50 mg/Kg, iv) em dose única e OXL (4,0 mg/Kg, iv) 2x por semana por 4,5 semanas em camundongos que foram avaliados semanalmente durante 35 ou 56 dias. Foram realizados testes nociceptivos (Von Frey, rotarod e teste de imersão da cauda) dosagens de glicemia e avaliação ponderal antes e após os tratamentos dos animais semanalmente ou quinzenalmente. Após os períodos de 35 ou 56 dias o pâncreas, gânglio da raiz dorsal (GRD) e medula espinhal (ME) dos animais foram retirados para análise e imunofluorescência para proteína de ativação neuronal (c-Fos) e fator de transcrição e ativação 3 (ATF-3). Os resultados mostraram que aloxano (50 mg/Kg, iv) foi a melhor dose capaz de induzir DM nos animais sem causar neuropatia nem alterar o tempo de reação nos animais no rotarod em relação ao grupo controle. A OXL (4,0 mg/Kg, iv) foi a melhor dose capaz de induzir NSP nos animais sem alterar a coordenação motora dos animais na barra giratória. A combinação dos tratamentos com as melhores doses de aloxano e OXL induziu DM com hiperglicemia e perda de peso nos animais de maneira significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle e OXL. Já o tratamento com OXL induziu NSP a partir do 28º dia nos animais. Adicionalmente a combinação dos tratamentos com aloxano e OXL além de antecipar a NSP do 28º dia para o 21º dia também amplificou o estabelecimento da NSP nos animais em comparação ao grupo OXL. A análise do pâncreas dos animais tratados com aloxano e combinado com OXL mostrou diminuição do N° de ilhotas de Langerhans além da presença de áreas com intensa basofilia e células acinares com citoplasma basófilo e desarranjo da arquitetura glandular em comparação ao grupo controle. O tratamento dos animais com OXL combinado com MTF (250 mg/Kg, vo) diminuiu a intensidade da NSP, além de retardar o tempo de retirada da cauda dos animais do 14º dia para o 28º dia de maneira significativa em comparação ao grupo OXL. Adicionalmente, observamos aumento da imunoexpressão de c-Fos e ATF-3 no GRD dos animais tratados com OXL de maneira significativa em comparação ao grupo controle. Já o tratamento dos animais com MTF combinado com OXL diminuiu a imunoexpressão de c-Fos e ATF-3 no GRD dos animais de maneira significativa em comparação ao grupo OXL. Observamos também aumento da imunoexpressão de ATF-3 na ME dos animais tratados com OXL de maneira significativa em comparação ao grupo controle, o que foi prevenido pelo tratamento dos animais com MTF. Não houve diferença significativa na imunoexpressão de c-Fos na ME entre os grupos tratados e controle. No presente estudo, a utilização de camundongos com DM associada com hiperglicemia induzido por aloxano tanto anteciparam como amplificaram o desenvolvimento da NSP induzida por OXL. Adicionalmente, demonstramos que o papel neuroprotetor da MTF provavelmente aconteça no sistema nervoso periférico devido á diminuição da imunoexpressão de c-Fos no GRD, não havendo diminuição da imunoexpressão na ME.

Palavras-chave: Quimioterapia. Compostos de Platina. Doenças do Sistema Nervoso Periférico. Diabetes Mellitus. Metformina.

ABSTRACT

PERIPHERAL SENSITIVE NEUROPATHY INDUCED BY OXALIPLATIN IN MICE: DIABETES MELLITUS INFLUENCE AND THE PROTECTIVE EFFECT OF METFORMIN.

Retrospective clinical studies have shown no significant statistical difference between diabetic and non-diabetic patients to present peripheral sensory neuropathy (PSN) using cumulative doses of oxaliplatin (OXL). These studies, however, present limitations on the reduced number of patients investigated and the difficulty to obtain a control group compatible with the treated group and exclusion of patients with initial degrees of neuropathy. Metformin (MTF) is an oral antihyperglycemic drug widely used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. Studies have also shown important role of MTF in the fight against cancer and neuropathy caused by chemotherapy. In the present study, we aimed to study whether a pre-existing condition of diabetes mellitus (DM) could influence the onset and / or course of OXL-induced PSN and the protective effect of MTF on OXL-induced PSN. DM and PSN were each induced with alloxan (50 mg/kg, iv) single dose and OXL (4.0 mg/kg, iv) twice a week for 4.5 weeks respectively in mice that were evaluated weekly for 35 or 56 days. Nociceptive tests (Von Frey, rota-rod and tail immersion test) were performed on blood glucose and weight-for-weight measurements before and after animal treatments weekly or biweekly. After the 35- or 56-day periods the pancreas, dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord (SC) of the animals were removed for immunofluorescence and analysis for neuronal activation protein (c-Fos) and transcription factor and activation 3 (ATF-3). The results showed that alloxan (50 mg/kg, iv) was the best dose capable of inducing DM in the animals without causing neuropathy or altering the reaction time in the animals in the rota-rod in relation to the control group. OXL (4.0 mg/kg, iv) was the best dose able to induce PSN in animals without altering the motor coordination of the animals in the spinning rod. The combination of the treatments with the best doses of alloxan and OXL induced DM with hyperglycemia and weight loss in animals significantly ($p < 0.05$) compared to the control and OXL groups. OXL treatment induced PSN from the 28th day in the animals. In addition, the combination of alloxan and OXL treatments in addition to anticipating the PSN from the 28th day to the 21st day also amplified the establishment of the PSN in the animals compared to the OXL group. Analysis of the pancreas of the animals treated with alloxan and combined with OXL showed a decrease in the number of islets of Langerhans besides the presence of areas with intense basophilia and acinar cells with basophilic cytoplasm and disarrangement of the glandular architecture in comparison to the control group. Treatment of the animals with OXL combined with MTF (250 mg/kg, po) decreased the intensity of the PSN, and delayed tail removal time from animals from day 14 to day 28 significantly compared to OXL group. In addition, we observed increased immunoexpression of c-Fos and ATF-3 in the DRG of OXL-treated animals significantly compared to the control group. Already the treatment of the animals with MTF combined with OXL decreased the immunoexpression of c-Fos and ATF-3 in the animals DRG significantly compared to the OXL group. We also observed increased ATF-3 immunoexpression in SC of OXL-treated animals significantly compared to the control group, which was prevented by treatment of the MTF animals. There was no significant difference in c-Fos immunoexpression in SC between the treated groups and control. In the present study, the use of mice with DM associated with alloxan-induced hyperglycemia both anticipated and amplified the development of OXL-induced PSN. Additionally, we have demonstrated that the neuroprotective role of MTF probably occurs in the peripheral nervous system due to the decrease of c-Fos immunoexpression in the DRG, and there is no decrease in the immunoexpression in the SC.

Keywords: Chemotherapy. Platinum compounds. Peripheral Nervous System Diseases. Diabetes Mellitus. Metformin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mortalidade pelas principais doenças crônicas no Brasil no período de 2000 a 2013 segundo o MS no ano de 2015	22
Figura 2	Incidência de câncer entre sexo no Brasil segundo o INCA em 2016	23
Figura 3	Impacto da incorporação de novas drogas para o tratamento do câncer de cólon e reto	24
Figura 4	Mecanismo de ação antitumoral da oxaliplatina	28
Figura 5	Desenho esquemático do protocolo de indução de DM-1 por aloxano e avaliação da NSP em camundongos	49
Figura 6	Desenho esquemático do protocolo de indução e avaliação da NSP por OXL em camundongos	50
Figura 7	Desenho esquemático do protocolo de indução da NSP por OXL e avaliação em camundongos com DM-1	51
Figura 8	Desenho esquemático do protocolo de indução e avaliação da NSP com OXL em camundongos tratados com MTF	52
Figura 9	Aparelho de Von Frey eletrônico	54
Figura 10	Aparelho de rota-rod	56
Figura 11	Desenho esquemático da análise histopatológico do pâncreas de camundongos	57
Figura 12	Desenho esquemático para imunofluorescência do GRD e medula lombar espinhal de camundongos	58
Figura 13	Criostato utilizado para cortes dos GRD e ME de camundongos	59
Figura 14	Efeito de baixas concentrações de aloxano sobre a glicemia de camundongos	62
Figura 15	Efeito de altas concentrações de aloxano sobre a glicemia de camundongos	63
Figura 16	Efeito do aloxano sobre os pesos dos camundongos	65
Figura 17	Efeito do aloxano na hiperalgesia mecânica plantar em camundongos	67
Figura 18	Efeito da OXL na intensidade de hiperalgesia mecânica	69

	plantar em camundongos	
Figura 19	Efeito da OXL sobre a atividade motora forçada (Rota-rod) em camundongos	71
Figura 20	Efeito do aloxano e OXL sobre a glicemia de camundongos	73
Figura 21	Efeito da aloxano e OXL sobre os pesos dos camundongos	75
Figura 22	Efeito do aloxano e OXL na hiperalgesia mecânica plantar em camundongos	77
Figura 23	Efeito do aloxano e OXL sobre o N ^o de ilhotas de Langerhans do pâncreas de camundongos	79
Figura 24	Efeito do aloxano e OXL sobre a porção endócrina do pâncreas de camundongos em parâmetros histopatológicos	80
Figura 25	Efeito do aloxano e OXL sobre a porção exócrina do pâncreas de camundongos em parâmetros histopatológicos	81
Figura 26	Efeito da MTF e OXL na hiperalgesia mecânica plantar em camundongos	83
Figura 27	Efeito da MTF sobre a alodínia térmica ao frio em camundongos com NSP induzida por OXL	85
Figura 28	Efeito MTF sobre a atividade motora forçada (Rota-rod) de camundongos tratados com OXL	87
Figura 29	Fotomicrografia da imunoexpressão para c-Fos no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL	89
Figura 30	Análise quantitativa da imunoexpressão para c-Fos no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL	90
Figura 31	Fotomicrografia da imunoexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL	92
Figura 32	Análise quantitativa da imunoexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL	93
Figura 33	Fotomicrografia da imunoexpressão para ATF-3 no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL	95
Figura 34	Análise quantitativa da imunoexpressão para ATF-3 no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL	96
Figura 35	Fotomicrografia da imunoexpressão para ATF-3 no corno	98

dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL

Figura 36 Análise quantitativa da imunexpressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL 99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos	35
Quadro 2	Resumo dos resultados da imunofluorescência realizadas no GRD e ME em camundongos	100

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SIMBOLOS

AAD	Associação Americana de Diabetes
AMPK	Proteína Adenosina Monofosfato Quinase
ANOVA	Análise de variância
ATF-3	Fator de transcrição e ativação 3
C	Controle
c-Fos	Proteína de Ativação Neuronal
CCR	Câncer de Cólon e Reto
CDDP	Cisplatina
CBDP	Carboplatina
CCRm	Câncer de cólon e reto metastático
CPT-11	Irinotecano
cm	Centrimetros
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DM	Diabetes Mellitus
DM-1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM-2	Diabetes Mellitus tipo 2
E.P.M.	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FID	Federação Internacional de Diabetes
FOLFOX	Protocolo de Tratamento: OXL + LCV + 5-FU
5-FU	Fluorouracil
g	Gramas (s)
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
h	Hora (s)
HE	Hematoxilina eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer

ip.	Intraperitoneal
iv.	Intravenoso
Kg	Kilograma (s)
LCV	Leucovorin
L	Litro (s)
ME	Medula Espinhal Lombar
mg	Miligrama (s)
mm ²	Milímetro (s) ao quadrado
mL	Mililitro (s)
MS	Ministério da Saúde
mTOR	Alvo para Rapamicina em Mamíferos
Nº	Número
NeuN	Marcador Nuclear de Neurônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NSP	Neuropatia Sensitiva Periférica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXL	Oxaliplatina
PBS	Solução Salina Tamponada
p	Nível de Significância
Pt	Platina
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SAL	Salina
s	Segundo (s)
SNC	Sistema Nervoso central
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade

SUS	Sistema Único de Saúde
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
TIC	Teste de Imersão da Cauda
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
vs	Versus
V	Veículo
vo	via oral
+	Mais
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
Δ	Varição
μg	Micrograma
μL	Microlitro (s)
μm	Micrometro
Ca^{+2}	Íon cálcio (s)
Na^{+}	Íon sódio (s)
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Câncer	22
2.2	Câncer de Cólon e Reto	23
2.3	Compostos de platina	25
2.3.1	<i>Oxaliplatina</i>	26
2.3.2	<i>Farmacocinética da oxaliplatina</i>	26
2.3.3	<i>Mecanismo de ação antitumoral da oxaliplatina</i>	27
2.3.4	<i>Neurotoxicidade da oxaliplatina</i>	28
2.3.5	<i>Neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina</i>	29
2.3.6	<i>Tratamento da neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina</i>	31
2.4	Diabetes mellitus	32
2.4.1	<i>Fisiopatologia do diabetes mellitus</i>	32
2.4.2	<i>Epidemiologia</i>	32
2.4.3	<i>Classificação do diabetes mellitus</i>	33
2.4.4	<i>Critérios de diagnóstico</i>	34
2.4.5	<i>Neuropatia diabética</i>	35
2.5	Diabetes mellitus experimental em animais	36
2.6	Aloxano	38
2.6.1	<i>Farmacocinética</i>	38
2.6.2	<i>Mecanismo de ação do aloxano</i>	38
2.6.3	<i>Diabetes mellitus tipo 1 induzido por aloxano</i>	39
2.7	Metformina	40
2.7.1	<i>Mecanismo de ação</i>	41
2.7.2	<i>Farmacocinética</i>	42
2.7.3	<i>Metformina no tratamento do diabetes mellitus</i>	42
2.7.4	<i>Metformina e outras ações</i>	43
3	JUSTIFICATIVA	44
4	OBJETIVOS	46
4.1	Objetivo Geral	46

4.2	Objetivos Específicos	46
5	MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1	Animais	47
5.2	Aspectos éticos	47
5.3	Drogas e reagentes	47
5.4	Materiais e equipamentos	48
5.5	Protocolos experimentais	48
5.6	Testes comportamentais: nociceptivos e coordenação motora	53
5.6.1	<i>Teste de hiperalgesia mecânica plantar – Von Frey</i>	53
5.6.2	<i>Teste de imersão da cauda - TIC</i>	54
5.6.3	<i>Teste de coordenação motora forçada – Rota-rod</i>	55
5.7	Avaliação da glicemia	56
5.8	Avaliação ponderal	56
5.9	Obtenção de amostras e tecidos	57
5.9.1	<i>Perfusão intracardiaca, processamento e armazenamento dos tecidos</i>	57
5.10	Análise histopatológica do Pâncreas	58
5.11	Imunofluorescência para c-Fos e ATF-3 em GRD e corno dorsal da medula espinhal	59
5.12	Microscopia confocal e análise e quantitativa da marcação de c-Fos e ATF3	60
5.13	Análise estatística	60
6	RESULTADOS	61
6.1	1ª Fase: Avaliação da indução do DM-1 em camundongos	61
6.1.1	<i>Efeito do aloxano na indução da hiperglicemia</i>	61
6.1.2	<i>Efeito do aloxano sobre o peso dos camundongos</i>	64
6.1.3	<i>Efeito do aloxano sobre a hiperalgesia mecânica plantar em camundongos</i>	66
6.2	2ª Fase: Avaliação da NSP induzida por OXL em camundongos não diabéticos	68
6.2.1	<i>Efeito da OXL sobre a hiperalgesia mecânica plantar</i>	68
6.2.2	<i>Efeito da OXL sobre a atividade motora forçada (Rota-</i>	70

	<i>rod) de camundongos</i>	
6.3	3ª Fase: Avaliação da NSP induzida por OXL em camundongos diabéticos	72
6.3.1	<i>Avaliação da glicemia</i>	72
6.3.2	<i>Avaliação ponderal</i>	74
6.3.3	<i>Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar</i>	76
6.3.4	<i>Histopatologia do pâncreas</i>	78
6.4	4ª Fase: Avaliação do efeito protetor da MTF na NSP induzida por OXL em camundongos não diabéticos.	82
6.4.1	<i>Efeito da MTF sobre a hiperalgesia mecânica plantar</i>	82
6.4.2	<i>Efeito da MTF sobre na alodínia térmica ao frio</i>	84
6.4.3	<i>Efeito da MTF sobre a atividade motora forçada (Rota-rod)</i>	86
6.4.4	<i>Análise da Imunofluorescência para c-Fos em GRD de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL</i>	88
6.4.5	<i>Análise da Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL</i>	91
6.4.6	<i>Análise da Imunofluorescência para ATF-3 em GRD de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL</i>	94
6.4.7	<i>Análise da Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL</i>	97
7	DISCUSSÃO	101
8	CONCLUSÃO	121
	REFERÊNCIAS	122
	ANEXO A	141

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e um sério problema de saúde pública (TORRE *et al.*, 2015). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), aproximadamente 34.280 novos casos de câncer de cólon e reto (CCR) são esperados em 2016 no Brasil (INCA, 2016). Essa problemática vem sendo amenizada com o tratamento utilizando fármacos antineoplásicos como a oxaliplatina (OXL).

A OXL, um fármaco de terceira geração da classe dos agentes platinos, é utilizada como primeira linha no tratamento do CCR (DE GRAMONT *et al.*, 2000; LEONARD *et al.*, 2005).

O tratamento com OXL está associado com o surgimento de neurotoxicidade que representa a principal toxicidade dose-limitante do seu uso e a maioria dos pacientes desenvolveram neuropatia sensitiva periférica (NSP) induzida por OXL entre o 8º e 12º ciclo de uso de OXL (ARGYRIOU *et al.*, 2008). Espera-se que comorbidades como o diabetes mellitus (DM) piore essa neuropatia da OXL.

Estudos clínicos com pacientes diabéticos e não diabéticos em uso de doses cumulativas de OXL mostraram não haver diferença significativa no desenvolvimento de NSP induzida por OXL. Porém estes estudos apresentaram limitações quanto ao número reduzido de pacientes nos grupos, dificuldade de se obter um grupo controle compatível com o grupo tratado, exclusão de pacientes com graus iniciais de NSP no estudo e falta de informações sobre o tipo de DM, resultando na necessidade de estudos futuros (RAMANTHAN *et al.*, 2010; UWAH *et al.*, 2012).

Na literatura científica não foram encontrados estudos clínicos nem estudos em animais conclusivos que mostrem se uma condição pré-existente de DM poderia influenciar o curso da NSP induzida por OXL. Além disso, não foram encontrados estudos sobre o papel da MTF na neuropatia induzida por OXL.

Alguns estudos demonstraram que a metformina (MTF), um fármaco anti-hiperglicemiante oral bastante utilizado no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 também tem sido utilizado no tratamento do câncer e neuropatia induzida por paclitaxel, cisplatina e estreptozotocina. E por isso resolvemos estudar o papel da MTF na NSP induzida por OXL.

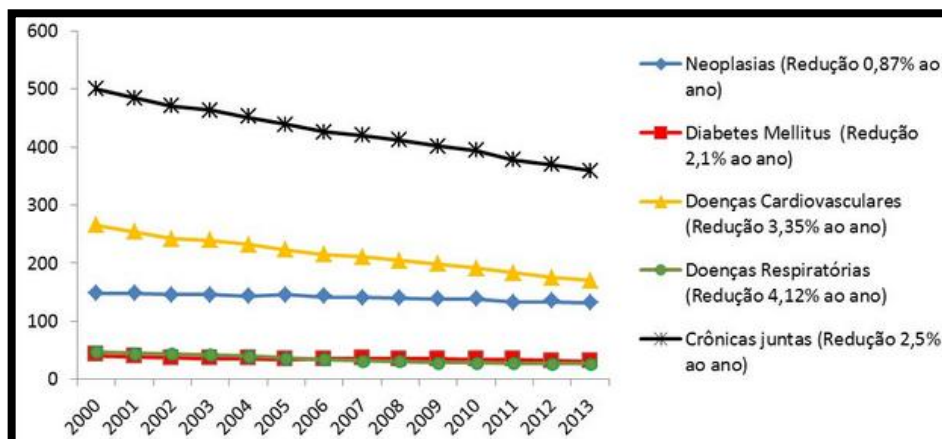
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo disseminar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2016).

A incidência de neoplasias vêm crescendo em todo o mundo e estas já representam a segunda causa de morte na maioria dos países (HOYERT, 2012; OMS, 2011). Em países desenvolvidos, projeta-se que em breve, os cânceres ultrapassarão as doenças cardiovasculares (OMS, 2011). A tendência de declínio das taxas de neoplasias nos Estados Unidos da América ocorreram após os anos 1990 (HOYERT, 2012). Segundo o ministério da saúde (MS) no Brasil, esse foi o grupo de doenças crônicas com menor declínio no período de 2000 a 2013 (FIGURA 1) (MS, 2015). No entanto, as tendências são distintas segundo o tipo de câncer, idade e sexo. Nos homens, as taxas de mortalidade por câncer de próstata e cólon e reto tem aumentado, as de câncer gástrico e de pulmão diminuem na faixa etária de menores de 60 anos e as de câncer de esôfago permanecem estáveis. Nas mulheres, as taxas de mortalidade por câncer de mama, de pulmão e cólon e reto aumentaram, enquanto as de câncer do colo do útero e do estômago diminuíram (INCA, 2016; SCHMIDT *et al.*, 2011).

Figura 1 - Mortalidade pelas principais doenças crônicas no Brasil no período de 2000 a 2013 segundo o MS no ano de 2015



Fonte: MS (2015).

2.2 Câncer de Cólon e Reto

O CCR está entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, representando assim um importante problema de saúde pública. É o terceiro tipo de câncer mais comum em todo o mundo (após os tumores do pulmão e da mama), e a quarta causa mais comum de mortalidade na oncologia (TORRE *et al.*, 2015). O CCR é a quarta causa mais comum de morte por câncer em homens e a terceira em mulheres em todo o mundo. Aproximadamente 694.000 mortes de CCR ocorreram em 2012, representando cerca de 8,5% de todas as mortes por câncer (FERLAY *et al.*, 2013; TORRE *et al.*, 2015).

O CCR é o segundo tipo de câncer mais comum em países desenvolvidos, com mais de 730 mil novos casos diagnosticados mundialmente a cada ano (FERLAY *et al.*, 2015).

No Brasil, segundo estimativas do INCA, aproximadamente 34.280 novos casos de CCR foram esperados em 2016. Estima-se 16.660 novos casos de CCR em homens e 17.620 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,84 casos novos a cada 100 mil homens e 17,10 a cada 100 mil mulheres. No Brasil, no ano de 2016, o CCR foi o terceiro mais incidente em homens e o segundo em mulheres (FIGURA 2) (INCA, 2016).

Figura 2 - Incidência de câncer entre sexo no Brasil segundo o INCA em 2016

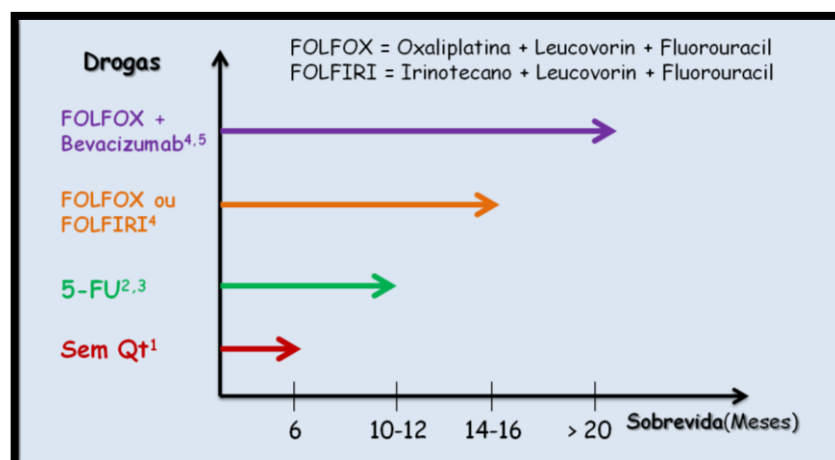


Fonte: INCA (2016).

O impacto destas estatísticas é parcialmente amenizado quando ressaltamos os importantes avanços terapêuticos na última década que prolongaram substancialmente a sobrevida dos pacientes portadores desta grave neoplasia. A sobrevida global média de um paciente com câncer de cólon e reto metastático (CCRm) tratado com 5-FU e LCV no início da década de 1990 era de aproximadamente 10-12 meses, contrastando com dados recentes que mostram sobrevida média superando 20 meses quando se incluem drogas como irinotecano e OXL (FIGURA 3) (DE GRAMONT *et al.*, 2000; GOLDBERG *et al.*, 2004; SALTZ *et al.*, 2000).

Quando consideramos pacientes com doença metastática restrita ao fígado, taxas de sobrevida em 5 anos superam 60%. Estes avanços no prognóstico do CCRm devem-se principalmente a dois fatores: (1) ampliação dos protocolos de tratamento com novos agentes quimioterápicos como: OXL e irinotecano (CPT-11) e anticorpos monoclonais que bloqueiam importantes vias de sinalização do crescimento celular tais como cetuximabe (anti-EGFR) e bevacizumabe (anti-VEGF); (2) avanços no tratamento cirúrgico de metástases hepáticas e intervenções como ablações por radiofrequência e embolizações (MEYERHARDT; MAYER, 2005). No entanto, o sinergismo destas vertentes terapêuticas tem sido limitado por importantes toxicidades, como a NSP que se segue ao uso de quimioterapia com regimes à base de OXL (ANDRE *et al.*, 2004).

Figura 3 - Impacto da incorporação de novas drogas para o tratamento do câncer de cólon e reto



Fonte: Elaborado pelo autor baseado em De Gramonte *et al.*, 2000.

2.3 Compostos de platina

Os fármacos chamados compostos de platina como a cisplatina (CDDP), carboplatina (CBDP) e OXL, são classificados como agentes alquilantes do DNA e representam uma importante classe de fármacos anticancerígenos, 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).

A eficácia do tratamento do câncer com fármacos a base de platina é, geralmente, comprometida devido ao risco substancial para toxicidade graves, como a neurotoxicidade. Esta pode resultar em debilidade aguda e crônica, diminuindo, assim, a qualidade de vida do paciente (MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOND, 2009). O tratamento da dor neuropática inclui anticonvulsivantes, antidepressivos, antioxidantes, opióides e lidocaína tópica. Contudo a terapia ideal para essa condição ainda é um desafio, pois em vários pacientes, não ocorre o suficiente alívio da dor (BARON; BINDER; WASNER, 2010).

O perfil de neurotoxicidade difere entre os compostos platinos, CDDP, CBDP e OXL. A neuropatia periférica causada pela CDDP, 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 de 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 CBDP agente de 2ª geração, é considerada menos, neurotóxica do que a CDDP e OXL. A disfunção neurológica é um efeito colateral que ocorre no tratamento com CBDP, 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 CBDP desenvolvem neuropatia periférica. O potencial da OXL, agente platino de 3ª geração, para provocar neurotoxicidade é mais parecido como a CDDP. A neuropatia periférica é a toxicidade limitante da dose mais comum da OXL e uma

das principais causas de 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 início rápido e intensa alodinia ao frio, uma síndrome de dor, que não é ocasionada pelos outros agentes platinos (AMPTOULACH; TSAVARIS, 2011; JOSEPH; LEVINE, 2009; MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOND, 2009).

2.3.1 Oxaliplatina

A OXL é a terceira geração de agentes platinos, com estrutura similar à CDDP, com um amplo espectro de atividade antitumoral em linhagens de células cancerosas e toxicidade diferente da CDDP e das drogas de segunda geração como a CBDP (KELLAND, 2007). A OXL tem em sua estrutura o composto 1,2-DACH (1,2-diaminociclohexano), relacionado com uma atividade citotóxica significativa em células tumorais, tendo resistência tumoral diminuída (LEONARD *et al.*, 2005).

A OXL quando combinada com o 5-FU e o LCV, constitui o regime FOLFOX que é um dos esquemas de primeira linha para o tratamento do CCR, além de ser utilizada como primeira linha na quimioterapia adjuvante (LEONARD *et al.*, 2005).

2.3.2 Farmacocinética da oxaliplatina

A OXL apresenta meia-vida plasmática muito curta, provavelmente em decorrência de sua rápida captação pelos tecidos e de sua reatividade. É largamente distribuída para a maioria dos tecidos do nosso corpo, com um volume de distribuição mais elevado do que a cisplatina. Foi demonstrado um nível mais elevado de OXL nos gânglios da raiz dorsal (GRD) e nos neurônios periféricos, quando comparados com o cérebro e com a medula espinhal (ME), pois a OXL, assim como outros agentes platinos, não ultrapassa a barreira hematoencefálica (MCWHINNEY *et al.*, 2009). Após 2-5 h de infusão de OXL, 40% do platino ligam-se de forma irreversível às hemácias, formando produtos não tóxicos. Os 30% restantes do platino ligam-se às proteínas do plasma, e os outros 30% correspondem ao platino ultrafiltrado. Este último contém a droga ativa, ou seja, a OXL intacta,

representando, assim, o maior componente citotóxico (CHU, 2004; JERREMALM *et al.*, 2009).

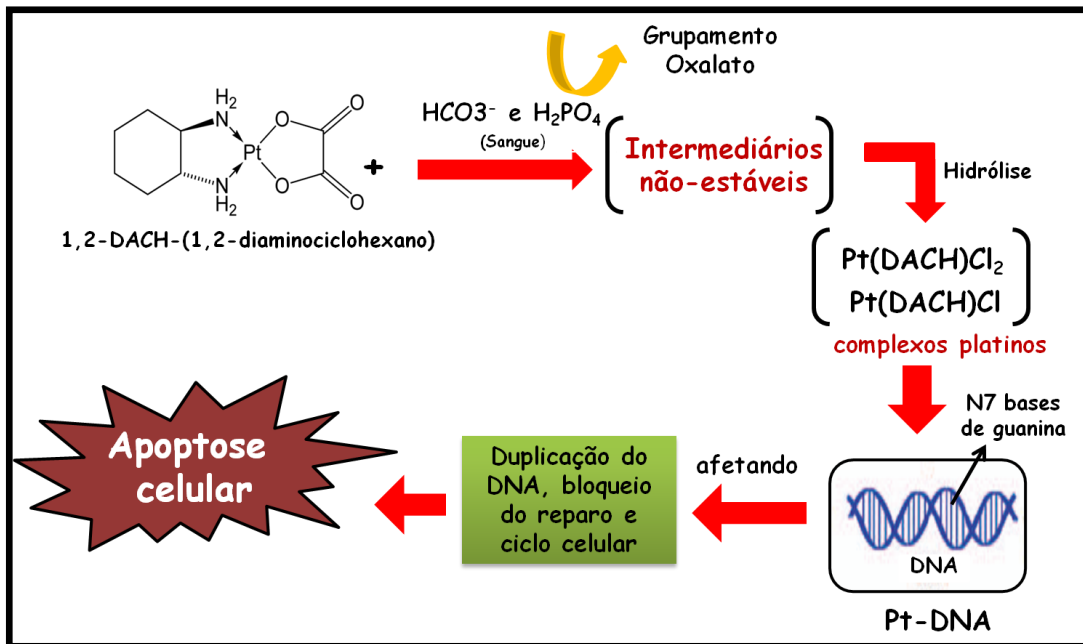
2.3.3 Mecanismo de ação antitumoral da oxaliplatina

A OXL exerce um efeito citotóxico de maneira semelhante a outros análogos platinos. Esses compostos eliminam as células em todos os estágios do ciclo celular e, por esta razão, são considerados ciclos-celulares não específicos. No momento em que a OXL entra na corrente sanguínea, nucleófilos fracos como o bicarbonato do sangue (HCO_3^-) e o dihidrogênio fosfato (H_2PO_4) desacoplam seu grupamento oxalato, resultando na formação de intermediários não-estáveis, que são rapidamente hidrolisados a espécies platinas, tais como o monoaqua-1,2-DACH e o dicloretoplatino de 1,2-DACH, os quais reagem instantaneamente com o DNA celular, proteínas e outras macromoléculas, resultando em apoptose celular (FIGURA 4) (LEONARD *et al.*, 2005).

A atividade antitumoral da OXL resulta também nas interações da platina com o DNA, através da formação de complexos de Pt-DNA, principalmente na posição N7 das bases de guanina no DNA, originando ligações cruzadas intrafilamentares e interfilamentares, complexos entre guaninas adjacentes e complexos entre adenina e guanina adjacentes (CHU, 2004; FOLTINOVÁ *et al.*, 2008).

O uso de quimioterapia à base de OXL tem sido crescente e resultado em melhora significativa nas taxas de resposta no câncer CCR. No entanto, a neurotoxicidade, manifestada clinicamente como uma NSP tem sido associada ao seu uso podendo causar efeitos prejudiciais à qualidade de vida do paciente e levar a redução da dose da OXL ou até mesmo à sua descontinuação, o que em última instância pode trazer prejuízos ao tratamento do paciente.

Figura 4 – Mecanismo de ação antitumoral da oxaliplatina



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.4 Neurotoxicidade da oxaliplatina

A OXL está associada a efeitos mielotóxico, nefrotóxico e ototóxico insignificantes, porém o surgimento de neurotoxicidade representa a principal toxicidade dose-limitante do seu uso (ARGYRIOU *et al.*, 2008). Dois tipos diferentes de neurotoxicidade tem sido observados com o uso de OXL: a neurotoxicidade aguda ocorre em 85-95% dos pacientes que fazem tratamento com OXL, desenvolvendo-se imediatamente após a infusão da droga, sendo caracterizada pela exacerbação ao frio, parestesias, miotonias, espasmos musculares e fasciculações, podendo também ocorrer disestesias faringolaringeais, com dificuldade de respiração e deglutição em 1-2 % dos pacientes (SCHIFF *et al.*, 2009). Já o segundo tipo de reação, classificada como crônica e cumulativa, ocorre depois do uso mais prolongado da OXL podendo resultar em prejuízo funcional, disestesia distal e ataxia, também conhecida como NSP (BINDER, 2007).

2.3.5 Neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina

A NSP induzida por OXL parece ocorrer em 10-20% dos pacientes que recebem doses cumulativas superiores a 750-850 mg/m². Os sintomas, puramente sensitivos, consistem em parestesias e disestesias distais, de duração prolongada, progredindo com alterações sensitivas periféricas, ataxia sensitiva, alteração proprioceptiva e déficit funcional, levando a limitações nas atividades de vida diária do paciente. Esses sintomas geralmente persistem entre os ciclos de tratamento e aumentam de intensidade com as doses cumulativas (GROTNEY, 2005). Em outro estudo, a disestesia foi referida em 87,2% dos pacientes e a parestesia, sendo experimentada em 94,3% destes durante o uso da OXL (LEONARD *et al.*, 2005). Não há, entretanto dados acerca das taxas de incidência dessa neuropatia nos pacientes brasileiros em uso de OXL.

Concordando com esses dados, pode-se acrescentar que após o primeiro ciclo de quimioterapia, a média de duração da disestesia foi de 5 dias. Já para pacientes com doze ciclos, a média dessa duração foi de 21 dias ou mais (LEONARD *et al.*, 2005).

Os resultados iniciais de um estudo europeu em 2200 pacientes em estágio II e III com câncer de cólon randomizados que receberam FOLFOX ou infusão de 5-FU e LCV mostraram que no grupo tratado com FOLFOX neuropatia periférica foi o maior efeito desse esquema, ocorrendo em 92 % dos pacientes e classificados em grau 3 (p.ex. limitando as atividades de vida diariamente) em 12 %. Os efeitos neurotóxicos foram geralmente reversíveis; 18 meses após a finalização da terapia, 76 % dos pacientes não relataram prejuízo neurológico e somente 4% tinham sintomas residuais grau 2 e 3. Esses dados têm ampliado as opções de tratamento aos pacientes em estágios precoces da doença; contudo, os riscos e benefícios destes regimes tóxicos deveriam ser aprovados em pacientes individualmente (ANDRE *et al.*, 2004).

A NSP induzida por OXL ainda é pouco compreendida, no que diz respeito aos seus aspectos celulares e moleculares, entretanto, alguns autores têm sugerido que o fenômeno possa ser resultado do metabolismo celular e transporte axoplasmático diminuídos, levando ao acúmulo de compostos de platina no GRD (JOSEPH *et al.*, 2008).

A NSP induzida por OXL tem diversas hipóteses para seu desenvolvimento, incluindo a de que repetidos episódios de neuropatia aguda podem levar a lesões neurais crônicas. Além disso, estudos experimentais mostram acúmulo de compostos de platina nos corpos celulares dos GRD que podem resultar na diminuição do metabolismo celular e no transporte axonal. Parecem ocorrer também lesões mitocondriais com aumento do estresse oxidativo o que induziria a ocorrência de NSP (MILTENBURG; BOOGERD, 2014).

Em um estudo conduzido por Jaggi e Singh (2012) acerca dos mecanismos da neuropatia periférica induzida por fármacos antineoplásicos, como OXL, CDDP, paclitaxel e vincristina estes mecanismos parecem estar interligados. Postula-se que estes agentes antineoplásicos desencadeiam mudanças na expressão e características funcionais dos canais de sódio no GRD e em neurônios sensoriais no corno dorsal, aumentando a frequência e duração de abertura desses canais levando a um aumento dos níveis intracelulares de íons sódio, o que pode abrir canais de cálcio (DESCOEUR *et al.*, 2011; LING *et al.*, 2007; NIETO *et al.*, 2008). O aumento no cálcio intracelular pode deflagrar numerosas mudanças secundárias, incluindo-se a ativação de proteína C quinase (PKC) levando à fosforilação e ativação de receptores de potencial transitório vanilóide (TRPV) que produziria diretamente aumento da hiper-responsividade neuronal juntamente com a geração de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (AZEVEDO *et al.*, 2013; BOEHMERLE *et al.*, 2007; JOSEPH *et al.*, 2008; JOSEPH; LEVINE, 2004; KIM *et al.*, 2010; MUTHURAMAN *et al.*, 2008; TA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011).

Isso poderia contribuir, por sua vez, para a citotoxicidade neuronal. A abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) poderia levar a liberação do citocromo C e iniciar uma cascata de apoptose. Como consequência poderia levar a uma perda de fibras A δ e C (específicas para frio e calor) incluindo a perda de nociceptores de fibras nervosas da epiderme. Esse dano poderia gerar descargas espontâneas e mecano-sensitivas devido à hiper-responsividade dos nociceptores remanescentes (ALESSANDRI-HABER *et al.*, 2008; ANAND *et al.*, 2010; TA *et al.*, 2010;).

2.3.6 Tratamento da neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina

O tratamento e a prevenção da NSP induzida pela OXL envolvem a educação sobre a exposição ao frio, modificações nos horários das administrações, utilização de agentes protetores e estratégias específicas. A estratégia “*stop-and-go*” determina o paciente parar o tratamento quando a dose pré-definida for alcançada ou quando tiver início algum grau de neuropatia, e continuar quando a neuropatia tiver regredido ou quando o tratamento for necessário para impedir a progressão tumoral. Em pacientes com alto risco de desenvolver NSP, o uso da OXL deve ser interrompido e substituído por outro agente quimioterápico (ALI, 2009).

O tratamento da dor neuropática pode ser resumido em dois tipos de terapia: preventiva e sintomática. O tratamento com drogas preventivas, tais como a infusão de Ca^{2+} , Mg^{2+} , vitamina E, glutathiona, glutamina e N-acetilcisteína objetivam reduzir a gravidade dos sintomas neuropáticos em pacientes que estão recebendo tratamento com antineoplásicos. Para serem eficazes, essas drogas não devem reduzir somente o efeito neurotóxico dos quimioterápicos, mas também devem manter o efeito antitumoral desses agentes (DEANGELIS, 2009; KALEY; PAICE, 2009).

O tratamento sintomático consiste na utilização de agentes neuromoduladores que irão interferir na patogênese da dor neuropática já instalada. Sendo esta condição clínica parcial ou completamente insensível aos analgésicos comuns, as terapias médicas tendem a envolver analgésicos adjuvantes, isto é, fármacos cuja indicação elementar não é a analgesia. Deste modo, recomendações para o tratamento de primeira linha incluem a gabapentina, lidocaína, tramadol e antidepressivos tricíclicos. Os de segunda linha são lamotrigina, carbamazepina e inibidores seletivos da recaptação da serotonina (DWORKIN *et al.*, 2007). Da mesma forma, dois dos principais moduladores de canais de Ca^{2+} (por se ligarem a uma subunidade $\alpha_2\delta$) como a gabapentina e a pregabalina também são utilizados (ALVES NETO *et al.*, 2009; GILRON *et al.*, 2015). Atualmente alguns fármacos como a duloxetine (ENGEL, 2014) e venlafaxina (RICHARDS *et al.*, 2015) são relatados na literatura para o tratamento de dor neuropática, porém o uso desses fármacos é de forma adjuvante e paliativa para amenizar a dor neuropática.

A NSP é uma consequência frequente e incapacitante da administração de OXL sendo o principal determinante de uma má qualidade de vida. Cerca de 80%

dos pacientes com câncer sentem uma forte dor em seus últimos dias de vida (QUANG; SCHMIDT, 2010).

Desta forma, a neuropatia conseqüente à quimioterapia induzida por OXL pode trazer grandes prejuízos à qualidade de vida dos pacientes. Adicionalmente, a neuropatia poder levar a interrupção do tratamento quimioterápico, o que em última instância pode comprometer a sobrevivência geral do paciente. O tratamento e prevenção da NSP ainda não estão totalmente estabelecidos e o percentual de pacientes que desenvolvem neurotoxicidade ainda é alto. Esse quadro é agravado por um tratamento raramente eficaz e associado a comorbidades tais como DM e doenças cardiovasculares. Novos estudos sobre a fisiopatologia da NSP induzida por OXL são necessários a fim de desvendar os mecanismos e mediadores envolvidos bem como a associação entre neuropatia provocada pela OXL e DM.

2.4 Diabetes mellitus

O DM não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DIABETES, 2014).

2.4.1 Fisiopatologia do diabetes mellitus

O DM é caracterizado por baixa produção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas e resistência à insulina, dificultando a entrada da glicose nas células e, portanto a sua utilização levando a hiperglicemia. O grupamento aldeído em excesso na glicose presente no sangue pode reagir *in vivo* com grupamentos amino de proteínas estruturais e funcionais incluindo hemoglobina e colágeno, formando produtos de glicação de “*Maillard*” que contribui para a patogênese do diabetes e outras doenças (BABU *et al.*, 2007; SELVARAJ *et al.*, 2008), dentre estas a neuropatia diabética (GORDOIS *et al.*, 2006).

2.4.2 Epidemiologia

Uma epidemia de DM está em curso. Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 387 milhões e que alcance 471 milhões em 2035. Cerca de 80% desses indivíduos vivem em países em

desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade e há crescente proporção de pessoas acometidas em grupos etários mais jovens, as quais coexistem com o problema que as doenças infecciosas ainda representam (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DIABETES, 2014).

O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com DM. Quantificar o predomínio atual de DM e estimar o número de pessoas com diabetes no futuro é importante, pois possibilita planejar e alocar recursos de maneira racional (OMS, 2002).

No Brasil, no final da década de 1980, estimou-se a prevalência de DM na população adulta em 7,6% (MALERBI; FRANCO, 1992); dados de 2010 apontam taxas mais elevadas, em torno de 15% em Ribeirão Preto, no estado de São Paulo, por exemplo (MORAES *et al.*, 2010). Estudo recente, realizado em seis capitais brasileiras, com servidores de universidades públicas, na faixa etária de 35 a 74 anos, porém com medidas laboratoriais mais abrangentes, encontrou uma prevalência de cerca de 20%, aproximadamente metade dos casos sem diagnóstico prévio (SCHMIDT *et al.*, 2014). Em 2014, estimou-se que existiriam 11,9 milhões de pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos, com diabetes no Brasil, podendo alcançar 19,2 milhões em 2035 (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DIABETES, 2014).

2.4.3 Classificação do diabetes mellitus

O DM baseia-se na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto, os termos “DM insulino-dependente” e “DM insulino-independente” devem ser eliminados dessa categoria classificatória. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (AAD), inclui quatro classes clínicas: diabetes mellitus tipo 1 (DM-1), diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Há ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (ALBERTI; ZIMMET, 1999; ASSOCIATION AMERICAN DIABETES, 2014; 2015).

A evolução para o DM-2 ocorre em um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem a denominação de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. Tais estágios são decorrentes de uma combinação de resistência à ação insulínica e disfunção de célula β . No DM-1, o início geralmente é abrupto, com sintomas que indicam de maneira contundente a presença da enfermidade (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DIABETES, 2014; OMS, 2002).

2.4.4 Critérios de diagnóstico

O critério para o diagnóstico do DM foi modificado, em 1997, pela AAD e, posteriormente, aceito pela OMS e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2014; OMS, 2002). As modificações foram realizadas com a finalidade de prevenir de maneira eficaz as complicações micro e macrovasculares do DM (MORAES *et al.*, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2014).

Os critérios aceitos para o diagnóstico do DM com utilização da glicemia são três (QUADRO1): (1) Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual ≥ 200 mg/dL. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições; (2) Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DIABETES, 2014; OMS, 2002); (3) Glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL (OMS, 2002; FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2014).

Quadro 1 - Valores de glicose plasmática em (mg/dL) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos.

Categoria	Jejum*	2 h após 75g de glicose	Casual**
Glicemia normal	< 100	< 140	
Tolerância á glicose diminuída	≥ 100 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabetes mellitus	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos)***
<p>(*) O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo 8 h. (**) Glicemia plasmática casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição. (***) Os sintomas clássicos do DM incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.</p>			

Fonte: Federação Internacional de Diabetes (2014).

2.4.5 Neuropatia diabética

A neuropatia diabética é um distúrbio neurológico demonstrável clinicamente ou por métodos laboratoriais em pacientes diabéticos, quando excluídas outras causas de neuropatia (BOULTON *et al.*, 2005; ENGLAND *et al.*, 2005). Em geral, o acometimento patológico do sistema nervoso é muito amplo e, inúmeras vezes, bastante grave no DM. A prevalência da neuropatia diabética alcança níveis elevados com a evolução temporal da doença, chegando geralmente a frequências de 50% de lesão neuropática em diferentes grupos de pacientes analisados nos âmbitos nacional e internacional. Entretanto, essa prevalência pode aumentar significativamente e atingir valores próximos a 100% de acometimento quando se utilizam métodos diagnósticos de maior sensibilidade, como os eletrofisiológicos (DYCK *et al.*, 1993; PARTANEN *et al.*, 1995). Pode-se detectar distúrbio neurológico precocemente na evolução de DM-2, muitas vezes desde o momento do diagnóstico, enquanto nos pacientes DM-1 normalmente surge cinco ou mais anos após o diagnóstico, devendo-se realizar avaliação para tal complicação nestes momentos e depois anualmente por meio de testes que serão descritos

posteriormente. É notório, então, que o acometimento neuropático dos pacientes seja geralmente precoce e de alta prevalência, a maioria constituindo-se em triopatia diabética – oftalmo, nefro e neuropatia – e sendo um importante problema de saúde, que ocasiona morbidade e mortalidade e piora significativamente a qualidade de vida por incapacitação e diminuição de sobrevida. Atualmente, não há dúvida de que o bom controle metabólico do diabetes reduz a frequência e a intensidade da lesão neurológica (ANG *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 2014).

Nessa situação patológica, a lesão neurológica é extensa no organismo humano diabético, envolvendo amplamente todo o sistema nervoso periférico em seus componentes sensorimotor e autônomo, com clínica característica e concordante com as hipóteses patogênicas de natureza metabólica e/ou microvascular. Nos estudos que se têm realizado com grupos de pacientes diabéticos usando-se metodologia clínica rotineira, verificou-se predominância nítida da neuropatia sensorimotor. Entretanto, essa situação pode ocorrer em razão da metodologia empregada, já que os testes de função autonômica são de uso rotineiro mais difícil, envolvendo métodos e equipamentos mais sofisticados. Desse modo, o quadro clínico da neuropatia pode variar amplamente, desde formas assintomáticas até a presença de manifestações pouco específicas, somáticas e/ou autonômicas. Como se mencionou anteriormente, o acometimento patológico na neuropatia diabética geralmente é amplo no organismo, apresentando-se de duas formas principais: Polineuropatia sensorimotora simétrica e neuropatia autonômica (cardiovascular, respiratória, digestiva e geniturinária) (KING *et al.*, 2001; PFUTZNER *et al.*, 2001).

2.5 Diabetes mellitus experimental em animais

O DM experimental em animais de laboratório tem sido induzido utilizando substâncias químicas, cirurgia, manipulações genéticas e imunológicas. As substâncias químicas mais frequentemente utilizadas para indução do DM experimental em animais são o aloxano e a estreptozotocina (AHN; LEE, 1998; KIM *et al.*, 2002).

O aloxano e a estreptozotocina são os agentes mais utilizados para induzir DM-1 em modelos animais. A estreptozotocina em combinação com regimes

alimentares ou outros tipos de manipulações em animais (animais nocaute) também podem ser utilizadas para induzir DM-2 (RADENKOVIĆ *et al.*, 2016). A estreptozotocina é conhecida também por ter ação sobre o pâncreas além de seus efeitos hepatotóxicos e toxicidade sobre as vias biliares causando interrupção dos níveis de ácidos biliares e do fluxo biliar em ratos (WATKINS; SHERMAN, 1992). Por outro lado, a administração de aloxano induz um estado de diabetes que é particularmente semelhante ao DM-1 em seres humanos (FEDERIUK *et al.*, 2004). E por isso que a administração de aloxano é preferencial e mais apropriada quando desejamos trabalhar como o modelo de DM-1 (RADENKOVIĆ *et al.*, 2016). Além disso, o aloxano induz diabetes com baixa taxa de mortalidade dos animais do que com estreptozotocina e menos efeitos tóxicos (RADENKOVIĆ *et al.*, 2016).

O aloxano pode ser utilizado para induzir DM em ratos (AHMED; ZAHRA, 2011; GURUSUBRAMANIAN; ROY, 2014), camundongos (DEY *et al.*, 2015; FAVARO *et al.*, 2015), coelhos (CHIANG *et al.*, 2014; IRSHAD *et al.*, 2015) e cachorros (HOWELL *et al.*, 2013; MARTÍNEK, *et al.*, 1992).

O modelo de DM induzido por aloxano em animais de experimentação tem sido amplamente empregado para os estudos de agentes terapêuticos e preventivos da doença, dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético (RIBEIRO *et al.*, 2007; ZANOELLO *et al.*, 2002). O modelo de DM também se apresenta como uma valiosa ferramenta para a pesquisa de condições patológicas associadas ao diabetes (RANDENKOVIC *et al.*, 2016).

O modelo de DM induzido por aloxano foi frequentemente utilizado no meio científico por diversos pesquisadores para indução de DM em ratos e camundongos (DELFINO *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2001; LERCO *et al.*, 2003; LENZEN, 2008; NEGRI, 2005; RAMAR *et al.*, 2012; RAAFAT; ISSA; BULE, 2015; SAMY, 2014; SAMADDER *et al.*, 2011; SULAIMAN *et al.*, 2012; SCHOSSLER *et al.*, 2004; TAKEMOTO *et al.*, 2016).

Nos estudos que utilizaram o modelo de DM em camundongos a doença foi induzida por via intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv) com diferentes doses de aloxano 50, 75, 100, 180, 200 e 300 mg/Kg de animal (HO *et al.*, 1999; ISSA; BULE, 2015; RAMAR *et al.*, 2012; SUMAIMAN *et al.*, 2012; RAAFAT; SAMY, 2014; TAKEMOTO *et al.*, 2016). Nestes estudos, porém com as doses de aloxano

utilizadas não foram relatados dados sobre percentual de indução do DM, percentual de mortalidade nem sobre neuropatia desenvolvida pelos animais.

2.6 Aloxano

O aloxano (2,4,5,6-tetraoxipirimidina, 5,6-dioxi-uracilo) é um derivado da pirimidina que é sintetizado por oxidação com ácido úrico (LENZEN, 2008). É um composto hidrofílico e instável com uma estrutura semelhante à glicose. A sua propriedade hidrofílica o impede de penetrar na bicamada lipídica da membrana plasmática, enquanto que a estrutura semelhante à glicose permite uma entrada do aloxano nas células β . Estas propriedades do aloxano são essenciais para o desenvolvimento do diabetes (LENZEN; MUNDAY, 1991).

2.6.1 Farmacocinética

O aloxano em solução aquosa se decompõe espontaneamente em poucos minutos em ácido aloxânico não diabetogênico (LENZEN; MUNDAY, 1991). A meia-vida do aloxano é muito curta (LENZEN, 2008). Em temperatura de 37°C e pH de 7,4 a meia-vida do aloxano é igual a 1,5 minutos (LENZEN, 2008). Em temperaturas mais baixas, a meia-vida do aloxano é mais longa, e uma vez que o aloxano é um ácido fraco, é mais estável a pH mais baixo (LENZEN, 2008; LENZEN; MUNDAY, 1991). Quando uma dose diabetogênica de aloxano é utilizada antes do seu tempo de decomposição, isto é suficiente para permitir que ele alcance o pâncreas de animais em quantidades que são deletérias ao órgão (SZKUDELSKI, 2001).

2.6.2 Mecanismo de ação do aloxano

O aloxano produz seu efeito patológico, logo após a entrada nas células β pancreáticas, através de dois mecanismos independentes, nomeadamente a inibição da glicoquinase e a geração do ciclo de espécies reativas de oxigênio (ERO). A glicoquinase é uma isoenzima das hexoquinases e uma das principais enzimas no fígado, bem como em células β pancreáticas (ACCILI, 2011; IYNEDJIAN, 2009; LIN; WILSON, 2003). No fígado, a glicoquinase é importante para o processo de armazenamento de glicose na forma de glicogênio, enquanto que nas células β

pancreáticas tem uma função de sensor de glicose e controle da secreção de insulina (IYNEDJIAN, 2009; WILSON, 2003). O aloxano é um potente inibidor da glicoquinase que reduz a oxidação da glicose e a geração do ATP, o que suprime a secreção de insulina (LENZEN, 2008; PANTEN, 1988a). O aloxano exibe alta afinidade para os compostos celulares contendo SH, tais como a glicoquinase (SZKUDELSKI *et al.*, 1998). A inativação da glicoquinase mostrou ser a consequência da reação de aloxano com dois grupos glicoquinase SH ao lado da ligação do açúcar desta enzima (SZKUDELSKI *et al.*, 1998). Zhang *et al.* (2009) mostraram que o aloxano é capaz de reduzir tanto a concentração como a atividade da glicoquinase no fígado, e que esta característica do aloxano desempenha um papel importante no processo de indução do DM-1.

No pâncreas, ocorre a destruição seletiva das células β com redução no tamanho e número das ilhotas pancreáticas (SCHOSSLER *et al.*, 2004). Pouca diminuição de grânulos no núcleo e citoplasma das células β é detectada com 5 minutos após injeção da dose diabetogênica de aloxano (BAILEY *et al.*, 1944). Porém, após 1h, aproximadamente 40% das células β pancreáticas sofrem necrose (JÖRNS *et al.*, 1997), as membranas celulares das organelas como grânulos secretórios, cisternas do retículo endoplasmático rugoso, complexo de golgi e mitocôndria se rompem perdendo suas estruturas. A proporção de células β necróticas aumenta após 2 e 4 h para aproximadamente 60 e 100%, respectivamente (JÖRNS *et al.*, 1997).

Um dos alvos das ERO é o DNA das ilhotas pancreáticas, e sua fragmentação ocorre nas células β expostas ao aloxano (SAKURAI; OGISO, 1995). O dano ao DNA estimula a ribosilação de ADP, um processo participante do reparo do DNA, o qual depleta NAD^+ celular, resultando em dano das células β (PARK *et al.*, 1995). Alguns inibidores da poliribosilação como a superóxido dismutase, catalase e “varredores” enzimáticos de radical hidroxil podem parcialmente restringir a toxicidade do aloxano (JÖRNS *et al.*, 1999).

2.6.3 Diabetes mellitus tipo 1 induzido por aloxano

O aloxano induz um diabetes insulino-dependente. No entanto, após apenas 2 minutos após a aplicação de aloxano, o aumento da insulina no sangue pode ser observado (SZKUDELSKI *et al.*, 1998). Este aumento da insulina é

considerado um dos efeitos metabólicos do aloxano, sendo seguido pela redução do nível de glicose plasmática. Um das possíveis explicações para este efeito metabólico induzido por aloxano é provavelmente ligado ao aumento induzido pelo aloxano no cálcio intracelular. Além disso, tem sido demonstrado que diferentes bloqueadores de canais cálcio tais como verapamil, diltiazem ou nicardipina têm efeitos supressores sobre o desenvolvimento de diabetes induzida por aloxano (KATSUMATA, 1992; KIM *et al.*, 1994; MIYAO; KATSUMATA, 1998). Os efeitos destes bloqueadores dos canais de cálcio no desenvolvimento de diabetes confirmam assim um possível papel do cálcio neste modelo de diabetes.

A outra explicação para o alto nível de insulina no início do diabetes induzido por aloxano pode estar ligado a uma redução inicial de consumo de ATP resultante do bloqueio da fosforilação da glicocinase, que produz um aumento transitório do ATP nas células β que desencadeia uma liberação transitória de insulina (LENZEN, 2008).

Segundo Sakurai e Ogiso (1994) as células β pancreáticas expostas à hiperglicemia também produzem ERO. Devido ao fato destas células β serem sensíveis ao estresse oxidativo, o excesso de ERO pode causar disfunção dessas células o que parece ocasionar depleção de glutathiona pancreática (GSH), que já foi observado em ratos diabéticos induzidos por aloxano (MOUSTAFA, 1998).

Adicionalmente um estudo conduzido por Altamare *et al.* (1997) demonstraram que a depleção de glutathiona pode alterar o “*status redox*” das células pancreáticas podendo prejudicar a síntese de insulina e/ou disfunção severa das células β pancreáticas além de conduzir a complicações diabéticas. Após a aplicação do aloxano em animais de laboratório, este destrói apenas as células β pancreáticas, deixando as células α e δ intactas (DUNN *et al.*, 1944; KUMAR *et al.*, 2012).

2.7 Metformina

A MTF (cloridrato de 1,1-dimetilbiguanida) é um fármaco anti-diabético, biguanida, de uso oral e aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), uma agência de regulação de drogas e alimentos norte-americana. A MTF é também de origem natural (*Galega officinalis*), uma planta usada na medicina popular por

séculos. Além disso, a MTF funciona como um supressor da gliconeogênese principalmente no DM-2 (DEL BARCO *et al.*, 2011; DOWLING *et al.*, 2011).

A MTF faz parte de um grupo farmacológico dito dos sensibilizadores de insulina, as biguanidas, isto é, não são capazes de estimular a secreção de insulina, agem em tecidos periféricos tendo como ação principal melhorar a resistência insulínica. As biguanidas foram inicialmente empregadas para o tratamento do DM-2 baseado no efeito hipoglicemiante da guanidina, uma droga que se mostrou hepatotóxica. A separação do efeito hepatotóxico do anti-hiperglicemiante resultou na síntese das biguanidas: fenformina e MTF. Devido à possibilidade de precipitar a acidose láctica, a fenformina foi retirada do mercado. A MTF difere da fenformina em alguns aspectos que diminuem muito a chance de acidose láctica (ROOS *et al.*, 2009).

2.7.1 Mecanismo de ação

O principal efeito anti-hiperglicemiante da MTF consiste na redução da gliconeogênese hepática (BOSI *et al.*, 2009; HUNDAL *et al.*, 2000). Além disso, ela diminui a absorção gastrointestinal de glicose, aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos muscular e adiposo, e melhora indiretamente a resposta da célula N à glicose por reduzir a glicotoxicidade e os níveis de ácidos graxos livres (KIRPICHNIKOV *et al.*, 2002). Nos tecidos periféricos, a MTF facilita o transporte de glicose por aumentar a atividade da tirosinaquinase nos receptores de insulina (DOMINGUEZ, *et al.*, 1996) e a translocação de transportadores de glicose para a membrana celular (HUNDAL *et al.*, 1992; MATTHAEI *et al.*, 1991). Em adição, um efeito protetor nas células N tem sido demonstrado em ensaios *in vitro* (MARCHETTI *et al.*, 2004).

Em nível molecular, a MTF gera muitos dos seus efeitos a partir da ativação (exceto no hipotálamo) da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (DZAMKO *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2010; ZANG *et al.*, 2004) A AMPK tem uma importante função na regulação do metabolismo e controla tanto o gasto de energia, como o apetite (DZAMKO *et al.*, 2009). O mecanismo pelo qual a MTF ativa essa enzima não é totalmente conhecido; entretanto, foi demonstrado que as biguanidas ativam a AMPK indiretamente via inibição do complexo I da cadeia respiratória, o que resulta em um aumento da relação AMP/ATP (OWEN *et al.*, 2000). De qualquer forma, isso é controverso, já que alguns experimentos *in vitro*

não encontraram mudanças significativas nas concentrações desses nucleotídeos (FRYER *et al.*, 2002; MUSI *et al.*, 2002). Além disso, Zou *et al.* (2004) propuseram um caminho diferente, no qual a AMPK é ativada via aumento de espécies reativas ao nitrogênio (ERN). A serina-treonina quinase (LKB1), uma enzima que tem sua atividade aumentada pela MTF, também é requerida na ativação da AMPK (SHAW *et al.*, 2005) e sua atividade parece ser modulada por ERN (ZOU *et al.*, 2004).

2.7.2 Farmacocinética

A MTF possui absorção incompleta e lenta pelo segmento superior do intestino delgado. Sua meia-vida varia de 4 a 8 h e seu pico de concentração plasmática é atingido entre 1 e 2 h após uma dose de 500 mg a 1000 mg. A MTF é rapidamente distribuída e não se liga a proteínas plasmáticas. A eliminação é predominantemente renal, sem metabolização, através de secreção tubular proximal (90% dentro de 12 h), mas 20 a 30% da excreção podem ser realizadas pelas fezes. Estudos indicam um efeito máximo nas dosagens de 1,5 a 2 gramas por dia (ERIKA *et al.*, 2006).

2.7.3 Metformina no tratamento do diabetes mellitus

A MTF está indicada no tratamento de primeira linha do DM-2 além de ajudar na prevenção e dificultar a instalação clínica do diabetes. A MTF melhora a ação da insulina, aumentando o transporte de glicose, síntese de glicogênio e lipídeo (GUNTON *et al.*, 2003). Mesmo na ausência de insulina, melhora o transporte de glicose e a atividade da tirosina quinase do receptor do fator de crescimento 1 semelhante a insulina (IGF-1R) (KIRPICHNIKOV *et al.*, 2002).

Por ter ações independentes da insulina, a MTF pode ser um coadjuvante à terapia insulínica, no tratamento do DM-1 no qual ocorre uma redução da necessidade de insulina diária (GOMEZ *et al.*, 2002; HAMILTON *et al.*, 2003; MEYER; GUERCI, 2003; MEYER *et al.*, 2003; SARNBLAD *et al.*, 2003).

A MTF apresenta efeitos na produção e distribuição de glicose, perfusão tecidual, metabolismo lipídico, perda de peso e, possivelmente, na secreção insulínica. Por estas ações, ela é considerada um agente mais anti-hiperglicêmico do que hipoglicêmico (RADZIUK *et al.*, 2003).

Em um estudo publicado pela AAD, a MTF foi capaz de diminuir a concentração de glicose plasmática de jejum em 60-70 mg/dL em pacientes com DM-2. Interessantemente, a MTF não afeta a concentração de glicose sérica de animais saudáveis em jejum, mas a reduz significativamente em animais diabéticos (CHENG *et al.*, 2001).

O efeito da MTF em baixar a glicemia no DM-2 é principalmente uma consequência da redução da gliconeogênese hepática, da glicogenólise, e estimulação da entrada de glicose no músculo e adipócitos. Além de aumentar a expressão dos transportadores de glicose e glicólise nos tecidos periféricos, explicam o seu efeito de sensibilização insulínica (OWEN *et al.*, 2000, KIRPICHNIKOV *et al.*, 2002; ROOS *et al.*, 2009). Um mecanismo para explicar um número de ações da MTF tem sido proposto, baseado na ativação da AMPK (DETAILLE *et al.*, 2005; GUIGAS *et al.*, 2004; OUSLIMANI, *et al.*, 2005).

2.7.4 Metformina e outras ações

A MTF tem demonstrado desempenhar um potencial papel anti-cancerígeno através de mecanismos moleculares via ATM/LKB1/AMPK e alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (DEL BARCO *et al.*, 2011). A via mTOR regula o crescimento celular e tumorigênese, e associados com a progressão tumoral. No entanto, este papel no CCR é principalmente limitado pela observação de base populacional ou clínica baseada em estudos retrospectivos. Não há conclusões definitivas sobre os efeitos da MTF no desenvolvimento do CCR a nível molecular.

A MTF mostrou também importante papel na proteção da hiperalgesia, alodinia e diminuição do estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, provavelmente através da ativação da AMPK. Além disso, a MTF foi capaz de ativar a AMPK e seus genes alvo no nervo ciático desses animais, sugerindo envolvimento da AMPK no efeito neuroprotetor da MTF (JUNXIONG *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a MTF mostrou importante efeito neuroprotetor durante o uso de antineoplásicos no modelo de neuropatia periférica induzida por CDDP e paclitaxel em camundongos. Foi observado que essa proteção estava associada a uma redução da perda das fibras nervosas epidérmicas intraplantares (MAO-YINER *et al.*, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Segundo estimativa do INCA (2016) a incidência de CCR tende em aumentar tanto em homens como em mulheres. Essa tendência do crescimento do CCR é reforçada por estatísticas mundiais que mostram o CCR entre as principais causas de morte em todo o mundo, representando assim um importante problema de saúde pública (TORRE *et al.*, 2015).

A introdução da OXL nos esquemas de quimioterapia para o tratamento do CCR é imprescindível para o aumento da expectativa de vida dos pacientes com essa condição em até aproximadamente 20 meses (GOLDBERG *et al.*, 2003). Entretanto, os pacientes apresentam como efeito colateral, parestesia e disestesia associadas à NSP, aumentando as chances de interrupção do esquema terapêutico com esse fármaco e desfavorecendo o adequado manejo clínico do câncer.

A NSP induzida por OXL ainda é pouco compreendida, no que diz respeito aos seus aspectos celulares e moleculares. Vários alvos moleculares foram propostos. Na prática clínica o uso de antidepressivos, anticonvulsivantes, opióides e vitamina E tem tido pouco sucesso no tratamento da neuropatia induzida por OXL.

Além disso, o tratamento de pacientes diabéticos com OXL pode exacerbar a NSP induzida por OXL. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (2014) uma epidemia de DM está em curso no mundo. O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com DM (OMS, 2002).

Estudos clínicos retrospectivos com pacientes diabéticos e não diabéticos em uso de doses cumulativas de OXL não mostraram diferença significativa no desenvolvimento da NSP induzida por OXL. Porém estes estudos apresentaram limitações quanto ao número reduzido de pacientes nos grupos, dificuldade de se obter um grupo controle compatível com o grupo tratado e exclusão de pacientes com graus iniciais de NSP (RAMANTHAN *et al.*, 2010; UWAH *et al.*, 2012).

Diante destes dados epidemiológicos que aumentam a relevância de estudar as relações e possíveis influências do início e curso da NSP induzida por OXL em camundongos diabéticos. O estudo dessa condição em modelos animais

permite um aprofundamento dos mecanismos celulares e moleculares, levando a descoberta de novos alvos com potenciais de tratamento da toxicidade.

Alguns pesquisadores já mostraram o efeito benéfico da MTF sobre a neuropatia periférica diabética induzida por estreptozotocina. Adicionalmente outros pesquisadores mostraram também o efeito neuroprotetor da MTF sobre a neuropatia induzida por antineoplásicos como CDDP e paclitaxel.

Entretanto, até o presente, não consta na literatura científica nenhum estudo sobre o efeito da MTF na NSP consequente a OXL. Assim a investigação desse efeito, bem como os mecanismos e mediadores envolvidos na fisiopatologia da NSP induzida por OXL constitui feito inédito e necessário devido ao uso cada vez crescente desse fármaco em protocolos clínicos para pacientes com CCR no mundo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar a NSP induzida por OXL em camundongos, a influência do DM e o efeito protetor da MTF.

4.2 Objetivos Específicos

- Investigar se uma condição pré-existente de DM poderia influenciar o início e/ou o curso da NSP;
- Investigar o efeito protetor da MTF na neuropatia induzida por OXL mediante estudo da hiperalgesia mecânica plantar e alodínia térmica;
- Investigar a influência da MTF na marcação de ATF-3 no GRD e corno dorsal da ME de camundongos não diabéticos com NSP;
- Investigar a influência da MTF na marcação de c-Fos no GRD e corno dorsal da ME em camundongos não diabéticos com NSP;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos de 6 a 12 semanas de idade, pesando entre 20 e 35 gramas obtidos no biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno apropriadas, receberam água e ração “*ad libitum*”, foram mantidos em ciclos de claro e escuro de 12/12 horas com temperatura ambiente média controlada a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, exaustão de gases e redução de ruídos.

5.2 Aspectos éticos

Em todos os experimentos foram observados os princípios éticos da experimentação animal normatizados pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA). Os protocolos experimentais desenvolvidos no laboratório de farmacologia da inflamação e câncer (LAFICA) foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da UFC que rege o manuseio de animais experimentais tendo sido aprovado e registrado sob Nº 27/2012.

5.3 Drogas e reagentes

As drogas, insumos e reagentes utilizados nos experimentos foram: Aloxano (Sigma-USA); Oxaliplatina 20 mg/5mL; Metformina; álcool 70%; água destilada; eosina; hematoxilina; formol a 10%; solução salina estéril 0,9%; frutose 5%; glicose 5%; paraformaldeído; tribromo; Tissue-tek; Glicose-liquiform (Labtest); sacarose; PBS; BSA; tampão citrato; Anticorpo anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology[®]); anticorpo anti-ATF-3 (Abcam); NeuN conjugado com Alexa Flúor 488 (Merk Millipore); anti-igG de coelho alexa flúor 568 (Invitrogen[®]);

5.4 Materiais e equipamentos

Durante o decorrer dos experimentos foram utilizados diversos materiais, aparelhos e instrumentos, nominados a seguir:

Agulhas 13x4,5 mm e 25x0,7 mm; Aparelho de ultracentrifugação; Autoclave (FABE); Alicates de aço-inóx (Mundial); Balança Analítica modelo 2004 (Beckman); Becker de 50cc e 250 cc; Cadinho de Porcelana; Cabine de Fluxo Laminar, classe II-B-2; Centrifuga Beckman (modelo J2-21-Beckman); Equipamento de Von Frey Eletrônico (Insight); Equipamento de Rota Rod (Insight); Material cirúrgico (tesouras, pinças anatômicas e dente de rato); Microscópio Óptico (Zeiss-Axiovert 10 Zeiss West Germany); Microscópio confocal (Zeiss LSM 710); Microscópio óptico (Leica); Micropipetas automáticas 10 uL, 20 uL, 50 uL, 100 uL, 200 uL, 1000 uL (Gilson); Seringas de 1 cc, 5 cc, 10 cc, 20 cc e 60 cc (BD); Tubos de plástico de fundo cônico de 20 cc e 50 cc (Corning); Pipetas automáticas; Pistilo de porcelana; Ponteiros amarelas e azuis para pipetas automáticas; Pinças de aço-inóx;

5.5 Protocolos experimentais

I) 1ª Etapa: Protocolo para avaliação da indução do diabetes mellitus em camundongos

O protocolo teve como objetivo observar qual a dose de aloxano era capaz de causar DM-1 e hiperglicemia associado com e sem neuropatia nos camundongos.

Foi utilizado o modelo de DM induzido por aloxano em camundongos e ratos já utilizado em outros trabalhos (DORNAS *et al.*, 2006; KIRSTEN *et al.*, 2010; LERCO *et al.*, 2003; SCHOSSLER *et al.*, 2004; WEISBREN, 1948).

O modelo de DM-1 induzido por aloxano consistiu na administração de única injeção de aloxano por via iv. nos camundongos previamente anestesiados com tribromo 0,1 ml por 10 g de animal em ambiente com pouca luminosidade para a indução de hiperglicemia após jejum para sólidos de 12 ou 18 horas.

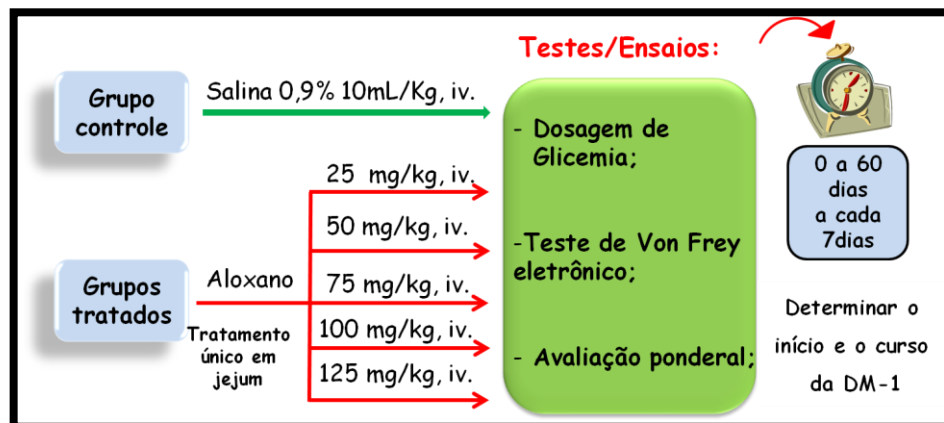
O aloxano foi pesado na hora da sua utilização em balança de precisão, sala com pouca luminosidade, dissolvido em salina 0,9% estéril e protegido da luz em tubo de fundo cônico 10 cc (Falcon) estéril envolvido em papel alumínio, devido a sua elevada fotossensibilidade.

Os animais antes e após o tratamento com aloxano passaram por teste de Von Frey, glicemia e avaliação ponderal (FIGURA 5).

Os animais foram divididos em grupos de 6 animais:

- **Grupo 1:** Salina a 0,9 %, 10 mL/Kg, iv.;
- **Grupo 2:** Aloxano 25 mg/Kg, iv.;
- **Grupo 3:** Aloxano 50 mg/Kg, iv.;
- **Grupo 4:** Aloxano 75 mg/Kg, iv.;
- **Grupo 5:** Aloxano 100 mg/Kg, iv.;
- **Grupo 6:** Aloxano 125 mg/Kg, iv.;

Figura 5 - Desenho esquemático do protocolo de indução DM-1 por aloxano e avaliação da NSP em camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

II) 2ª Etapa: Protocolo de avaliação da NSP por OXL em camundongos não diabéticos

O protocolo teve por objetivo determinar qual a dose de OXL era capaz de causar NSP nos camundongos.

Foi utilizado o modelo de NSP induzida pelo agente antineoplásico OXL, modificado no LAFICA por Pontes, 2009.

O modelo consistiu na administração de nove injeções de OXL dissolvido em solução de glicose a 5% iv. pela veia lateral caudal dos animais na concentração de 0,1 mL/10g de animal utilizando agulha 0,45 x 13 mm em seringa de 1 cc

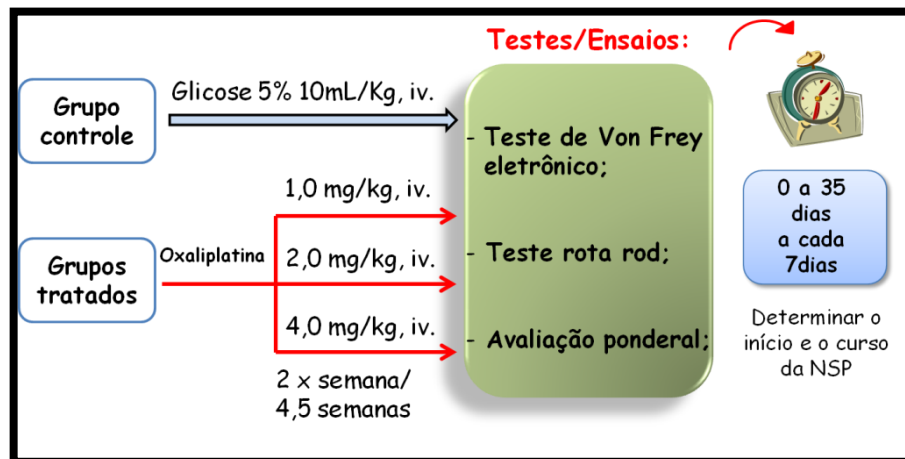
previamente anestesiados com tribromo 0,1 ml por 10 g de animal por quatro semanas e meia para induzir a NSP (PONTES, 2009).

Os animais antes e após o tratamento com OXL passaram por teste de Von Frey, rota-rod e avaliação ponderal (FIGURA 6).

Os animais foram divididos em grupos de 6 animais:

- **Grupo 1:** Glicose a 5%, 10 mL/Kg, iv.;
- **Grupo 2:** OXL 1,0 mg/Kg, iv.;
- **Grupo 3:** OXL 2,0 mg/Kg, iv.;
- **Grupo 4:** OXL 4,0 mg/Kg, iv.;

Figura 6 - Desenho esquemático do protocolo de indução e avaliação da NSP por OXL em camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

III) 3ª Etapa: Protocolo de avaliação da NSP por OXL em camundongos diabéticos

O protocolo teve por objetivo avaliar se uma condição pré existente de DM-1 poderia influenciar o início e/ou o curso da NSP induzida por OXL nos camundongos.

A NSP foi induzida com OXL em camundongos com DM-1 e hiperglicemia como já descrito anteriormente nas etapas primeira e segunda do presente estudo.

A OXL somente pode ser diluída com glicose a 5% ou com frutose a 5% quando for utilizada em pacientes ou animais diabéticos.

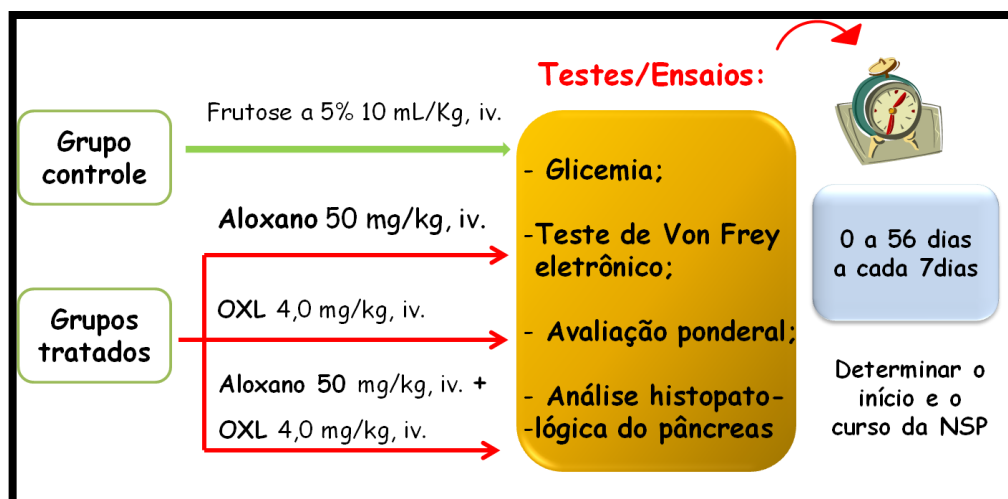
Os animais antes e após o tratamento com aloxano e/ou OXL passaram por teste de Von Frey, glicemia e avaliação ponderal. Após 56 dias de experimentos

foi realizada a análise histopatológica do pâncreas dos animais como descrito anteriormente (FIGURA 7).

Os animais foram divididos em grupos de 6 animais:

- **Grupo controle:** Os animais foram tratados com frutose a 5%, 10 mL/Kg, iv.;
- **Grupo aloxano:** Os animais foram tratados única vez com aloxano 50 mg/Kg, iv.;
- **Grupo OXL:** Os animais foram tratados com OXL 4,0 mg/Kg, iv.;
- **Grupo aloxano + OXL:** Os animais foram tratados única vez com aloxano 50 mg/Kg, iv. + OXL 4,0 mg/Kg, iv. por 2x/semana/4,5 semanas.

Figura 7 – Desenho esquemático do protocolo de indução da NSP por OXL e avaliação em camundongos com DM-1



Fonte: Elaborado pelo autor.

IV) 4ª Etapa: Protocolo de avaliação do efeito protetor da MTF na NSP induzida por OXL em camundongos não diabéticos

O protocolo teve por objetivo avaliar por meio de testes comportamentais o efeito protetor da MTF na hiperalgisia mecânica plantar e alodínia térmica. Adicionalmente foi observado o efeito protetor da MTF por microscópio confocal através da avaliação da imunexpressão de c-Fos e ATF-3 no GRD e ME dos camundongos tratados com OXL e combinado com MTF.

Foram administradas nove injeções de OXL 4,0 mg/Kg de animal por via iv. pela veia caudal por quatro semanas e meia para induzir a NSP em animais

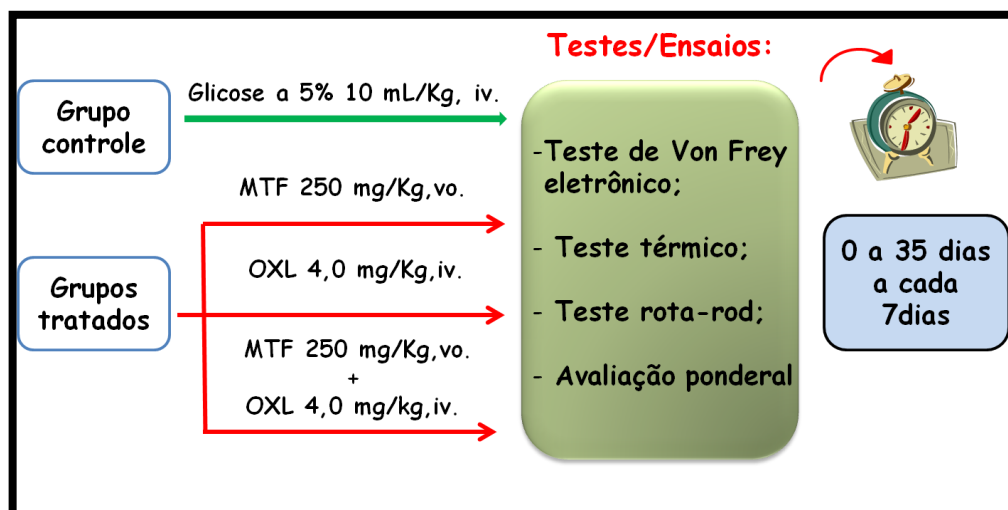
previamente tratados com MTF 250 mg/Kg de animal por via oral 48 horas antes e também durante todo o período de indução da NSP com OXL.

Os animais antes e após o tratamento com MTF e/ou OXL passaram por teste de Von Frey, teste de imersão da cauda, rota-rod e avaliação ponderal. Após 35 dias de experimentos foi realizada a imunofluorescência e microscopia confocal do GRD e ME dos animais como descrito anteriormente (FIGURA 8).

Os animais foram divididos em grupos de 6 animais:

- **Grupo controle:** Os animais foram tratados com glicose a 5%, 10 mL/Kg, iv. por 4,5 semanas.
- **Grupo MTF:** Os animais foram tratados com MTF 250 mg/Kg, vo. diariamente antes e por 4,5 semanas.
- **Grupo MTF + OXL:** Os animais foram tratados com MTF 250 mg/Kg, vo. diariamente por 4,5 semanas seguidas iniciando 48 h antes do tratamento com OXL 4,0 mg/Kg iv., 2x/semana/4,5 semanas.
- **Grupo OXL:** Os animais foram tratados com OXL 4,0 mg/Kg, iv., 2x/semana/4,5 semanas.

Figura 8 – Desenho esquemático do protocolo de indução e avaliação da NSP com OXL em camundongos tratados com MTF



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Testes comportamentais: nociceptivos e de coordenação motora

5.6.1 Teste de hiperalgesia mecânica plantar – Von Frey

O teste de hiperalgesia mecânica plantar (teste de Von Frey) foi utilizado para avaliar através do estímulo mecânico inócuo e crescente a sensibilidade tecidual provocada pelos tratamentos com aloxano e/ou OXL semanalmente por 35 ou 56 dias antes e após os tratamentos.

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem avaliar o aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção (LE BARS *et al.*, 2001).

O teste de hiperalgesia foi aplicado nos camundongos antes e após o tratamento com aloxano (25, 50, 75, 100 ou 125 mg/Kg, iv.), OXL (1,0; 2,0 e 4,0 mg/Kg, iv.) e aloxano combinado com OXL além de seus respectivos grupos controles que receberam salina, glicose 5% ou frutose 5%.

O aparelho de Von Frey eletrônico é um analgesímetro digital composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável 0,5 mm² que estimula diretamente a pata traseira do animal (FIGURA 9). O experimentador foi treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque uma flexão desta pata ou retirada da mesma após o contato com a ponteira. O estímulo foi então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica foi registrada. O experimentador fez ambientação e condicionamento dos animais antes do experimento. Cuidado foi tomado para não estimular o mesmo ponto da pata duas vezes sucessivamente para evitar aprendizagem ou sensibilização dos animais (CUNHA *et al.*, 2004).

As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida “*flinches*” da pata ou lambida estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até o

animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata (CUNHA *et al.*, 2004).

Foram realizadas de três a seis aplicações distintas para cada animal, antes e após os tratamentos já citados, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação da força em gramas (variação da força em gramas), que é o valor mensurado do tempo zero subtraído do valor mensurado nas horas após os tratamentos dos animais.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas acrílicas medindo 12 x 20 x 17 cm, com assoalho formado por uma rede e malhas medindo cerca de 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. As caixas foram mantidas a uma distância de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo a permitir a estimulação mecânica das patas traseiras dos animais.

Todos os animais da pesquisa foram previamente ambientados e condicionados nas caixas acrílicas uma vez por semana durante duas semanas antes dos experimentos por cerca de 2 h para adaptação (LAID *et al.*, 2001).

Figura 9 - Aparelho de Von Frey eletrônico



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.2 Teste de imersão da cauda – TIC

Foi utilizado o teste de imersão da cauda (TIC) para avaliar a alodínia térmica ao frio nos animais. O TIC consistiu em imobilizar o animal através de um contentor de acrílico transparente e depois mergulhar a cauda do animal em água

fria a temperatura de 10°C e mantê-la imersa até que a sua extremidade fosse levantada pelo animal. A duração da imersão da cauda foi registrada em segundos.

Os animais foram ambientados, adaptados ao teste e ao manuseio pelo pesquisador uma vez por semana durante duas semanas antes do experimento (AUTHIER *et al.*, 2009).

A alodinia térmica nos animais foi avaliada semanalmente durante 35 dias antes e após os tratamentos com OXL e/ou MTF.

5.6.3 Teste de coordenação motora forçada – Rota-rod

A coordenação motora (rota-rod) dos animais foi avaliada por meio de um dispositivo que mede a atividade motora forçada (motricidade), através da avaliação do equilíbrio e da coordenação dos animais (DUNHAM; MIYA 1957).

Este método permite avaliar a especificidade da ação nociceptiva de fármacos, verificando se estes promovem incoordenação motora nos animais, seja por sedação e/ou por relaxamento muscular (ROSLAND; HUNSKAAR; HOLE, 1990).

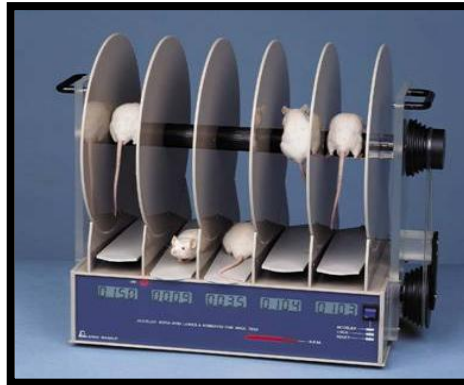
O aparelho de rota-rod consiste em um cilindro rotatório (barra giratória), em acrílico resistente, com raio de espaço de aproximadamente 2,7 cm e altura de 40 cm, motorizado com aceleração progressiva e invariável de 5 a 37 rotações por minuto (rpm). Ele possui 5 baias, com espaço de 3 cm para cada animal, de modo que 5 animais são avaliados por vez. O camundongo deve caminhar continuamente sobre o cilindro em rotação para evitar a queda. As cinco baias possuem sistemas de detecção de queda do animal através de impacto, circuito micro-processado, para cronometragem de permanência do animal na baia e contagem de vezes em que este caiu (FIGURA 10) (INSIGHT, 2003).

Todos os animais foram previamente condicionados no rota-rod 10 rpm uma vez por semana durante duas semanas antes da realização do experimento (INSIGHT, 2003).

A coordenação motora dos animais foi avaliada semanalmente durante todo o período dos experimentos antes e após o tratamento com OXL e/ou MTF.

Todos os testes de comportamento e coordenação motora foram realizados em ambiente com temperatura, iluminação e ruídos controlados. Além disso, os testes/ensaios foram realizados em dias diferentes da semana.

Figura 10- Aparelho de rota-rod



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Avaliação da glicemia

Para a avaliação da glicemia, inicialmente os animais foram previamente anestesiados com tribromoetanol (0,1 mL/10g de animal, ip.) e posteriormente foi retirado cerca de 30-50 μ L de sangue por via iv. de cada animal.

Os níveis de glicemia dos animais foram dosados após jejum de 6 h sempre no período da manhã, quinzenalmente por um período de 60 dias antes e após o tratamento com aloxano ou combinado com OXL.

As dosagens dos níveis de glicemia foram realizadas utilizando um kit glicose-liquiform (Labtest) e aparelho de espectrofotômetro que se fundamentam em método cinético e sistema enzimático.

A hiperglicemia nos animais foi definida como níveis de glicose acima de 200 mg/dL já bastante utilizado em outros estudos com camundongos (BRANCO *et al.*, 2011; LERCO *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 1978; SOMOGLY, 1952).

5.8 Avaliação ponderal

Os animais passaram por avaliação ponderal e seus pesos foram registrados uma vez por semana no turno da manhã com auxílio de uma balança de precisão durante todo o período dos experimentos antes e após os tratamentos com aloxano e/ou combinado com OXL.

5.9 Obtenção de amostras e tecidos

5.9.1 Perfusão intracardiaca, processamento e armazenamento dos tecidos

Após a avaliação dos animais pelos testes comportamentais, coordenação motora, peso e dosagem de glicemia. Foi realizada a perfusão intracardiaca dos animais para a coleta do pâncreas, GRD e ME.

Para a perfusão intracardiaca e remoção do pâncreas, inicialmente os animais foram anestesiados com tribromo (0,1 mL/10g, ip.) e em seguida, a porção torácica do animal foi removida para exposição do coração. Foi introduzida uma agulha estéril de calibre 0,7 X 25 mm, sem bisel, no ventrículo esquerdo cardíaco e foi realizado um pequeno corte na aurícula direita, para o escoamento das soluções. A agulha foi conectada em um equipo macrogotas estéril, sendo os animais perfundidos via intracardiaca com cerca de 40 mL de solução salina 0,9% estéril e em seguida com cerca de 40 mL de paraformaldeído (PFA) 4% ambos na velocidade de 10 mL/min (FIGURA 11).

Após a perfusão com PFA a 4% os animais foram dissecados para a remoção dos pâncreas que foram fixados em formol 10% por 24 h e depois foram desidratados em álcool a 70%, imersos em xilol e incluídos em parafina.

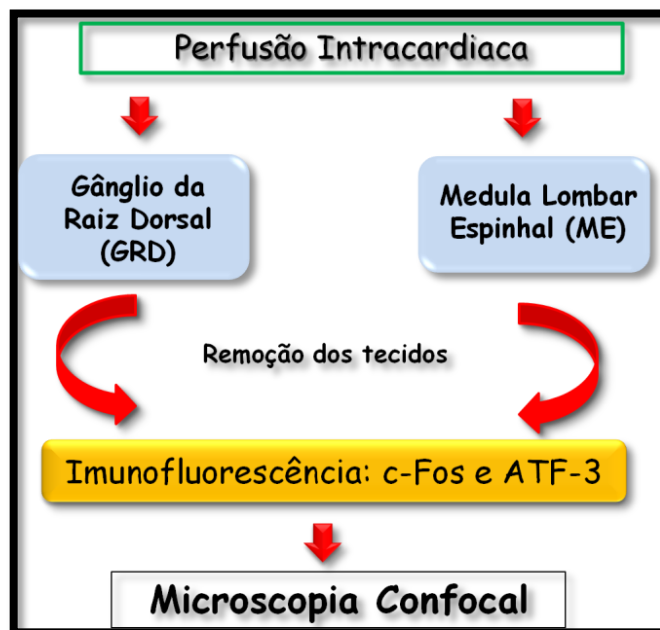
Figura 11 - Desenho esquemático da análise histopatológico do pâncreas



Fonte: Elaborado pelo autor

Logo após a perfusão intracardiaca com uma solução de PFA a 4% os animais foram dissecados para a remoção dos GRD e ME que permaneceram por cerca de 2 horas em formol 10% para a fixação e logo em seguida foram colocados em solução de sacarose a 30% para crioproteção por 48 h a temperatura de 2-8° C. Os GRD e ME foram transferidos para “bliters” de alumínio contendo um meio de conservação e solidificação dos tecidos chamado de OCT (TissueTek) e então foram armazenados a temperatura de -80°C para posterior marcação por imunofluorescência para ATF-3 e c-Fos e observação em microscópio confocal (FIGURA 12).

Figura 12 - Desenho esquemático para imunofluorescência do GRD e medula lombar espinhal



Fonte: Elaborado pelo autor

5.10 Análise histopatológica do Pâncreas

Os blocos com inclusão do pâncreas dos animais foram cortados em espessuras de 4,0 µm e colocados em lâminas e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e depois foram realizadas análises histopatológicas por microscopia óptica (SCHOSSLER *et al.*, 2004).

Os cortes histológicos do pâncreas dos animais foram analisados por observação e quantificação do número de ilhotas de Langerhans e análise da

morfologia das células acinares por microscopia óptica 100x e 400x (YANG *et al.*, 2011).

5.11 Imunofluorescência para c-Fos e ATF-3 em GRD e corno dorsal da medula

Os tecidos previamente congelados em meio OCT (TissueTek) foram cortados no criostato (Leica CM 1850), com espessura de 10 μm para GRD e 20 μm para ME, á temperatura de - 24°C e colocados em lâminas silanizadas próprias para imunoflorescência (FIGURA 13).

Os cortes em lâminas foram fixados por 2 minutos em metanol e ficaram imersas em PBS até o momento de iniciar a imunofluorescência. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato 0,1 M (pH = 6,0), sob aquecimento em forno micro-ondas, por 15 minutos, á temperatura de 95°C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente, por 20 minutos, foi realizada a permeabilização da membrana nuclear para ATF-3 e c-Fos com triton X-100 (0,1%) e foi realizado o bloqueio com albumina sérica (BSA) 5% acrescida de glicina 0,3 M por 30 minutos para todas as lâminas. Os cortes foram lavados com PBS e incubados, durante a noite, á temperatura de 4°C, com o anticorpo primário feito em coelho anti-ATF-3 (Abcam[®]) ou anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology[®]) na diluição de 1:200 em BSA 5%. O controle negativo foi incubado com BSA 5% na ausência de qualquer anticorpo. As lâminas foram lavadas e em seguida incubadas, durante 1 h e 30 minutos, com o anticorpo secundário anti-igG de coelho fluorescente (alexa flúor 568, Invitrogen[®]) na diluição de 1:400 em BSA 5%. Após lavagem, para a marcação dos corpos neuronais, os cortes foram incubados durante 2 h, com anticorpo anti-NeuN conjugado com Alexa Flúor 488 (Merk Millipore) na diluição de 1:100 em BSA 5%. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, montadas com “Prolong Gold” (Invitrogen[®]) e conservadas a 4°C em câmara escura.

Figura 13 - Criostato utilizado para cortes dos GRD e ME de camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.12 Microscopia confocal e análise e quantitativa da marcação de c-Fos e ATF3

As lâminas obtidas do ensaio por imunofluorescência para c-Fos e ATF-3 foram fotografadas no microscópio confocal (LSM 710 Zeiss), observando-se o padrão de ganho, “*offset*” e intensidade de laser uniforme para todos os grupos analisados como mesmo fluoróforo. Obteve-se as imagens em aumento de 200x e 630x no formato TIFF.

A quantificação da área marcada foi feita nas fotos, diferenciando as áreas marcadas (pixels) pela maior saturação de cor associada à marcação (vermelho ou verde). Para isso, foi utilizado o programa Fiji Image J. O procedimento foi baseado na saturação da cor associada a 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 a área total do tecido GRD ou ME (marcação por NeuN), que foi considerado 100%. Os marcadores quantificados foram ATF-3 e c-Fos. Foi utilizado o NeuN 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.

5.13 Análise estatística

Os dados paramétricos 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 (análise de variância) seguida do teste de Bonferroni.

Para os outros dados foi utilizado One-Way Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Todas as análises foram realizadas em software GraphpadPrism 5.0.

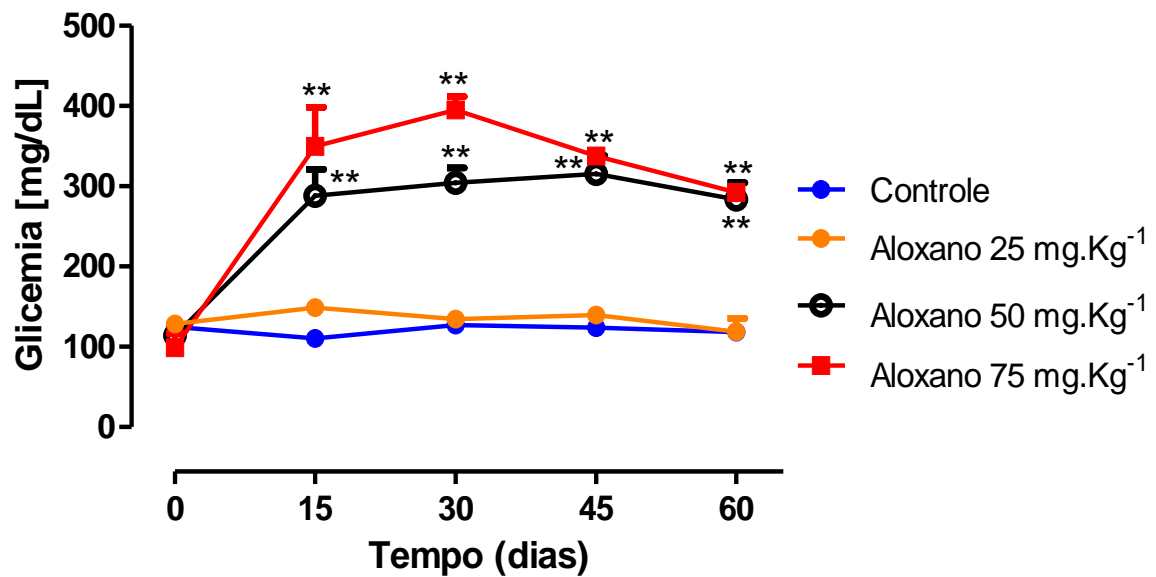
6 RESULTADOS

6.1 1ª Fase: Avaliação da indução do DM-1 em camundongos

6.1.1 *Efeito do aloxano na indução de hiperglicemia*

Os níveis glicêmicos dos animais foram avaliados antes e após os tratamentos com aloxano nas doses de 25, 50, 75, 100 e 125 mg/Kg, iv. durante 60 dias. O tratamento com aloxano nas doses de 50, 75 e 100 mg/Kg, iv. aumentou os níveis glicêmicos (hiperglicemia) nos animais acima do nível normal (> 200 mg/dL) em todos os tempos testados de maneira significativa em comparação com o grupo controle (FIGURAS 14 e 15). O tratamento com aloxano na dose de 25 mg/Kg, iv. não induziu hiperglicemia em nenhum dos tempos testados, comportando-se de maneira semelhante ao grupo controle (FIGURA 14). Já o tratamento com aloxano na dose de 125 mg/Kg, iv. causou hiperglicemia nos animais somente no 15º e 30º dias de maneira significativa em comparação ao grupo controle. Devido à alta mortalidade dos animais induzida por essa dose de aloxano 125 mg/Kg (FIGURA 15), tornou-se inviável a análise em tempos posteriores.

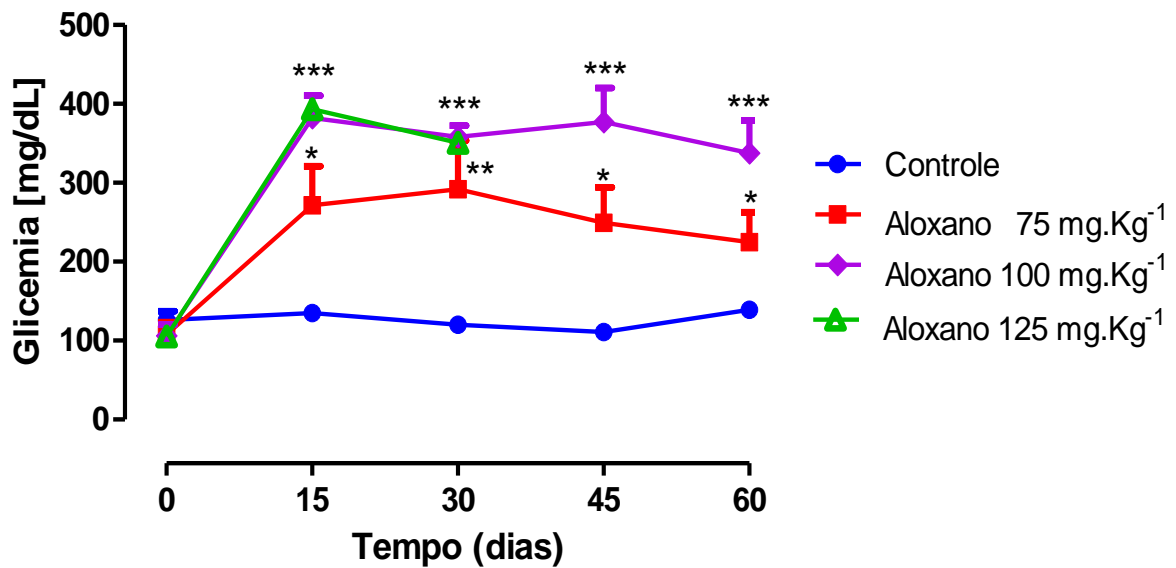
Figura 14 – Efeito de baixas concentrações de aloxano sobre a glicemia de camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa a indução de hiperglicemia em camundongos tratados com baixas doses de aloxano. Os animais receberam única injeção de aloxano nas doses 25; 50; 75 mg/Kg, iv. e um grupo de animais recebeu somente salina. As glicemias de todos os grupos de animais foram medidas antes e após os tratamentos com aloxano nas doses de 25; 50; 75 mg/Kg, iv. e nos tempos (T= 0, 15, 30, 45 e 60 dias) após a indução com aloxano. Os grupos tratados com aloxano são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. **p<0,01. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

Figura 15 - Efeito de altas concentrações de aloxano sobre a glicemia de camundongos



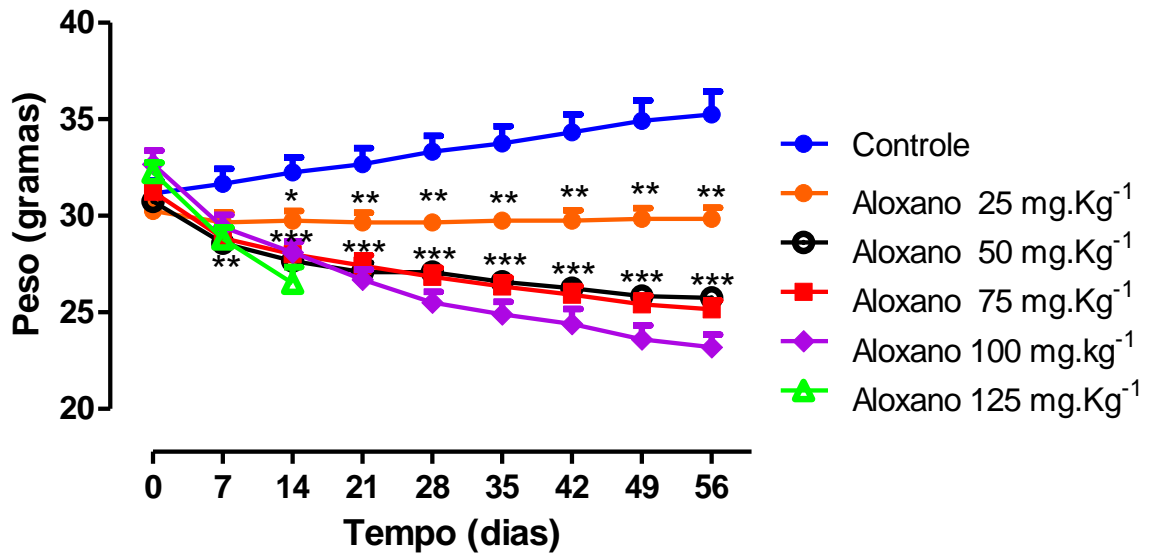
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa a indução de hiperglicemia em camundongos tratados com altas doses de aloxano. Os animais receberam única injeção de aloxano nas doses de 75; 100 e 125 mg/Kg, iv. e um grupo de animais recebeu somente salina. As glicemias de todos os grupos de animais foram medidas antes e após os tratamentos com aloxano nas doses de 75; 100 e 125 mg/Kg, iv. e nos tempos (T= 0, 15, 30, 45 e 60 dias). Os grupos tratados com aloxano são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

6.1.2 Efeito do aloxano sobre o peso dos camundongos

Os pesos dos animais foram avaliados antes e após o tratamento com aloxano. O tratamento com aloxano 25 mg/Kg, iv. diminuiu a massa corporal dos animais a partir do 14^o dia até o 56^o dia em comparação ao grupo controle. Já os tratamentos dos animais com aloxano 50, 75 e 100 mg/Kg, iv. diminuiu a massa corporal dos animais em todos os tempos testados (T= 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o, 42^o, 49^o e 56^o dias, $p < 0,001$) de maneira significativa em comparação com o grupo controle. O tratamento dos animais com aloxano 125 mg/Kg, iv. diminuiu a massa corporal dos animais nos tempos (T= 7^o e 14^o) não sendo possível avaliar tempos posteriores devido a mortalidade dos animais (FIGURA 16).

Figura 16 – Efeito do aloxano sobre os pesos dos camundongos



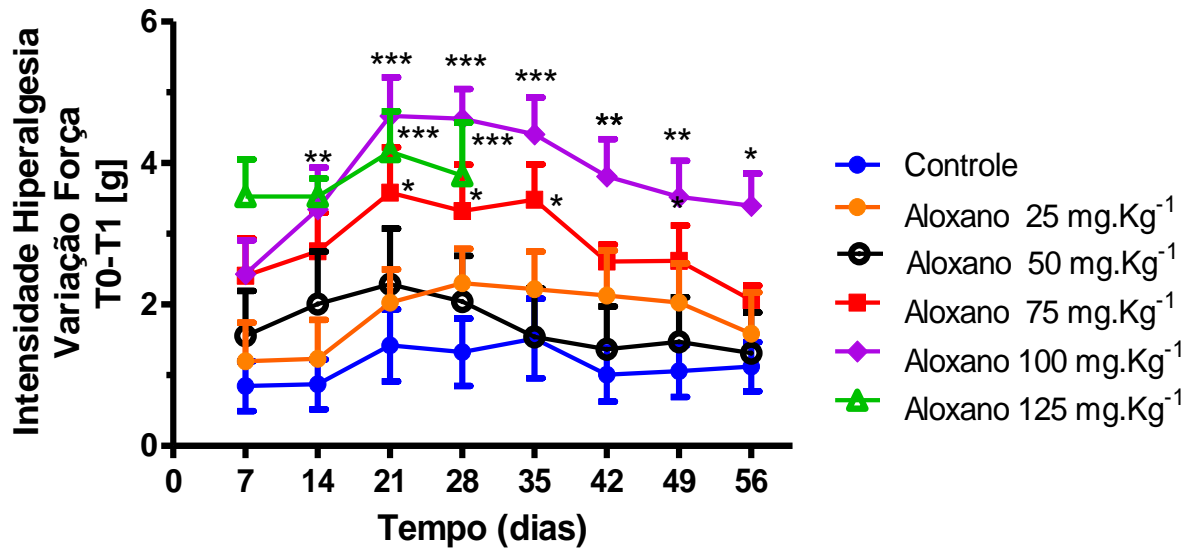
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito do aloxano sobre os pesos dos camundongos. Os animais foram tratados com aloxano 25, 50, 75, 100 e 125 mg/Kg. iv. em injeção única ou salina. Os pesos dos animais foram medidos em todos os grupos antes e após os tratamentos nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias). Os grupos tratados com aloxano são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

6.1.3 Efeito do aloxano sobre a hiperalgesia mecânica plantar em camundongos

As intensidades de hiperalgesia mecânica plantar dos animais foram avaliadas antes e após os tratamentos com aloxano nas doses de 25, 50, 75, 100 e 125 mg/Kg, iv. O tratamento com aloxano nas doses de 75 e 100 mg/Kg, iv. aumentou a intensidade de hiperalgesia mecânica plantar nos animais, respectivamente, a partir do 21^o e 14^o dia de tratamento de maneira significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle. Já o tratamento com aloxano na dose de 125 mg/Kg, iv. somente induziu intensidade de hiperalgesia mecânica plantar, a partir do 14^o até o 28^o dia de maneira significativa ($p < 0,01$) em comparação com o grupo controle. Devido à alta mortalidade dos animais com aloxano na dose de 125 mg/Kg não foi possível obter registros em dias posteriores. Já o aloxano nas doses 25 e 50 mg/Kg, iv. não aumentou a intensidade de hiperalgesia mecânica plantar em nenhum dos tempos testados se comportando de maneira semelhante ao grupo controle (FIGURA 17).

Figura 17 – Efeito do aloxano na hiperalgesia mecânica plantar em camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

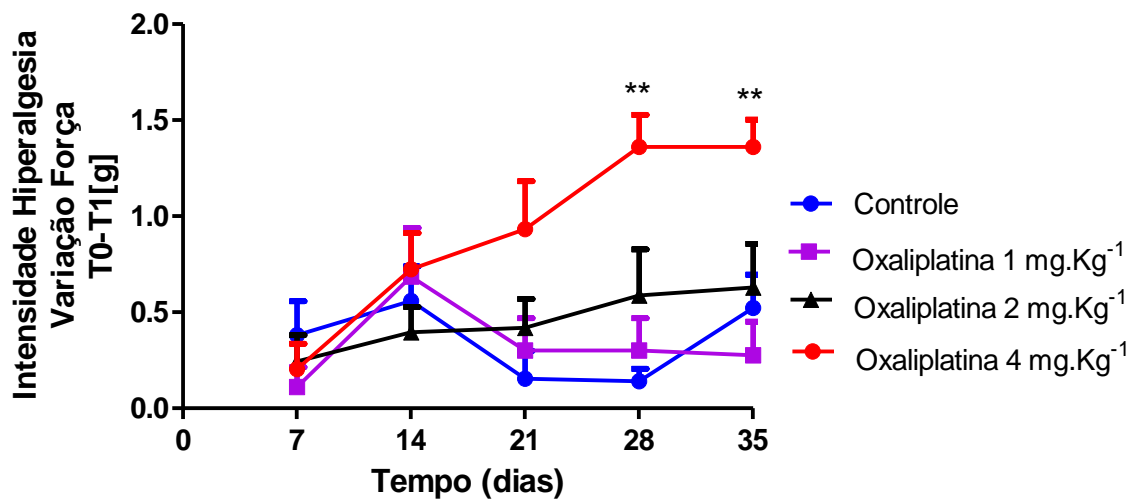
O gráfico representa a indução de hiperalgesia mecânica plantar em camundongos tratados com aloxano. Os animais receberam única injeção de aloxano 25; 50; 75, 100 e 125 mg/Kg, iv., e um grupo de animais recebeu somente salina. A intensidade da hiperalgesia foi medida em todos os grupos antes e após os tratamentos com aloxano nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias). Os grupos tratados com aloxano são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

6.2 2ª Fase: Avaliação da NSP induzida por OXL em camundongos não diabéticos

6.2.1 *Efeito da OXL sobre a hiperalgesia mecânica plantar*

A intensidade da hiperalgesia mecânica plantar dos animais foi avaliada antes e após os tratamentos com OXL nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 mg/Kg, iv.. O tratamento dos animais com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. aumentou a intensidade de hiperalgesia dos animais a partir do 28º até o 35º dia de maneira significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle. Já o tratamento com OXL nas doses de 1,0 e 2,0 mg/Kg, iv. não causaram alterações da intensidade da hiperalgesia nos animais de maneira significativa em comparação ao grupo controle (FIGURA 18).

Figura 18 – Efeito da OXL na intensidade de hiperalgesia mecânica plantar em camundongos



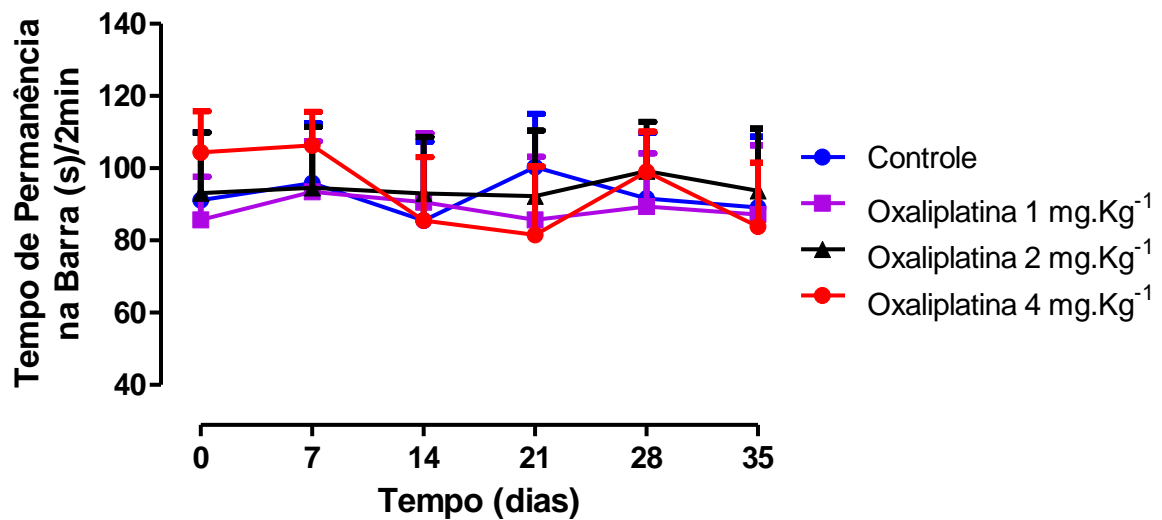
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito da OXL na intensidade de hiperalgesia mecânica plantar dos camundongos. Os animais receberam OXL 1,0; 2,0 ou 4,0 mg/Kg, iv. 2x/semana durante 4,5 semanas e um grupo de animais recebeu somente glicose 5%. A intensidade da hiperalgesia mecânica plantar foi medida em todos os grupos antes e após os tratamentos com OXL 1,0; 2,0 e 4,0 mg/Kg, iv. nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias). Os grupos tratados com aloxano são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. **p<0,01. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

6.2.2 Efeito da OXL sobre a atividade motora forçada (Rota-rod) de camundongos

No teste de rota-rod os tempos de permanência dos animais na barra giratória foram avaliados antes e após os tratamentos com OXL nas doses de 1,0; 2,0 e 4,0 mg/Kg, iv. O tratamento com OXL em todas as doses e tempos testados 0^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o e 35^o dia não alterou o tempo de permanência dos animais na barra giratória de maneira significativa ($p > 0,05$) em comparação com o grupo controle (FIGURA 19).

Figura 19 – Efeito da OXL sobre a atividade motora forçada (Rota-rod) em camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

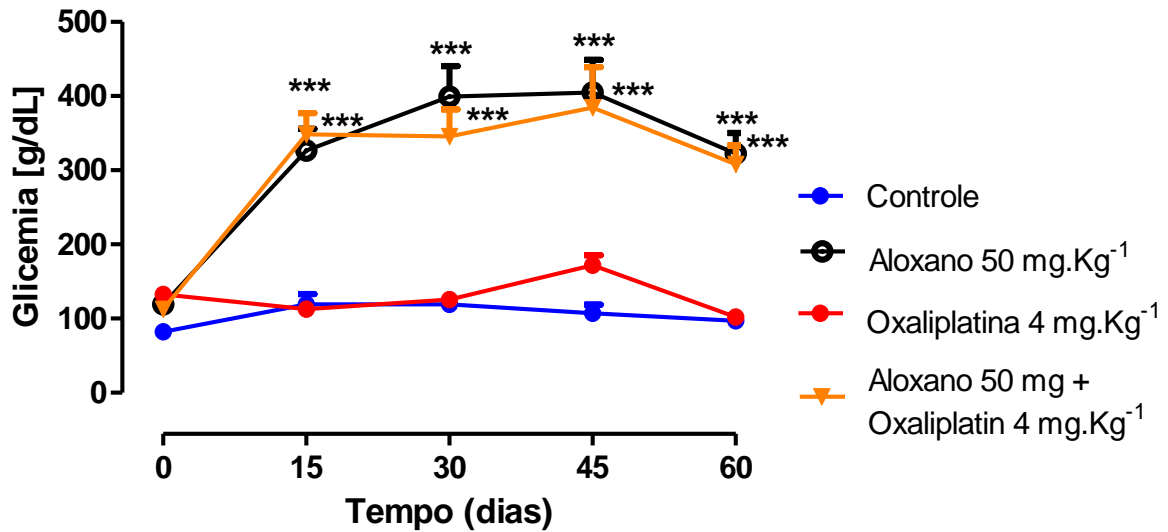
O gráfico representa o efeito da OXL sobre a atividade motora forçada em camundongos. Os animais receberam OXL 1,0; 2,0; ou 4,0 mg/Kg, iv. duas vezes por semana durante 4,5 semanas e um grupo de animais recebeu somente glicose 5%. O tempo de permanência na barra foi medida em todos os grupos antes e após os tratamentos com OXL 1,0; 2,0 e 4,0 mg/Kg, iv. e nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias). Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo de permanência dos animais na barra durante 2 minutos a cada semana em um total de 35 dias. Os grupos tratados com OXL são comparados ao grupo controle e foi considerado $p < 0,05$. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova e Teste de Bonferroni.

6.3 3ª Fase: Avaliação da NSP induzida por OXL em camundongos diabéticos

6.3.1 Avaliação da glicemia

Os níveis glicêmicos dos animais foram avaliados antes e após os tratamentos com aloxano e OXL isolados ou associados. O tratamento com aloxano na dose de 50 mg/Kg, iv. e associado com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. induziu hiperglicemia nos animais em todos os tempos testados a partir do 15º até o 60º dia de maneira significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle. Já o tratamento isolado somente com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. não alterou o perfil glicêmico dos animais em comparação ao grupo controle (FIGURA 20).

Figura 20 – Efeito do aloxano e OXL sobre a glicemia de camundongos



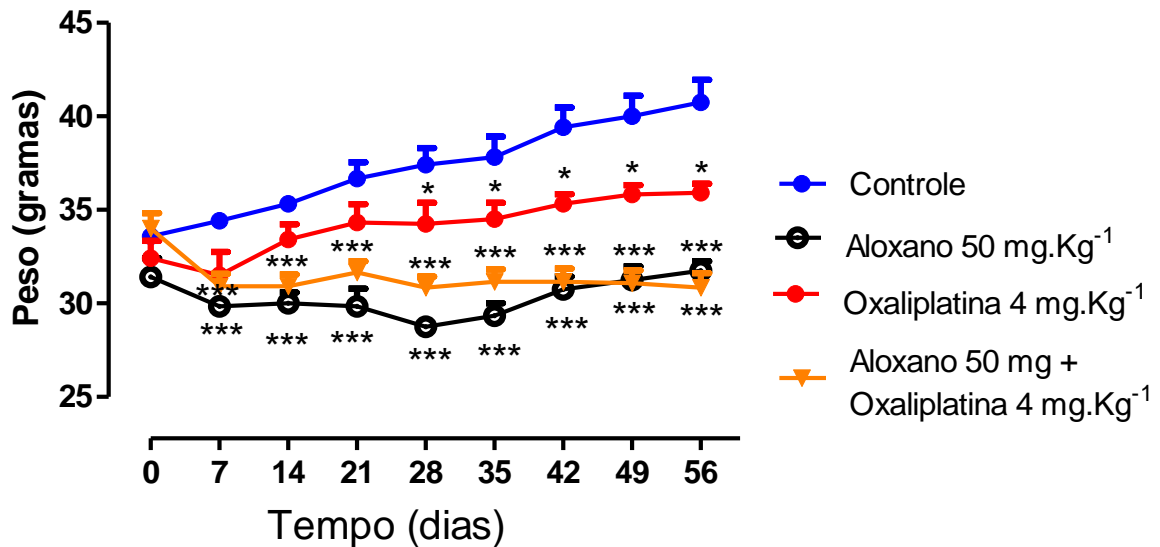
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito do aloxano e OXL sobre a glicemia dos camundongos. Os animais foram tratados com única injeção de aloxano 50 mg/Kg,iv. e um grupo controle recebeu somente frutose 5%.Um grupo de animais recebeu OXL 4,0 mg, iv. por 2x/semana por 4,5 semanas após o tratamento com aloxano e outro grupo recebeu somente OXL 4,0 mg, iv. por 2x/semana por 4,5 semanas. As glicemias dos animais foram avaliadas nos tempos (T= 0, 15, 30, 45 e 60 dias). Os grupos tratados com aloxano são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. ***p<0,001. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

6.3.2 Avaliação ponderal

Os pesos dos animais foram avaliados antes e após os tratamentos com OXL ou aloxano isolados e combinados. O tratamento com aloxano 50 mg/Kg, iv. isolado ou combinado com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv diminuiu os pesos dos animais em todos os tempos testados 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o, 42^o, 49^o e 56^o dia, $p < 0,001$ de maneira significativa em comparação com o grupo controle. Já o tratamento somente com OXL 4 mg/Kg, iv. diminuiu os pesos dos animais a partir do 28^o até o 56^o dia de maneira significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (FIGURA 21).

Figura 21 – Efeito da aloxano e OXL sobre os pesos dos camundongos



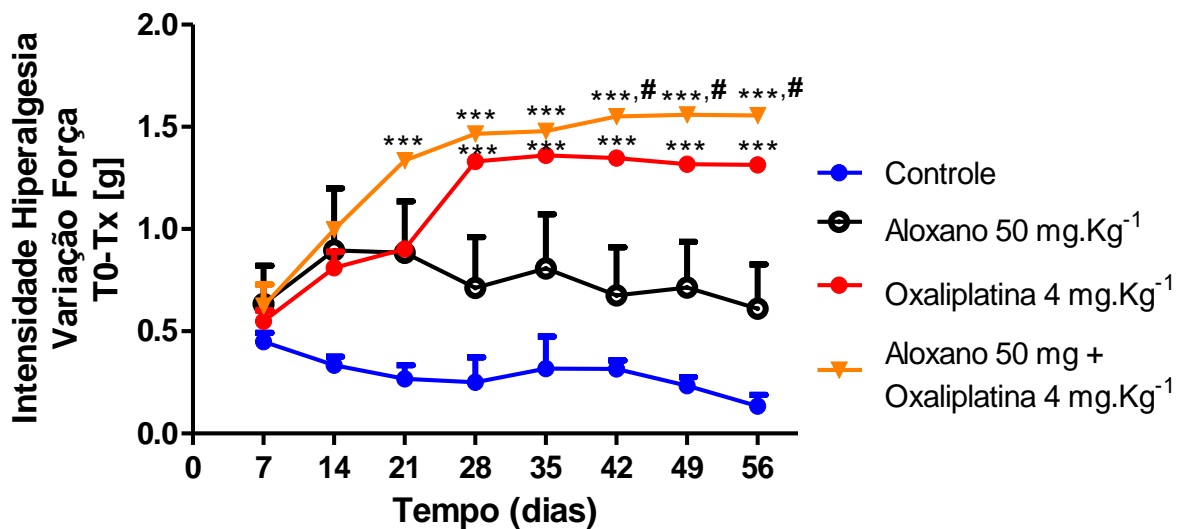
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito do aloxano e OXL sobre os pesos dos camundongos. Os animais foram tratados com aloxano 50 mg/Kg. iv. em injeção única; OXL 4,0 mg/Kg, iv. 2x por semana durante 4,5 semanas; aloxano 50 mg/Kg + OXL 4 mg/Kg, iv. ou frutose 5%. Os pesos dos animais foram medidos em todos os grupos antes e após os tratamentos nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias). Os grupos tratados com aloxano isolado e combinados são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. *p<0,05; ***p<0,001. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

6.3.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica plantar

A intensidade de hiperalgesia dos animais foi avaliada antes e após os tratamentos dos mesmos com aloxano e OXL isolados ou combinados. O tratamento com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. isolado aumentou a intensidade de hiperalgesia dos animais nos tempos 28^o, 35^o, 42^o, 48^o e 56^o dia de maneira significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle. Já o tratamento com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. associado com aloxano 50 mg/Kg, iv. também aumentou a intensidade de hiperalgesia nos animais nos tempos 21^o, 28^o, 35^o, 42^o, 48^o e 56^o dia de maneira significativa ($P > 0,001$) em comparação ao grupo OXL 4,0 mg, antecipando o estabelecimento da hiperalgesia nos animais em sete dias e amplificando a resposta hiperalgésica em comparação ao grupo tratado somente com OXL 4,0 mg/Kg, iv., $P < 0,05$ (FIGURA 22).

Figura 22 – Efeito do aloxano e OXL na hiperalgesia mecânica plantar em camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito do aloxano e OXL na hiperalgesia mecânica plantar dos camundongos. Os animais foram tratados com aloxano 50 mg/Kg. iv. em injeção única; OXL 4,0 mg/Kg, iv. 2x por semana durante 4,5 semanas; aloxano 50 mg/Kg + OXL 4 mg/Kg, iv. ou frutose 5%. A intensidade da hiperalgesia foi medida em todos os grupos antes e após os tratamentos nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias). Os grupos tratados com aloxano isolado e combinados são comparados ao grupo controle e OXL. ***p<0,001 vs controle e #p<0,05 vs OXL. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

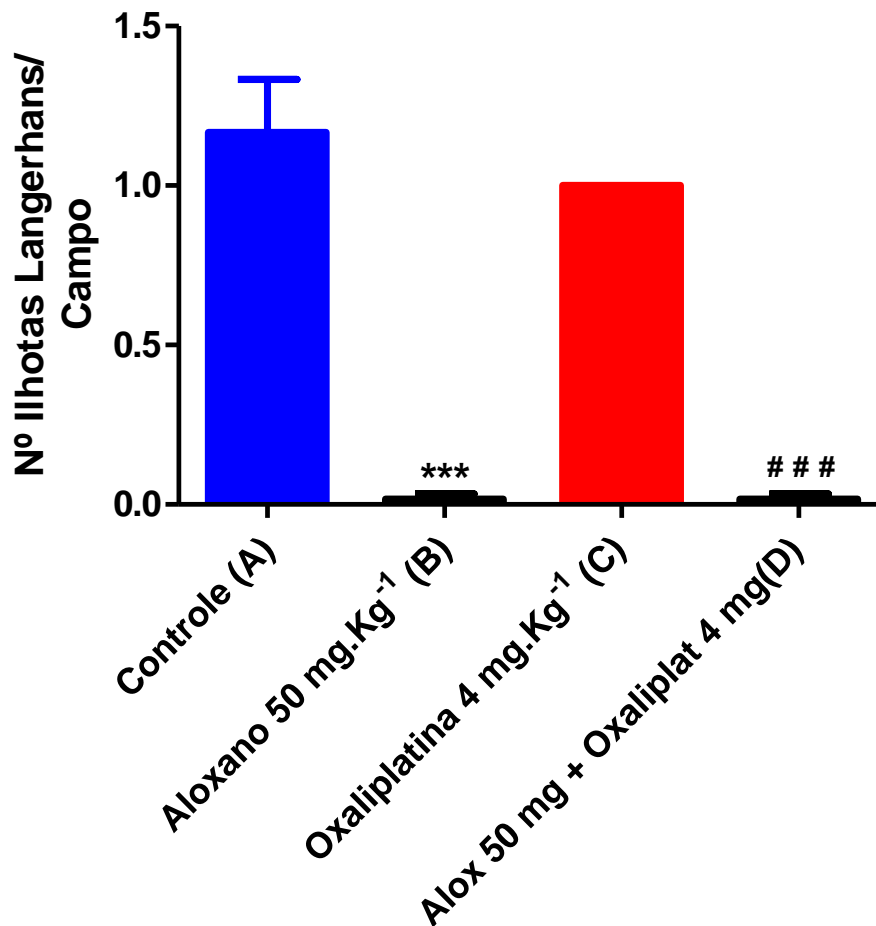
6.3.4 Histopatologia do pâncreas

Na análise quantitativa do N^o de ilhotas de Langerhans. Observamos que o tratamento dos animais com aloxano 50mg/Kg, iv. isoladamente ou combinado com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. diminuiu o N^o de ilhotas de Langerhans do pâncreas dos animais de maneira significativa em comparação ao grupo controle e em relação ao grupo OXL. Já o tratamento dos animais com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. se comportou de maneira semelhante ao grupo controle que recebeu somente frutose a 5% não havendo diferença estatística significativa ente estes grupos (FIGURA 23).

Na análise histopatológica da porção endócrina do pâncreas dos camundongos. Observamos que o aloxano na dose de 50 mg/Kg, iv. (**secção B**) isoladamente ou combinado com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. (**secção D**) causou perda do N^o de ilhotas de Langerhans do pâncreas dos animais em comparação ao grupo controle (**secção A**) e em comparação ao grupo OXL (**secção C**). Já o tratamento dos animais com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. (**secção C**) se comportou de maneira semelhante ao grupo controle que recebeu somente frutose a 5% onde foram observaram a presença de ilhotas de Langerhans em N^o e aspecto histológico normal (FIGURA 24).

Na análise histopatológica da porção exócrina do pâncreas dos camundongos. Observamos que o tratamento com aloxano na dose de 50 mg/Kg, iv. isoladamente (**secção F**) ou combinado com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. (**secção H**) provocou a presença de áreas com intensa basofilia e células acinares com citoplasma basófilo e desarranjo da arquitetura glandular (porção exócrina) em comparação ao grupo controle (**secção E**). Já o tratamento com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. (**secção G**) se comportou de maneira semelhante ao grupo controle, na qual foram observadas a presença de células acinares com arquitetura preservadas e ilhotas de Langerhans histologicamente normais (FIGURA 25).

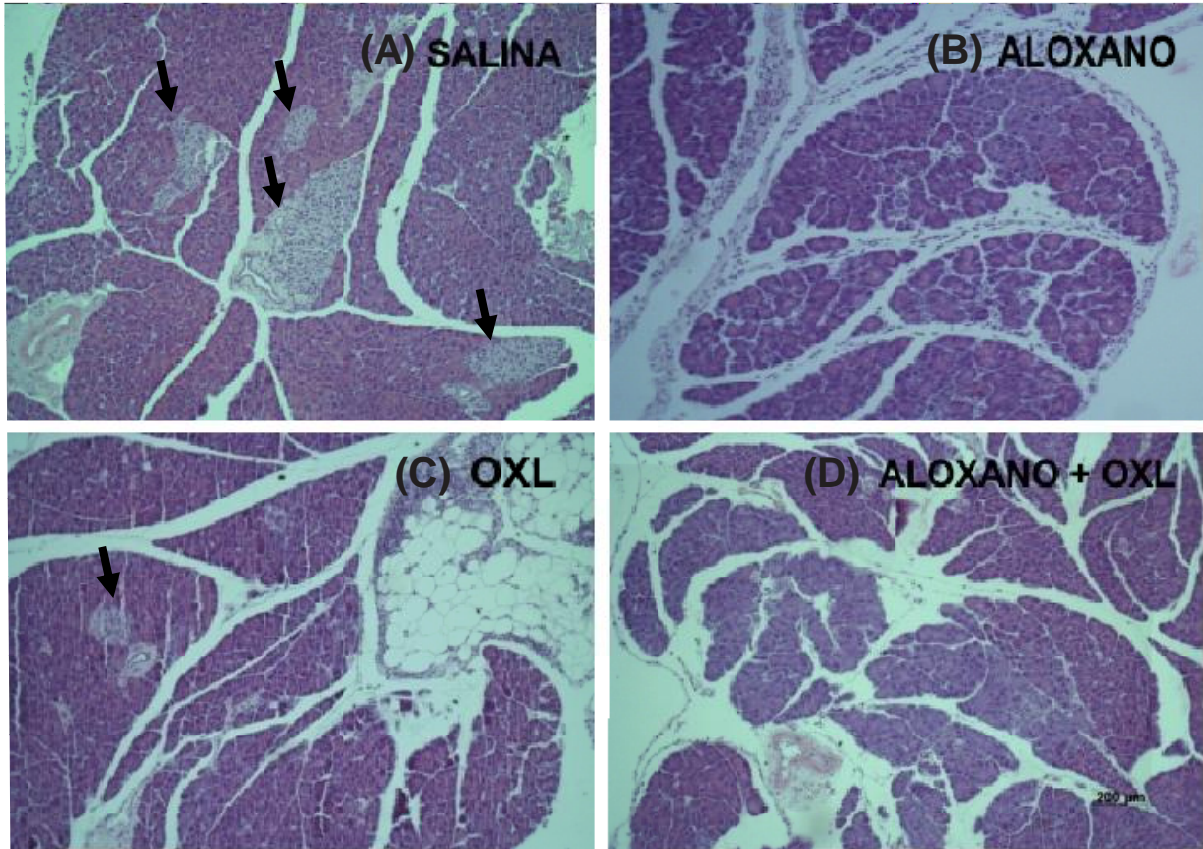
Figura 23 – Efeito do aloxano e OXL sobre o N° de ilhotas de Langerhans do pâncreas de camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito do aloxano isolado e combinado com OXL sobre o número de Ilhotas de Langerhans do pâncreas de camundongos. Um grupo de animais recebeu aloxano 50 mg/Kg. iv. em injeção única. Outro grupo de animais recebeu somente OXL 4,0 mg/Kg, iv. 2x por semana durante 4,5 semanas. Outro grupo de animais recebeu aloxano 50 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg, iv. e um grupo de animais recebeu somente frutose a 5 % (controle). O N° de ilhotas de Langerhans foi quantificada em todos os grupos tratamentos e também no grupo controle. Os grupos tratados com aloxano e combinado com OXL são comparados ao grupo controle e grupo OXL. ***p<0,001 vs controle e ###p<0,001 vs OXL. Realizou-se a análise estatística One-Way por Anova seguido do teste de Newman-Keuls.

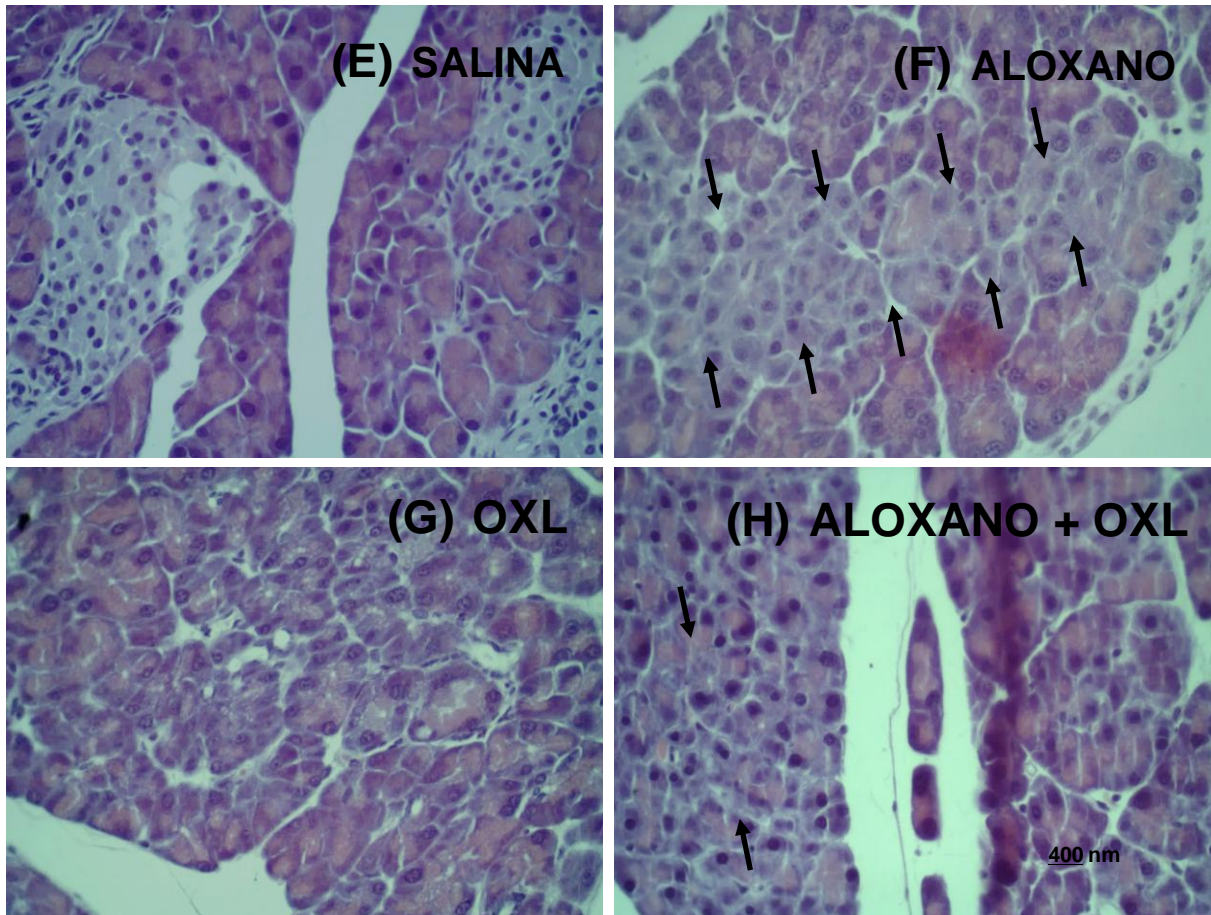
Figura 24– Efeito do aloxano e OXL sobre a porção endócrina do pâncreas de camundongos em parâmetros histopatológicos



Fonte: Elaborado pelo autor.

As imagens representam o efeito do aloxano e OXL em parâmetros histopatológicos sobre a porção endócrina do pâncreas de camundongos. **Seção A** (Salina), as setas indicam a presença de ilhotas de Langerhans com morfologia e N^o normais; **secção B** (Aloxano 50 mg), observa-se a ausência de ilhotas de Langerhans; **secção C** (OXL 4,0 mg), as setas indicam a presença de ilhotas de Langerhans e **secção D** (Aloxano 50 mg + OXL 4,0 mg), não se observa-se a presença de ilhotas de Langerhans. Corado por HE, **aumento 100x**.

Figura 25 – Efeito do aloxano e OXL sobre a porção exócrina do pâncreas de camundongos em parâmetros histopatológicos



Fonte: Elaborado pelo autor.

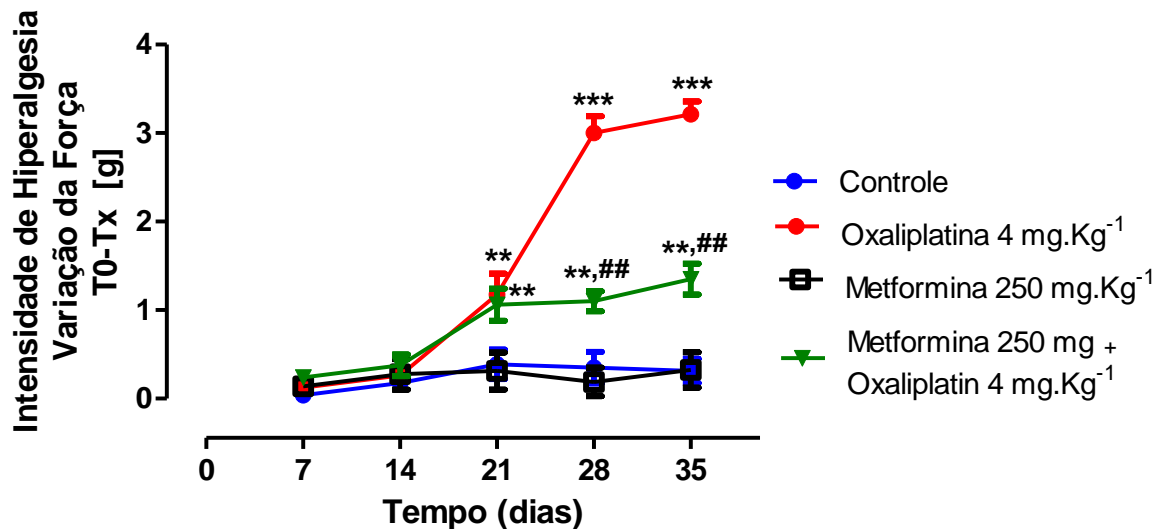
As imagens representam o efeito do aloxano e OXL em parâmetros histopatológicos sobre a porção exócrina do pâncreas de camundongos. Secção E (Salina), secção F (Aloxano 50 mg), as setas indicam a presença de áreas com intensa basofilia e células acinares com arquitetura desarranjadas; secção G (OXL 4,0 mg) e secção H (Aloxano 50 mg + OXL 4,0 mg), as setas indicam a presença de áreas com intensa basofilia e células acinares com arquitetura desarranjadas. Corado por HE, aumento **400x**.

6.4 4ª Fase: Avaliação do efeito protetor da MTF na NSP induzida por OXL em camundongos não diabéticos.

6.4.1 Efeito da MTF sobre a hiperalgesia mecânica plantar

A intensidade de hiperalgesia dos animais foi avaliada antes e após os tratamentos com MTF e OXL isolados ou combinados. O tratamento com o OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. isolado aumentou a intensidade de hiperalgesia a partir do 21º até o 35º dia de maneira significativa ($p < 0,001$) em comparação com o grupo controle. Já o tratamento com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, iv. associado com MTF 250 mg/Kg, vo. diminuiu a intensidade de hiperalgesia nos animais a partir do 21º até o 35º dia de maneira significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo OXL (FIGURA 26).

Figura 26 – Efeito da MTF e OXL na hiperalgesia mecânica plantar em camundongos



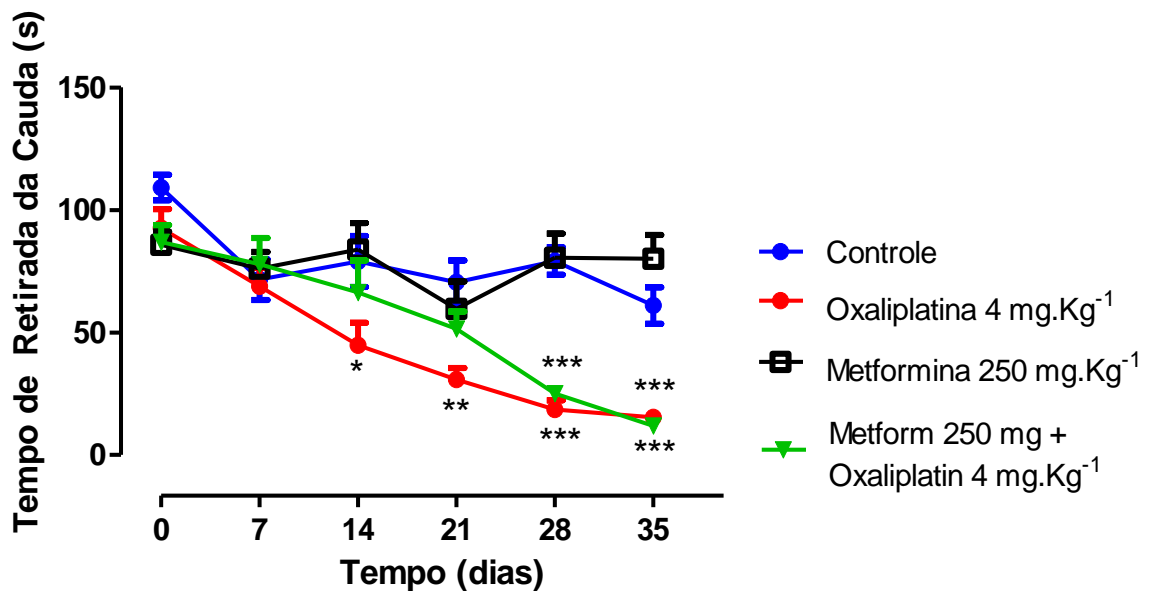
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito da MTF e OXL na hiperalgesia mecânica plantar em camundongos. Um grupo de animais recebeu somente OXL 4,0 mg/Kg, iv. 2x por semana durante 4,5 semanas. Outro grupo de animais recebeu somente MTF 250 mg/Kg, vo. Outro grupo de animais recebeu MTF 250 mg/Kg, vo. + OXL 4,0 mg/Kg, iv. e um grupo controle recebeu somente glicose 5%. A intensidade da hiperalgesia foi medida em todos os grupos antes e após os tratamentos nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias). Os grupos tratados com MTF isolado e combinados são comparados ao grupo controle e OXL. ^{**}p<0,01 vs controle; ^{***}p<0,001 vs controle e ^{##}p<0,01 vs OXL. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova seguido do teste de Bonferroni.

6.4.2 Efeito da MTF sobre a alodínia térmica ao frio

A alodínia térmica pelo frio foi avaliada através do teste de imersão da cauda dos animais em temperatura de 10°C semanalmente por um período de 35 dias em camundongos submetidos a injeção de OXL 4,0 mg/Kg, iv. isoladamente e combinada com MTF 250 mg/Kg, vo. No grupo tratado somente com OXL houve diminuição no tempo em segundos de retirada da cauda dos animais a partir do 14º até o 35º dias de forma significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. Já o tratamento do grupo com OXL combinado com MTF diminuiu o tempo em segundos de retirada da cauda dos animais a partir do 28º até o 35º dia de forma significativa ($p < 0,001$) em comparação ao grupo OXL (FIGURA 27).

Figura 27 – Efeito da MTF sobre a alodínia térmica ao frio em camundongos com NSP induzida por OXL



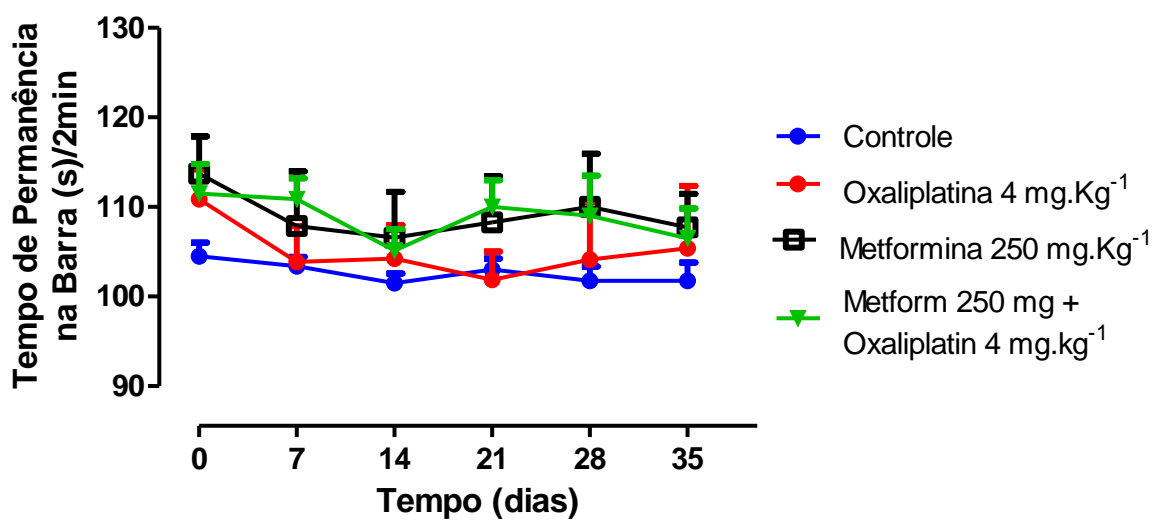
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representa o efeito da MTF e OXL na alodínia térmica ao frio em camundongos. Um grupo de animais recebeu somente OXL 4,0 mg/Kg, iv. 2x por semana durante 4,5 semanas. Outro grupo de animais recebeu somente MTF 250 mg/Kg, vo. Outro grupo de animais recebeu MTF 250 mg/Kg, vo. + OXL 4,0 mg/Kg, iv. e um grupo controle recebeu somente glicose 5%. O tempo de permanência da cauda dos animais foi medida em todos os grupos antes e após os tratamentos nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias). Os valores representam a média ± E.P.M do tempo de permanência das caudas dos animais ao frio durante 2 minutos a cada semana em um total de 35 dias. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. Os grupos tratados com MTF isolado e combinado com OXL são comparados ao grupo controle. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova e Teste de Bonferroni.

6.4.3 Efeito da MTF sobre a atividade motora forçada (Rota-rod)

No teste de Rota-rod os tempos de permanência dos animais na barra giratória foram avaliados antes e após os tratamentos com OXL 4,0 mg/Kg, iv. isolada e combinado com MTF 250 mg/Kg, vo. O tratamento dos animais com OXL isoladamente e combinado com MTF em todos os tempos testados não alterou o tempo de permanência dos animais na barra giratória de maneira significativa ($p>0,05$) em comparação com o grupo controle e MTF (FIGURA 28).

Figura 28 – Efeito MTF sobre a atividade motora forçada (Rota-rod) de camundongos tratados com OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

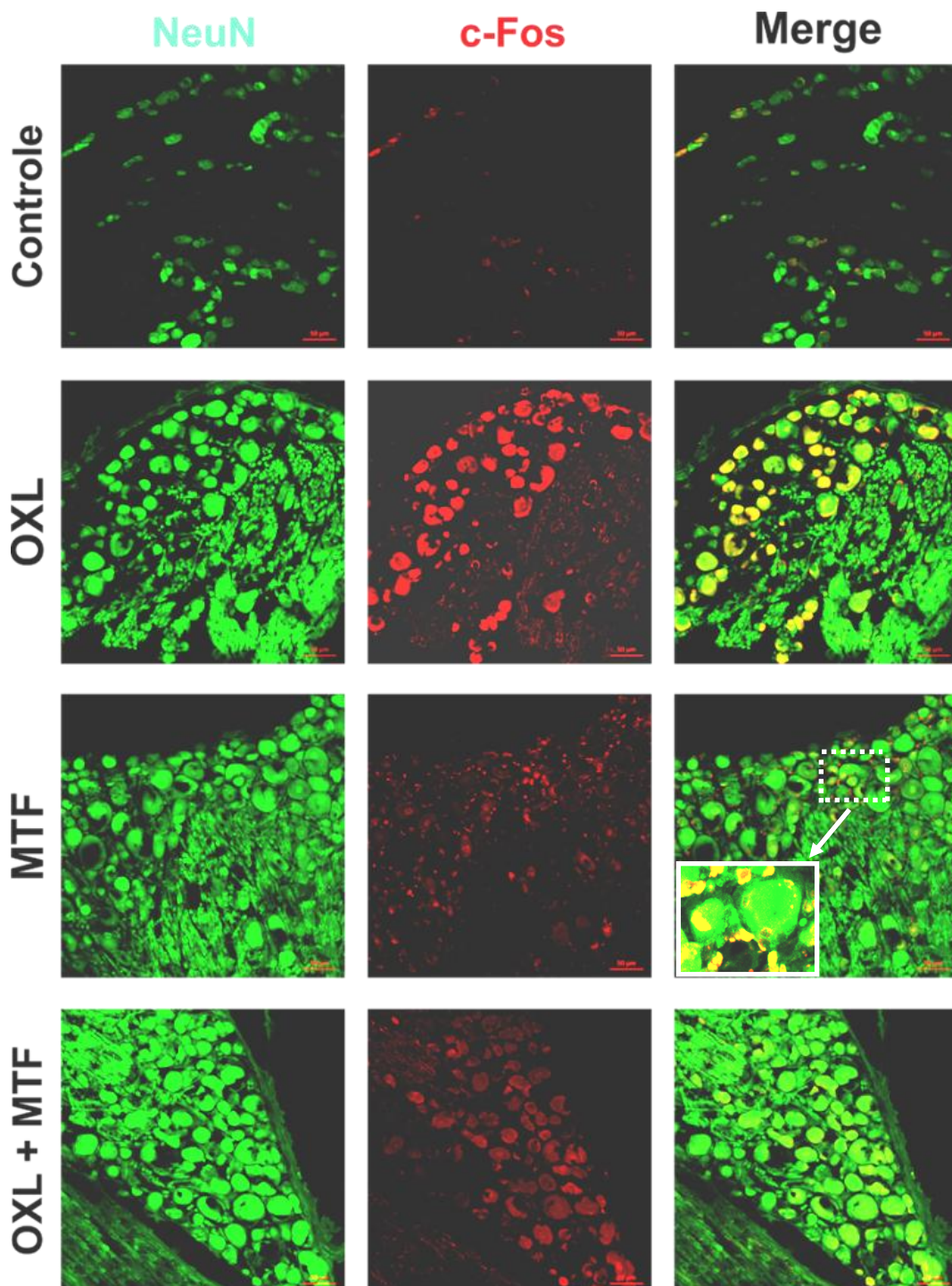
O gráfico representa o efeito da MTF e OXL sobre a atividade motora forçada dos camundongos. Um grupo de animais recebeu somente OXL 4,0 mg/Kg, iv. 2x por semana durante 4,5 semanas. Outro grupo de animais recebeu somente MTF 250 mg/Kg, vo. Outro grupo de animais recebeu OXL 4,0 mg/Kg, iv. + MTF 250 mg/Kg, vo. e um grupo controle recebeu somente glicose 5%. O tempo de permanência na barra foi medida em todos os grupos antes e após os tratamentos nos tempos (T= 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias). Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo de permanência dos animais na barra giratória durante 2 minutos a cada semana em um total de 35 dias. Os grupos tratados com MTF isolado e combinado com OXL são comparados ao grupo controle, foi considerado significativo $p < 0,05$. Realizou-se a análise estatística por Two-Way Anova e Teste de Bonferroni.

6.4.4 Análise da Imunofluorescência para c-Fos em GRD de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL

Na imunoflorescência para c-Fos no GRD foi observado um aumento da imunoexpressão de OXL 4,0 mg/Kg, iv, em experimento de 35 dias, comparado ao grupo controle que recebeu somente veículo uma solução de glicose a 5%. Já os grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg, houve uma diminuição da imunoexpressão de c-Fos no GRD em comparação ao grupo OXL. Adicionalmente observamos na área ampliada indicado pela seta no grupo MTF a presença de células satélites em quantidades bem mais expressivas do que nos outros grupos tratados (FIGURA 29).

Na análise quantitativa da imunoexpressão para c-Fos no GRD, a quantificação da área marcada aumentou de maneira significativa tanto nos grupos tratados com OXL 4,0 mg/Kg em comparação ao grupo controle como nos grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg em comparação ao grupo OXL 4,0 mg/Kg (FIGURA 30).

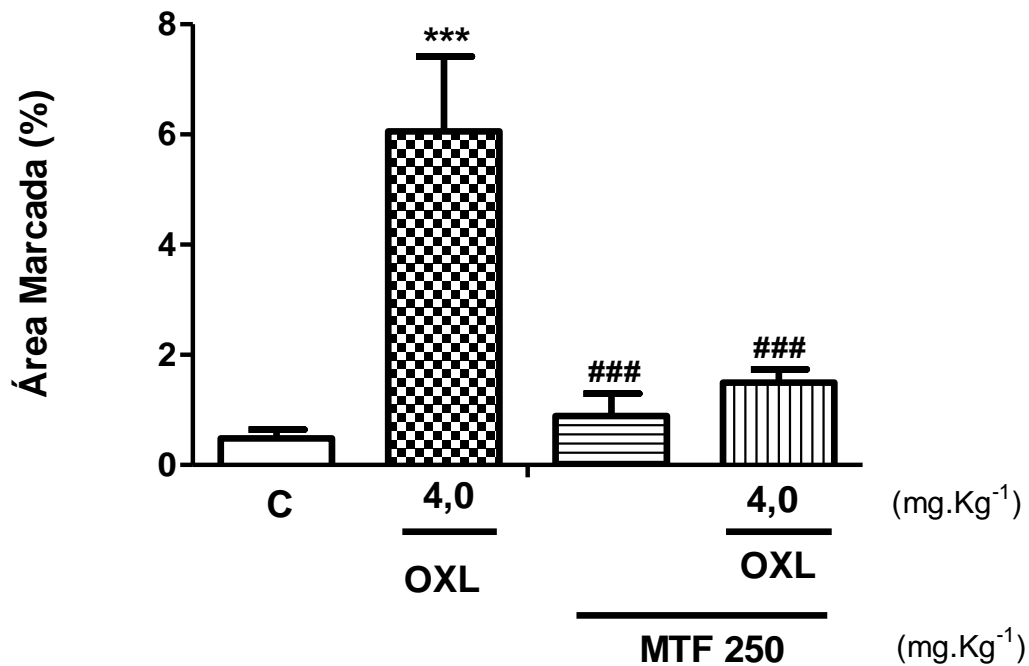
Figura 29 – Fotomicrografia da imunopressão para c-Fos no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Prancha representa o efeito da MTF e OXL no GRD de camundongos. Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; amarelo: fusão; OXL: oxaliplatina; MTF: metformina; Área ampliada com marcação na cor branca: células satélites em cor amarela. Experimento de 35 dias. Foto representativa de um animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Figura 30 – Análise quantitativa da imunoposição para c-Fos no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

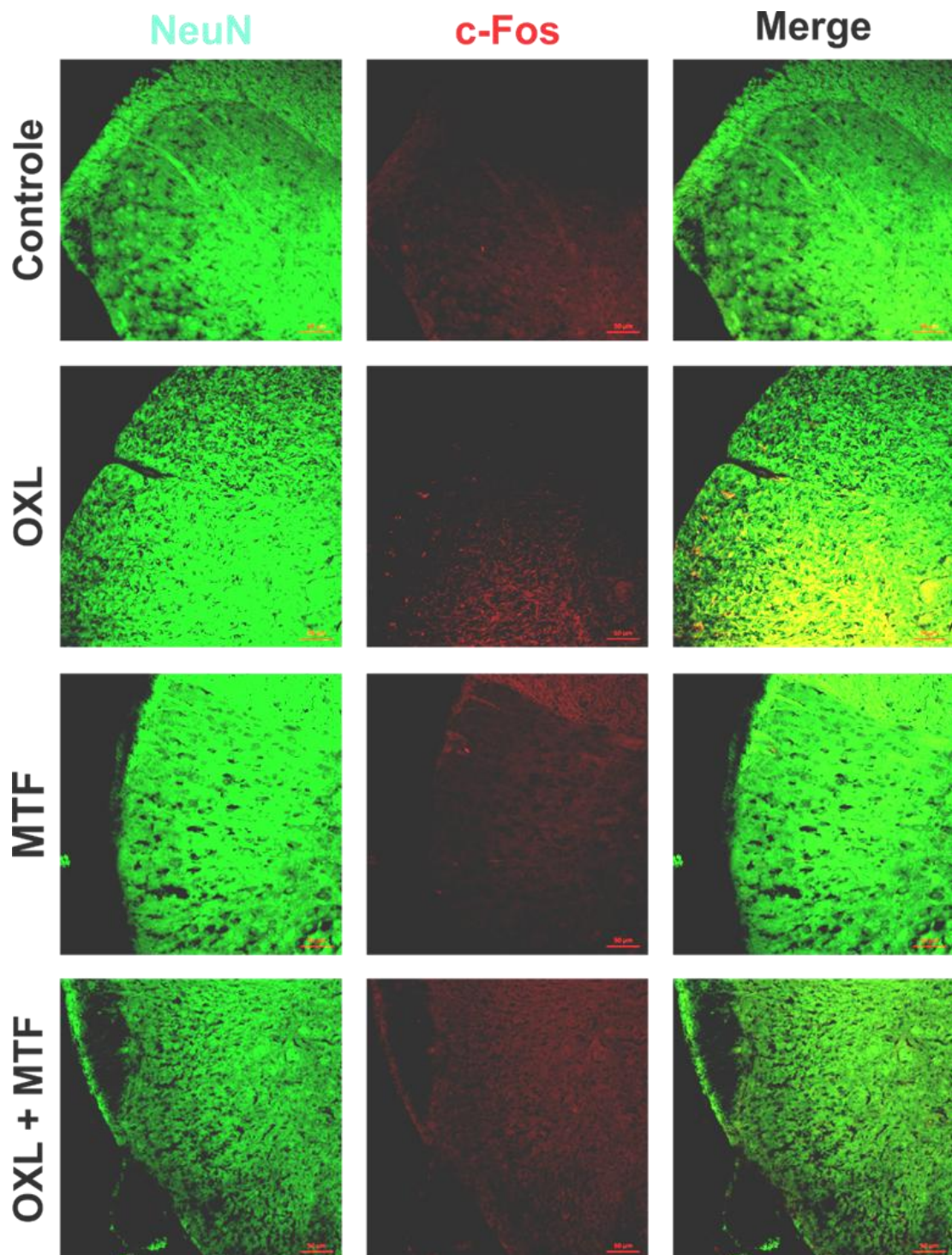
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunoposição de c-Fos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com MTF, OXL e MTF + OXL são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com MTF e MTF + OXL também são comparados ao grupo OXL. *** $p < 0,001$ vs controle e ### $p < 0,001$ vs OXL. Experimento de 35 dias. Realizou-se a análise estatística por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

6.4.5 Análise da Imunofluorescência para c-Fos em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL

Na imunofluorescência para c-Fos no corno dorsal da ME não foi observado um aumento da imunoexpressão de OXL 4,0 mg/Kg, iv, em experimento de 35 dias, comparado ao grupo controle que recebeu somente veículo uma solução de glicose a 5%. Nos grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg, também não houve diminuição da imunoexpressão de c-Fos no GRD em comparação ao grupo OXL (FIGURA 31).

Na análise quantitativa da imunoexpressão para c-Fos no corno dorsal da ME, a quantificação da área marcada não houve diferença significativa nem nos grupos tratados com OXL 4,0 mg/Kg em comparação ao grupo controle nem nos grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg em comparação ao grupo OXL 4,0 mg/Kg (FIGURA 32).

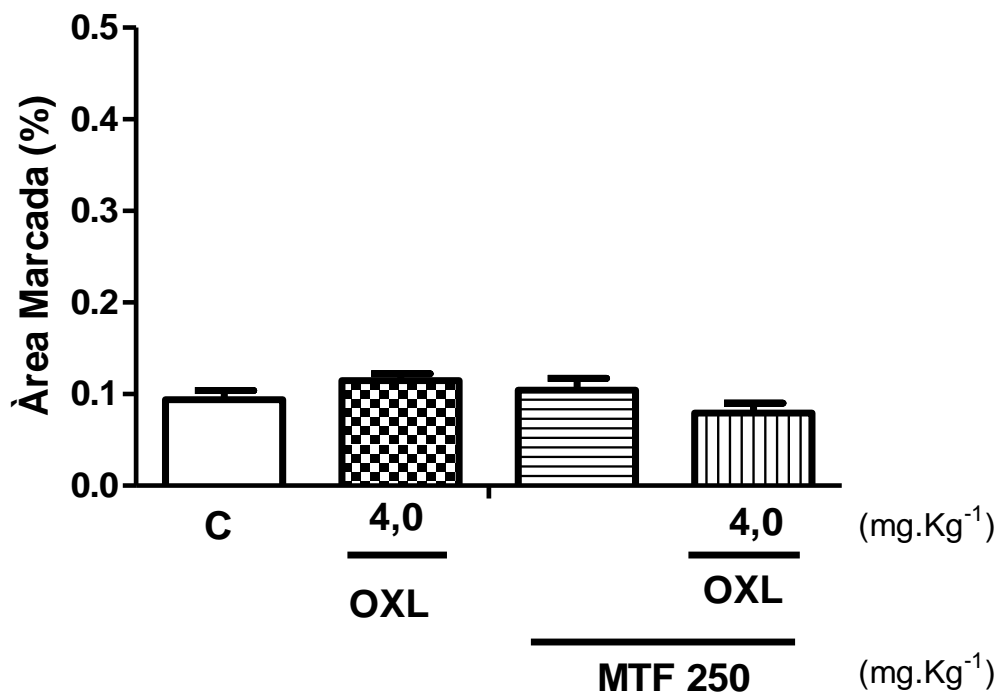
Figura 31 – Fotomicrografia da imunopressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Prancha representa o efeito da MTF e OXL na ME de camundongos. Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: c-Fos; amarelo: fusão; OXL: oxaliplatina; MTF: metformina. Experimento de 35 dias. Foto representativa de um animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Figura 32 – Análise quantitativa da imunexpressão para c-Fos no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

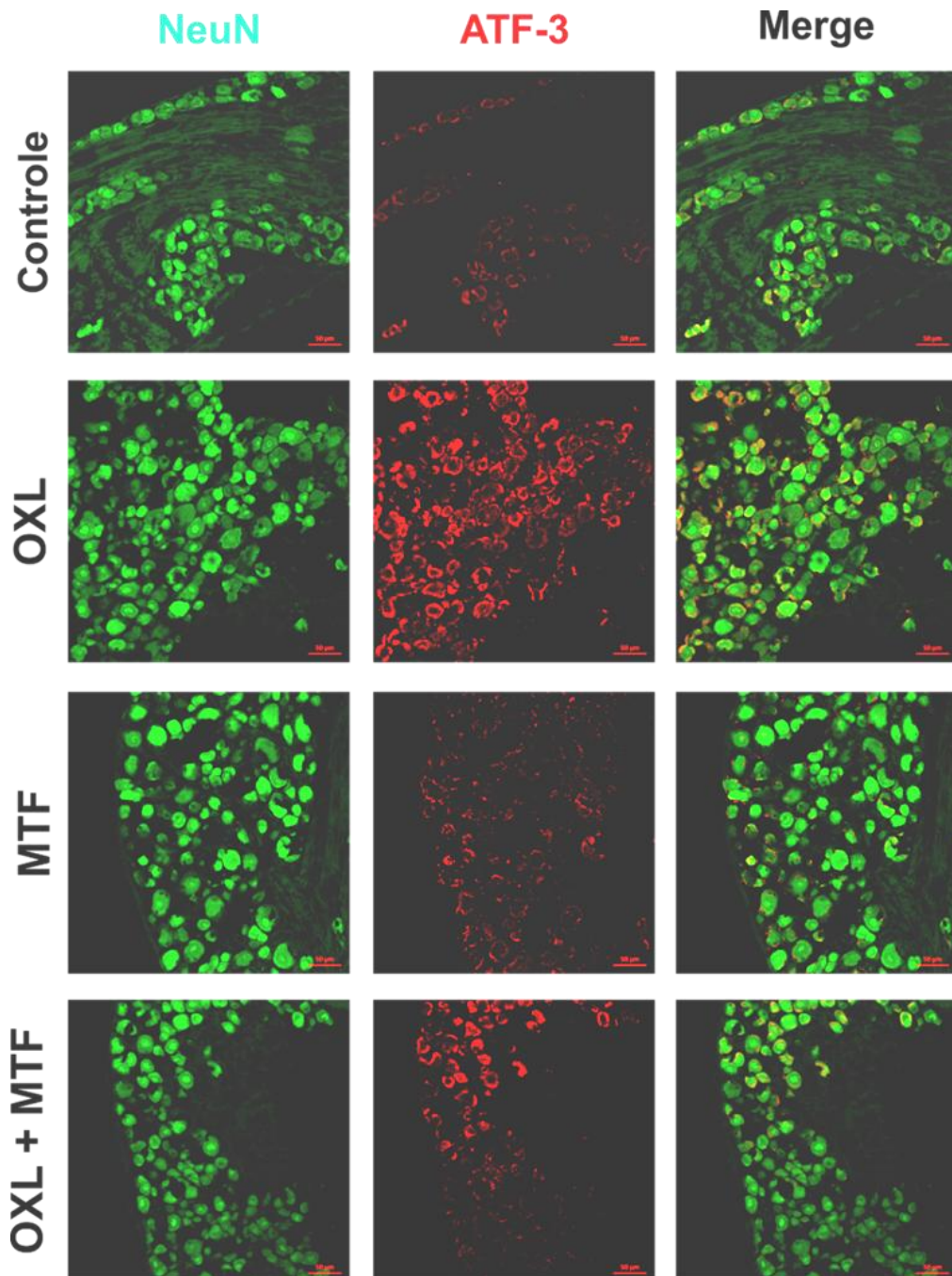
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunexpressão de c-Fos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com MTF, OXL e MTF + OXL são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com MTF e MTF + OXL também são comparados ao grupo OXL. $p > 0,05$ vs controle e $p > 0,05$ vs OXL. Experimento de 35 dias. Realizou-se a análise estatística por Anova seguido do teste de Newman-Keuls.

6.4.6 Análise da Imunofluorescência para ATF-3 em GRD de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL

Na imunofluorescência para ATF-3 no GRD foi observado um aumento da imunoexpressão de OXL 4,0 mg/Kg, iv, em experimento de 35 dias, comparado ao grupo controle que recebeu somente veículo uma solução de glicose a 5%. Já os grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg, houve uma diminuição da imunoexpressão de ATF-3 no GRD em comparação ao grupo OXL (FIGURA 33).

Na análise quantitativa da imunoexpressão para ATF-3 no GRD, a quantificação da área marcada aumentou de maneira significativamente nos grupos tratados com OXL 4,0 mg/Kg em comparação ao grupo controle. Já nos grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg houve uma diminuição da imunoexpressão de ATF-3 no GRD em comparação ao grupo OXL 4,0 mg/Kg (FIGURA 34).

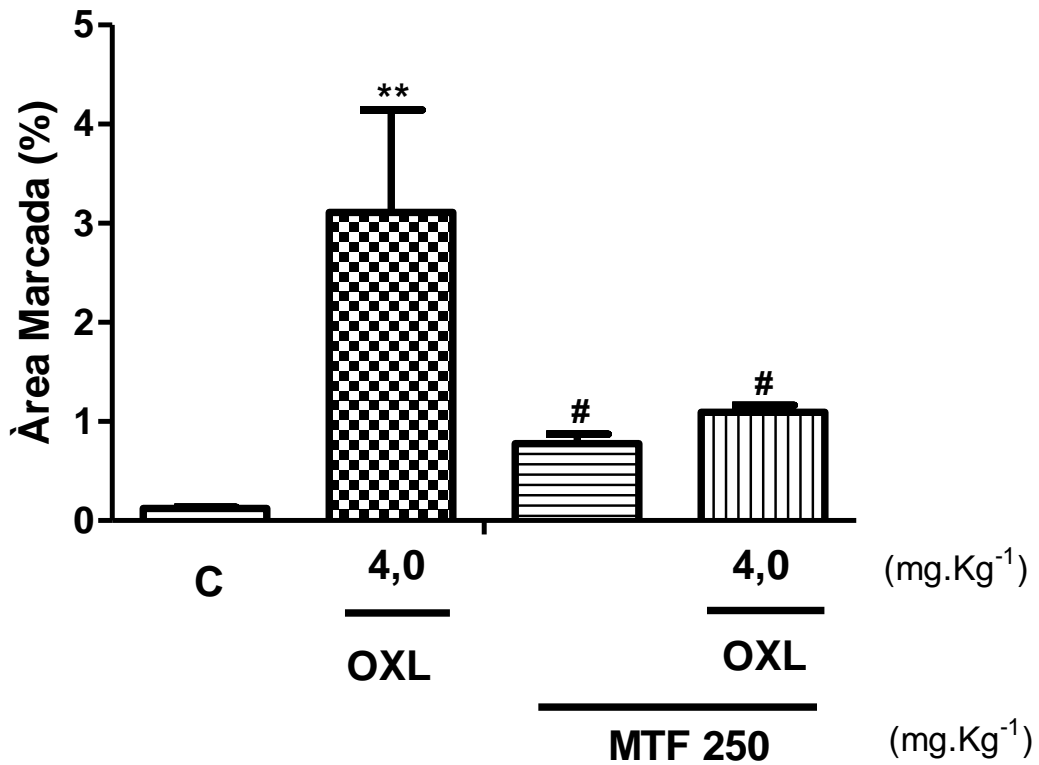
Figura 33 – Fotomicrografia da imunoexpressão para ATF-3 no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Prancha representa o efeito da MTF e OXL no GRD de camundongos. Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; amarelo: fusão; OXL: oxaliplatina; MTF: metformina. Experimento de 35 dias. Foto representativa de um animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Figura 34 – Análise quantitativa da imunopressão para ATF-3 no GRD de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

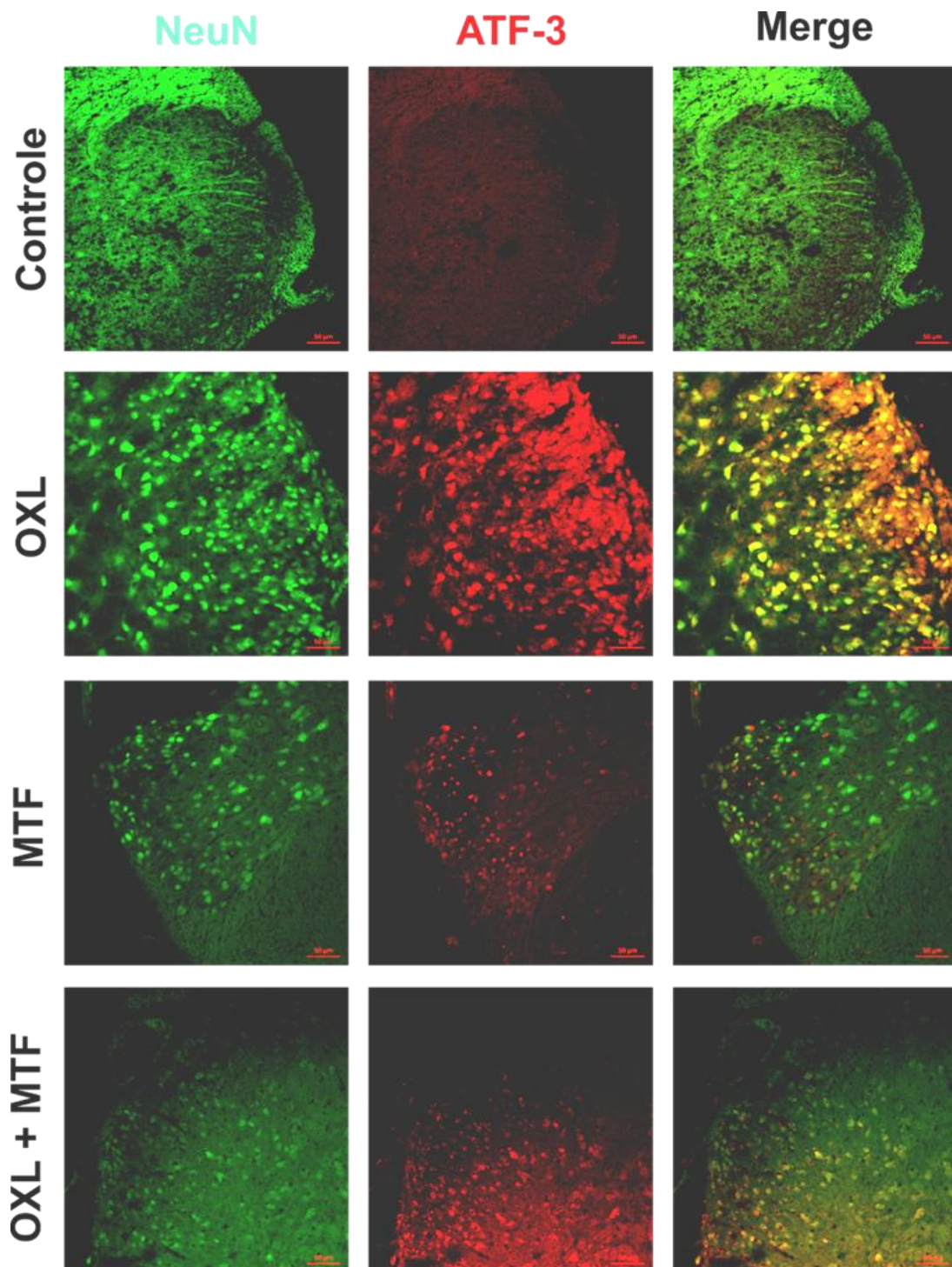
O gráfico representa a quantificação da área marcada pela imunopressão de ATF-3. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com MTF, OXL e MTF + OXL são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com MTF e MTF + OXL também são comparados ao grupo OXL. ** $p < 0,01$ vs controle e # $p < 0,05$ vs OXL. Experimento de 35 dias. Realizou-se a análise estatística por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

6.4.7 Análise da Imunofluorescência para ATF-3 em corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos a tratamentos com MTF e OXL

Na imunofluorescência para ATF-3 no corno dorsal da medula lombar espinhal foi observado um aumento da imunoexpressão de OXL 4,0 mg/Kg, iv, em experimento de 35 dias, comparado ao grupo controle que recebeu somente veículo uma solução de glicose a 5%. Já os grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg, houve uma diminuição da imunoexpressão de ATF-3 no corno dorsal da medula lombar espinhal em comparação ao grupo OXL (FIGURA 35).

Na análise quantitativa da imunoexpressão para ATF-3 no corno dorsal da medula lombar espinhal, a quantificação da área marcada aumentou de maneira significativamente tanto nos grupos tratados com OXL 4,0 mg/Kg em comparação ao grupo controle como nos grupos tratados com MTF 250 mg/kg, vo. e MTF 250 mg/Kg + OXL 4,0 mg/Kg em comparação ao grupo OXL 4,0 mg/Kg (FIGURA 36).

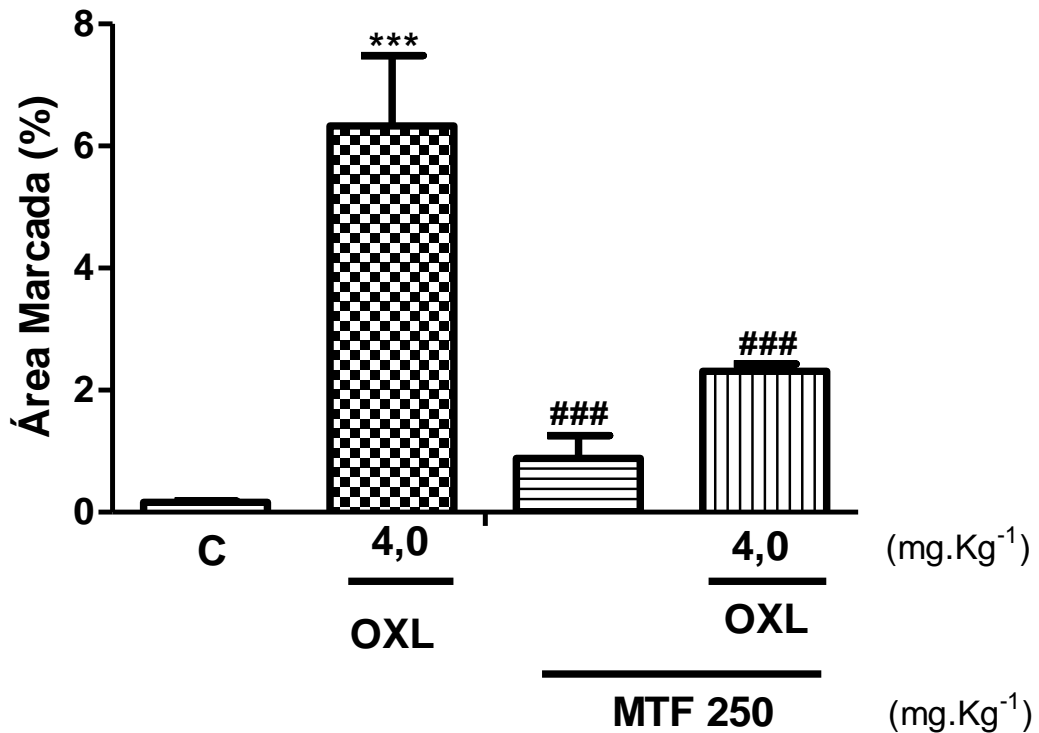
Figura 35 – Fotomicrografia da imunoexpressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Prancha representa o efeito da MTF e OXL na ME de camundongos. Verde: NeuN (marcador de neurônio); vermelho: ATF-3; amarelo: fusão; OXL: oxaliplatina; MTF: metformina. Experimento de 35 dias. Foto representativa de um animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

Figura 36 – Análise quantitativa da imunopressão para ATF-3 no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com MTF e OXL



Fonte: Elaborado pelo autor.

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 MTF, OXL e MTF + OXL são comparados ao grupo controle (veículo). Os grupos tratados com MTF e MTF + OXL também são comparados ao grupo OXL. *** $p < 0,001$ vs controle e ### $p < 0,001$ vs OXL. Experimento de 35 dias. Realizou-se a análise estatística por Anova seguido do teste de Newman-Keuls.

Quadro 2 – Resumo dos resultados da imunofluorescência realizadas no GRD e ME em camundongos

Resultados da Imunofluorescência				
Experimento	Imunoexpressão			
35 dias	c-Fos		ATF-3	
Grupos	GRD	ME	GRD	ME
Controle	N	N	N	N
OXL	A	N	A	A
MTF	P	N	P	P
OXL + MTF	D	N	D	D

Não houve (N); Aumentada (A); Diminuída (D); Pouca (P)

Fonte: Elaborado pelo autor.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado de forma inédita que a NSP induzida por OXL foi antecipada em camundongos com DM induzido por aloxano. Além disso, observamos uma amplificação da NSP quando administramos OXL em camundongos diabéticos em comparação aos animais não diabéticos com NSP induzida somente com OXL. Adicionalmente o tratamento dos camundongos com MTF mostrou ser efetivo na diminuição da intensidade da hiperalgesia mecânica plantar e no retardo do tempo de retirada da cauda dos animais nos testes de Von Frey e TIC. No modelo de indução de NSP com OXL além da diminuição da imunoexpressão de c-Fos (proteína Fos) e fator de transcrição e ativação 3 (ATF-3) no GRD observamos também diminuição da imunoexpressão de ATF-3 no corno dorsal da ME dos camundongos.

Os resultados do nosso estudo foram apresentados de forma didática e em etapas para melhor compreensão e entendimento dos leitores. Na 1ª etapa do estudo mostramos os resultados do efeito do aloxano na indução do DM e hiperglicemia persistente além de estabelecer a melhor dose a ser utilizada nas etapas posteriores. Na 2ª etapa do estudo apresentamos os resultados do efeito da OXL na hiperalgesia mecânica plantar e coordenação motora dos animais não diabéticos, estabelecendo a melhor dose a ser utilizada nas próximas etapas. Na 3ª etapa do estudo procuramos apresentar os resultados do efeito da NSP induzida por OXL em camundongos diabéticos/hiperglicêmicos, uma combinação entre o modelo de indução de DM por aloxano e o modelo de NSP induzida por OXL em camundongos para se observar qual a influência da OXL em camundongos diabéticos. Na 4ª etapa do nosso estudo apresentamos o efeito protetor da MTF na neuropatia induzida por OXL em animais não diabéticos.

Inicialmente na 1ª etapa do nosso estudo trabalhamos com o modelo de DM administrando baixas doses de aloxano 25, 50 e 75 mg/Kg, iv., aos camundongos após jejum de 18 horas em administração única com o objetivo de observar qual a menor dose de aloxano era capaz de induzir hiperglicemia sem causar neuropatia nos animais. Posteriormente trabalhamos o modelo de DM administrando nos animais altas doses de aloxano 75, 100 e 125 mg/Kg, iv., desta vez após jejum de 12 horas em administração única também para determinar a menor dose de aloxano capaz de induzir hiperglicemia sem causar mortalidade,

observar o percentual de camundongos com hiperglicemia além de observar a progressão ponderal dos animais.

Após a administração de aloxano nos animais observamos que aloxano 125 mg/Kg induziu hiperglicemia em todos os animais e tempos testados provocando a mortalidade de todos os camundongos até o 30º dia após o tratamento e por isso essa dose foi descartada para uso futuro. Já a administração de aloxano nas doses de 75 e 100 mg/Kg, induziram hiperglicemia em todos os animais em relação ao grupo controle em todos os tempos testados, com níveis acima de 200 mg/dL, níveis considerados hiperglicêmicos para camundongos (BRANCO *et al.*, 2011; LERCO *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 1978; SOMOGLY, 1952).

O estudo conduzido por Lerco *et al.* (2003) demonstrou que dos 64 ratos tratados com aloxano 42 mg/Kg, iv., 14 animais (22%) não se tornaram diabéticos, 25 animais (39%) morreram durante a primeira semana após o tratamento com aloxano e somente 25 (39%) animais sobreviveram e desenvolveram DM com níveis acima de 300 mg/dL. Diante destes dados, demonstramos ser a dose de aloxano 125 mg/Kg, realmente uma dose bastante letal e três vezes maior daquela utilizada por Lerco *et al.* (2003) capaz de causar a letalidade de 100% dos animais tratados em nosso estudo.

Adicionalmente, observamos que a administração de aloxano na dose de 25 mg/Kg aos camundongos não foi capaz de induzir hiperglicemia nos animais em relação ao grupo controle mostrando níveis de glicemia abaixo de 200 mg/dL, o que inviabilizou essa dose para uso futuro no modelo de DM.

Já a administração de aloxano nas doses de 50 e 75 mg/Kg nos camundongos foram as menores doses capazes de induzir DM associado com hiperglicemia e perda de peso com a menor quantidade de aloxano administrada nos animais causando a menor toxicidade. Nestas doses administradas os animais apresentaram níveis de glicemia acima de 200 mg/dL, parâmetro para hiperglicemia já utilizado por outros pesquisadores (BRANCO *et al.*, 2011; LERCO *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 1978). As baixas doses de aloxano utilizadas em nosso estudo são relevantes quando trabalhamos com modelos animais e compatíveis com os preceitos que regem o manejo e uso de animais para experimentação das comissões de ética e uso de animais para pesquisas.

No estudo conduzido por Diab *et al.* (2015) conseguiu-se induzir DM em camundongos com uma dose de aloxano de 75 mg/Kg, iv. Diferentemente do estudo

de Diab *et al.* (2105) conseguimos mostrar em nosso estudo que o aloxano 50 mg/Kg, iv. foi a menor dose capaz de induzir DM com níveis de hiperglicemia em camundongos. Adicionalmente mostramos que a dose de aloxano de 75 mg/Kg foi capaz de induzir DM com níveis de hiperglicemia associado aos menores tempos de jejum de 12 e 18 horas diferentemente de outros estudos que induziram DM com aloxano em tempos de jejum maiores como por exemplo, Lima *et al.* (2001) induziram DM em ratos com jejum de 36 horas.

Os dados do nosso estudo foram consistentes com os de outros pesquisadores que utilizaram aloxano com doses variando de 30 a 65 mg/kg, iv., para induzir DM com níveis de hiperglicemia em ratos com baixa toxicidade (AKHAVAN *et al.*, 2012; AL-SALAMI *et al.*, 2008; BOYLAN *et al.*, 1992; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2005; REIS, SEMENTILLI; GAGLIARDI, 2013; THOMAZ NETO *et al.*, 2013).

O protocolo de indução de DM por aloxano no presente estudo além de produzir hiperglicemia em níveis acima de 200 mg/dL, também causou a diminuição dos pesos dos animais a partir do 7º dia de tratamento até o fim do experimento (56 dias) com a maioria das doses utilizadas e a partir do 14º dia para o aloxano 25 mg/Kg de maneira significativa em comparação ao grupo controle. Esses dados são consistentes com os critérios para diagnóstico de DM em seres humanos de acordo com a Sociedade Americana de Diabetes (SAD), que diz que a presença de hiperglicemia persistente associada com perda de peso nos pacientes caracteriza o DM (SAD, 2015).

O estudo conduzido por Berraouan *et al.* (2015) corroborou os nossos dados sobre a avaliação ponderal quando observou-se em camundongos que receberam aloxano 100 mg/Kg durante 7 dias uma diminuição dos pesos dos animais de aproximadamente 10% em comparação ao grupo controle. Já no estudo conduzido por Ho *et al.* (1999), a indução de DM em camundongos com aloxano 50 mg/Kg, ip., diferentemente da via iv. utilizada em nosso estudo não foi capaz de produzir níveis de glicemia acima de 200 mg/dL. O uso da via ip. por Ho *et al.* (1999) pode explicar as diferenças que esses autores encontraram com relação a níveis glicêmicos quando comparado com os nossos resultados. Neste mesmo estudo a administração de aloxano 200mg/Kg, ip. nos camundongos além de causar hiperglicemia acima de 200 mg/dL também diminuiu os pesos dos animais de maneira significativa em comparação ao grupo controle.

Em estudos conduzidos por Diab *et al.* (2015) e Orsolich *et al.* (2012) camundongos que receberam aloxano 75 mg/Kg, iv. produziram níveis glicêmicos acima de 200 mg/dL, considerados hiperglicêmicos (BRANCO *et al.*, 2011; LERCO *et al.*, 2003; SOMOGLY, 1952; MAGALHÃES *et al.*, 1978). Nestes estudos, porém os pesquisadores não demonstraram se o aloxano nas doses de 50 e 75 mg/Kg, era capaz de alterar a nocicepção dos animais.

No presente estudo quando administramos aloxano nas doses de 50 e 75 mg/Kg, iv. em camundongos os mesmos desenvolveram DM com hiperglicemia persistente e perda de peso de maneira significativa em relação ao grupo controle. Porém somente os animais que receberam aloxano na dose de 75 mg/Kg, apresentaram aumento da intensidade de hiperalgesia plantar mecânica (teste de Von Frey) a partir do 21º dia de tratamento. Já os camundongos que receberam aloxano na dose de 50 mg/Kg, não apresentaram neuropatia associada ao DM.

Uma das complicações crônicas mais comuns do DM é a neuropatia diabética, a qual é caracterizada principalmente por dor espontânea e sensações, tais como parestesia, alodinia e hiperalgesia (GREENE *et al.*, 1997). Mecanismos neuroanatômicos, neurofisiológicos e neuroquímicos podem estar envolvidos e contribuir para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática diabética (EDWARDS *et al.*, 2008). Além disso, a hiperglicemia persistente no DM leva a complicações microvasculares, predominando a retinopatia, nefropatia e neuropatia debilitante (CAVALLI *et al.*, 2007; KIRSTEN, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; ZANOELLO *et al.*, 2002). Baseado em informações sobre as complicações do DM principalmente da neuropatia diabética, procuramos investigar em estudos clínicos se uma condição de DM em pacientes em uso de protocolos compostos por OXL poderia influenciar o curso da neuropatia induzida por OXL.

Encontramos na literatura, um estudo clínico conduzido por Uwah *et al.* (2012) que mostraram que pacientes com DM pré-existente possuía forte tendência em desenvolver NSP com doses cumulativas de OXL. Neste estudo pacientes com DM desenvolveram neuropatia com uma dose cumulativa significativamente menor do que os pacientes que não tinham DM (388 mg/m² vs 610 mg/m²). Os dados, embora não significativo estatisticamente, sugerem um baixo risco para desenvolver NSP induzida por OXL para todos os pacientes antes do 4º ciclo de OXL, embora aumentado a partir do 5º ciclo de OXL em pacientes diabéticos. Mas esse risco permaneceu abaixo de 50% antes do 8º ciclo em pacientes sem diabetes.

Baseado na falta de dados consistentes no estudo clínico de Uwah *et al.* (2012) e na ausência de estudos em camundongos sobre a influência do DM na NSP induzida por OXL, procuramos estudar se uma condição pré-existente de DM e hiperglicemia persistente em camundongos poderia influenciar o início e/ou curso da NSP induzida por OXL. Esse ensaio foi bem conduzido somente na 3ª etapa.

Na 2ª etapa do presente estudo procuramos avaliar qual a dose de OXL seria capaz de induzir a NSP nos camundongos não diabéticos bem como qual a influência da OXL sobre os camundongos na barra giratória (teste do rota-rod). Nesta etapa do estudo foi importante realizar uma curva dose resposta com OXL.

O modelo de NSP induzida por OXL empregado no nosso estudo foi aprimorado no laboratório de farmacologia de inflamação e câncer (LAFICA) por Pontes, (2009) e Lino (2011) que tomaram por base os modelos desenvolvidos em ratos por Ling *et al.* (2007a) e camundongos por Ta, Low e Windebank, (2009). Estes últimos pesquisadores realizaram um estudo com camundongos, mostrando que o tratamento com OXL 1,0 mg/Kg desenvolveu neuropatia dolorosa e duradoura observado através de testes nociceptivos mecânicos e térmicos. Neste estudo, contudo seus resultados não avaliaram de forma detalhada os danos neuronais.

O estudo conduzido por Azevedo *et al.* (2013) também tomou como exemplo os modelos desenvolvidos por Ling *et al.* (2007a). Já o estudo da NSP conduzido por Pereira (2015) utilizando OXL 2,0 mg/Kg, iv. e oxalato foi possível analisar além do desenvolvimento da neuropatia dolorosa os danos neuronais no GRD e medula dos animais de forma mais detalhada mostrando que provavelmente, o oxalato antecipa o surgimento da neuropatia, promovendo a cronificação e persistência do fenômeno de forma mais precoce. Sugerindo que possivelmente, o próprio mecanismo citotóxico da OXL seja o principal responsável pelo efeito neurotóxico que acontece inicialmente a nível periférico e posteriormente se estende ao nível central.

No presente estudo o modelo de NSP foi induzido com OXL (1,0 e 2,0 mg/Kg, iv.), além de OXL (4,0 mg/Kg, iv.), dose equivalente àquela utilizada nos protocolos FOLFOX 4 e 6 (OXL 85 e 100 mg/m² de 14/14 dias) bastante utilizados no tratamento do CCR em seres humanos (Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 2011).

Nos estudos de Pontes (2009), Lino (2011), Azevedo *et al.* (2013) e Pereira (2015) foram utilizados o modelo de NSP induzido com OXL (1,0 e 2,0

mg/Kg, iv.) doses bem abaixo daquelas utilizadas em protocolos de quimioterapia em seres humanos. É bom salientar que o princípio ativo da OXL utilizada nos estudos de Pontes (2009), Lino (2011), Azevedo *et al.* (2013) e Pereira (2015) estavam no estado sólido, para uso em pesquisas e apresentavam altíssima pureza (98-100%) diferente da OXL utilizada neste estudo, um fármaco de uso comercial, no estado líquido e pronto para uso em protocolos de tratamento em seres humanos.

Através do modelo de NSP induzida por OXL foi possível avaliar a alteração da intensidade de hiperalgesia mecânica plantar dos camundongos antes e após as administrações de OXL nas doses de 1,0; 2,0 ou 4,0 mg/Kg, iv. nos animais. Observamos que somente a administração de OXL na dose de 4,0 mg/Kg nos camundongos aumentou a intensidade de hiperalgesia mecânica plantar de maneira significativa a partir do 28º dia em comparação com o grupo controle. Já a administração de OXL nas doses de 1,0 e 2,0 mg/Kg, não alteraram a intensidade de hiperalgesia mecânica plantar nos camundongos de maneira significativa em comparação ao grupo controle.

Nossos dados são corroborados pelos estudos conduzidos por Egashira *et al.* (2010) que induziram hiperalgesia mecânica em ratos com OXL (4,0 mg/Kg, ip.) a partir do 24º dia de administração de OXL e pelo estudo conduzido por Lino (2011) que observou o aumento da hiperalgesia mecânica plantar dos camundongos que receberam OXL (4,0 mg/Kg, iv.) a partir do 28º dia de administração de maneira significativa em comparação ao grupo controle. Já a administração de OXL (1,0 mg/Kg) nos camundongos aumentou a intensidade de hiperalgesia mecânica plantar nos animais a partir do 21º dia de administração de OXL. Lino (2011) resolveu continuar seus estudos com OXL (1,0 mg/Kg) por considerar essa dose mais eficaz em aumentar a intensidade da hiperalgesia nos animais em tempo mais precoce no 21º dia em relação a OXL (4,0 mg/Kg) que aumentou a intensidade de hiperalgesia somente no 28º dia após a administração nos animais.

É bom salientar que fatores físico-químicos relacionados a OXL, como por exemplo, pureza e estado físico, podem influenciar no efeito do fármaco. Além disso, fatores ambientais, por exemplo: temperatura, ruídos e iluminação, além do manejo dos animais podem influenciar nas respostas de comportamento destes animais quando trabalhamos com modelos de comportamento animal.

No presente estudo foi realizado também um teste para avaliar a coordenação motora dos animais sobre uma barra giratória (rota-rod) antes e após a administração de OXL nas doses de 1,0; 2,0 e 4,0 mg/Kg. Observamos que os tempos de permanência dos animais sobre a barra giratória em todas as doses testadas não foi alterado em comparação com o grupo controle. Mostrando desta forma que a OXL não influencia a coordenação motora dos animais. O teste do rota-rod já foi utilizado por outros pesquisadores para avaliar diversas condições neurológicas, destacando: neuropatias, miopatias, distrofias musculares e doenças da placa mioneural (GURNEY *et al.*, 1994; KASPAR *et al.*, 2003).

No estudo conduzido por Norcini *et al.* (2009) demonstrou-se no teste de rota-rod em ratos, que a OXL não alterou a função motora dos animais. Corroborando os nossos dados de que a OXL não interfere na locomoção e equilíbrio dos animais mostrando assim que a OXL não causa danos nos gânglios basais e cerebelo.

Na 3ª etapa procuramos avaliar se uma condição pré-existente de DM e hiperglicemia persistente em camundongos poderia antecipar o início e/ou curso da NSP induzida por OXL. Antes de iniciar essa etapa investigamos nossa hipótese pela pesquisa de informações em estudos clínicos. Nesta busca, obtivemos êxito ao encontrar dois estudos clínicos.

Estudos clínicos retrospectivos conduzidos por Ramanathan *et al.* (2010) e Uwah *et al.* (2012) demonstraram que pacientes diabéticos e não diabéticos em uso de doses cumulativas de OXL não apresentaram diferença significativa em desenvolver NSP induzida por OXL. Porém estes estudos apresentaram limitações quanto ao número reduzido de pacientes nos grupos, dificuldade na obtenção de um grupo controle compatível com o grupo tratado, exclusão de pacientes com graus iniciais de NSP e falta de informações sobre o tipo de DM envolvidos nestes estudos.

Baseado nos dados destes estudos clínicos e experiência nos modelos de DM induzido por aloxano e de NSP induzido por OXL em camundongos pelo nosso grupo (LAFICA) nos impulsionaram a utilizar estes modelos no estudo da NSP induzida por OXL em camundongos diabéticos. Com a combinação destes modelos animais objetivamos estudar se uma condição pré existente de DM em camundongos poderia influenciar o início e/ou o curso da NSP induzido por OXL. O estudo nesta condição em modelos animais permitirá um aprofundamento dos

mecanismos celulares e moleculares da NSP induzida por OXL que poderá conduzir a descobertas de potenciais alvos terapêuticos que poderão ser utilizados na prevenção e/ou tratamento da toxicidade da OXL.

Nesta etapa do estudo resolvemos avaliar antes e após a administração de aloxano nos camundongos e combinado com OXL a intensidade da hiperalgesia mecânica, glicemia, análise histopatológica do pâncreas e avaliação ponderal dos animais.

A administração de aloxano na dose de 50 mg/Kg, nos camundongos e associado com OXL na dose de 4,0 mg/Kg, induziu hiperglicemia de maneira significativa nos animais em todos os tempos testados em comparação com o grupo controle. Já a administração somente de OXL, nos camundongos não alterou o perfil glicêmico, mas induziu hiperalgesia de maneira significativa a partir do 28º dia de tratamento. A administração de OXL associada com aloxano além de aumentar a intensidade de hiperalgesia a partir do 21º dia também antecipou o estabelecimento da hiperalgesia em 7 dias e amplificou a resposta hiperalgésica em comparação ao grupo tratado somente com OXL.

Na análise histopatológica do pâncreas dos camundongos após a administração de aloxano na dose de 50 mg/Kg, isoladamente ou combinado com OXL (4,0 mg/Kg), também provocou perda de todas as ilhotas de Langerhans. Adicionalmente observamos a presença de áreas com intensa basofilia e células acinares com citoplasma basófilo e desarranjo da arquitetura glandular em comparação ao grupo controle. Já a administração de OXL, nos camundongos se comportou de maneira semelhante ao grupo controle que recebeu somente salina onde foram observadas a presença de ilhotas de Langerhans e células acinares com arquitetura preservada de aspecto histológico normal. Nossos dados são consistentes como estudo conduzido por Rastogi *et al.* (1990), que utilizou o método imunohistoquímico e observou que os pâncreas dos ratos com DM e hiperglicemia, induzido por aloxano, apresentaram redução de 70% das áreas das ilhotas de Langerhans ocupadas pelas células β , chegando até a ausência total delas, enquanto houve aumento da área ocupada pelas células δ e sem alteração no conteúdo de células produtoras de glucagon nas ilhotas de Langerhans.

Outro estudo concluiu que o aloxano além de causar destruição das células β e ilhotas de Langerhans (porção endócrina) também provoca alterações na

porção exócrina do pâncreas dos animais observado pelo aumento das células α e δ por hiperplasia (RASTOGI *et al.*, 1993).

Na análise histopatológica da porção endócrina do pâncreas dos animais que receberam somente aloxano, revelou diminuição significativa do número de ilhotas de Langerhans através de cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina (HE) e visualizados em 200x por microscopia óptica. As ilhotas de Langerhans são formadas pelas células β que possuem a função endócrina, sendo responsáveis pela produção de insulina com importante hormônio de ação anti-hiperglicemiante. Esses dados são consistentes com os estudos conduzidos por Nugroho *et al.* (2016), Schossler *et al.* (2006), Lima *et al.* (2001) e Gets & Lecompte (1981) que observaram principalmente diminuição do número de células β além de diminuição do tamanho das ilhotas de Langerhans, distorção da citoarquitetura das ilhotas Langerhans, distribuição irregular de outras células pancreáticas de ratos diabéticos induzido por aloxano. Já em estudos recentes em camundongos diabéticos induzido por aloxano foi observada intensa deterioração das células β presentes nas ilhotas de Langerhans e diminuição das células acinares responsáveis pela porção exócrina (BERRAAOUAN *et al.*, 2015; NUGROHO *et al.*, 2016; RAMAR *et al.*, 2012) bem como atrofia e apoptose das ilhotas de Langerhans (TAKEMOTO *et al.*, 2016).

No estudo conduzido por Berraaoun *et al.* (2015) foram observadas significativa degeneração, redução da densidade, redução do diâmetro, diminuição da área e número de células das ilhotas de Langerhans no pâncreas de camundongos que receberam aloxano e foram visualizados em cortes histológicos corados por HE. Já na análise histopatológica da porção exócrina do pâncreas dos animais que receberam aloxano observamos áreas com intensa basofilia e células acinares com citoplasma basófilo e desarranjo da arquitetura glandular em comparação ao grupo controle através de cortes histológicos e corados por HE. No presente estudo os dados da análise do pâncreas dos animais são consistentes com os estudos conduzidos por Ramar *et al.* (2012) que observaram além da deterioração das células β também a diminuição do tamanho das células acinares.

Já o estudo conduzido por Nugroho *et al.* (2016) observou-se além do dano das células β também dano nas células acinares, consistentes também com os nossos resultados. As ilhotas de Langerhans são conhecidas por possuir baixos

níveis de enzimas antioxidantes do que outros tecidos tais como o fígado (LENZEN *et al.*, 1996). Assim altamente susceptíveis a danos oxidativos (HO *et al.*, 1999).

No presente estudo a administração de aloxano nos camundongos além de produzir hiperglicemia persistente e redução do peso dos animais, como já verificado na 1ª etapa deste estudo, também acarretou perda de todas as ilhotas de Langerhans do pâncreas dos animais caracterizando assim um tipo de DM, chamado DM-1 de acordo com a SAD.

Nesta 3ª etapa do estudo a avaliação ponderal dos camundongos que receberam aloxano 50 mg/Kg e OXL na dose de 4,0 mg/Kg isolados ou combinados observamos diminuição dos pesos dos animais de maneira significativa em comparação ao grupo controle em todos os tempos analisados.

O estudo conduzido por Berraaouan *et al.* (2015) corroboraram a diminuição dos pesos dos animais do nosso estudo quando observaram durante 7 dias em camundongos que receberam aloxano (100 mg/Kg) uma diminuição dos pesos dos animais de aproximadamente de 10% em comparação ao grupo controle. Adicionalmente os pesos dos animais controle (salina) aumentaram em torno de 10% em comparação aos pesos iniciais.

Nossos dados são consistentes também com os dados de Xiao *et al.* (2012) que administraram OXL (2,0 mg/Kg) em ratos e observaram diminuição dos pesos dos animais de maneira significativa em relação ao grupo controle. No estudo conduzido por Ling *et al.* (2007) a administração de OXL (4,0 mg/Kg) em ratos por 35 dias também mostrou diminuição dos peso dos animais de cerca de 18% em comparação no início do tratamento.

Nesta 3ª etapa do estudo observamos que a administração de OXL nos camundongos diabéticos aumentou a intensidade de hiperalgesia mecânica plantar dos camundongos de forma significativa em relação ao grupo controle. Quando administramos OXL e aloxano combinados nos camundongos, além de aumentar a intensidade da hiperalgesia mecânica plantar dos animais também antecipou a instalação da NSP e amplificou a intensidade da hiperalgesia em relação ao grupo OXL. Já a administração somente de OXL nos camundongos não alterou os níveis glicêmicos, a morfologia das células nem o aspecto das áreas das porções endócrina e exócrina do pâncreas dos animais mostrando assim que a OXL não é um fármaco diabetogênico como o aloxano.

Na 4ª etapa e última do presente estudo investigamos a influência do tratamento com MTF em camundongos não diabéticos e com neuropatia induzida por OXL. O objetivo dessa última etapa do estudo foi pesquisar a influência da MTF na neuropatia induzida por OXL e não na neuropatia diabética.

O tratamento dos animais com NSP induzida por OXL e diabéticos com MTF poderia sugerir um viés, ou seja, não saberíamos se o efeito protetor da MTF estaria acontecendo por agir somente na NSP da OXL ou o tratamento do DM estaria influenciando a melhora da neuropatia da OXL.

O efeito protetor da MTF na neuropatia diabética já foi demonstrado por outros pesquisadores (JUNXIONG *et al.*, 2015). A investigação do efeito da MTF objetiva entender melhor os mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da neuropatia relacionada à OXL bem como procurar melhorar as atuais abordagens clínicas e terapêuticas em humanos.

O estudo conduzido por Junxiong *et al.* (2015) mostrou o efeito benéfico da MTF em reverter a hiperalgesia, a alodinia e diminuir o estresse oxidativo em ratos diabéticos induzido por estreptozotocina provavelmente via adenosina monofosfato quinase (AMPK). O efeito da MTF neste estudo provavelmente se deu via ativação da AMPK e seus genes alvo no nervo ciático desses animais, sugerindo um possível envolvimento da AMPK no efeito neuroprotetor da MTF.

A MTF já demonstrou também possuir fortes propriedades anticâncerígenas. Em pacientes com DM-2 e câncer a MTF mostrou suprimir a carcinogênese em mama, pâncreas e pulmão, e diminuiu a mortalidade relacionada ao câncer (DEL BARCO *et al.*, 2011; DOWLING *et al.*, 2011).

Outros estudos demonstraram também que a MTF exerce efeitos neuroprotetores em modelos murinos em doenças neurodegenerativas incluindo a neurodegeneração cerebral associada ao diabetes (CORREIA *et al.*, 2008; EI-MIR *et al.*, 2008), apoptose neuronal induzida por etanol (ULLAH *et al.*, 2012) e acidente vascular cerebral experimental (LI *et al.*, 2012).

O estudo conduzido por Mao-Yin *et al.* (2014) mostrou que os efeitos neuroprotetores da MTF no modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterápicos: CDDP e paclitaxel em camundongos estão associados a redução da perda das fibras nervosas epidérmicas intraplantares, um mecanismo bem diferente daquele apresentado na neuropatia induzida por OXL.

O efeito neuroprotetor da MTF também já foi testado em modelo de dor neuropática induzida por ligação do nervo espinhal em ratos que mostrou reverter a alodínia mecânica estabelecida neste modelo. Neste estudo a regeneração do nervo espinhal e reversão da neuropatia nos animais aconteceram provavelmente pela ativação da AMPK (MELEMEDJIAN *et al.*, 2011; 2013a). Essa ativação de AMPK pode está relacionada a uma diminuição da sinalização da via mTOR/AMPK em nervos lesionados (MELEMEDJIAN *et al.*, 2011; 2012).

Não sabemos se as vias de sinalização mTOR/AMPK estão envolvidas também na NSP induzida por OXL. Por outro lado, a NSP induzida por quimioterápicos envolve mudanças claras na função mitocondrial que podem ser um importante alvo para a ativação da via da AMPK na NSP induzida por quimioterápicos (FLATTERS *et al.*, 2006) e também pelo aumento do estresse oxidativo (MILTENBURG; BOOGERD, 2014). Fármacos com potencial antioxidante como já observado com a MTF (JUNXIONG *et al.*, 2015) podem ser um boa alternativa na proteção da neuropatia induzida por OXL, se revelado esse efeito protetor quando testado no nosso estudo. Diante destas evidências do efeito neuroprotetor da MTF. A investigação do seu efeito na NSP induzida por OXL tornou-se um objetivo interessante do presente estudo.

Alem disso, o efeito protetor da MTF na neuropatia diabética já foi estudado anteriormente por Junxiong *et al.* (2015) no qual se observou um importante papel antioxidante da MTF. Sendo assim o objetivo central dessa etapa foi verificar o potencial efeito protetor da MTF na NSP induzida por OXL em camundongos não diabéticos. No presente estudo pudemos observar várias evidências de que a MTF possui realmente um efeito neuroprotetor nos camundongos com NSP induzida por OXL como será discutido logo a seguir:

Na 4ª etapa do presente estudo a administração somente de OXL com a frequência de 2 vezes por semana durante 4,5 semanas aumentou a intensidade de hiperalgesia mecânica plantar nos camundongos a partir do 21º dia de maneira significativa em comparação ao grupo controle e grupo MTF combinado com OXL. O aumento da intensidade da hiperalgesia nesta 4ª etapa do estudo foi corroborado pelos resultados do aumento da hiperalgesia das 2ª e 3ª etapas do presente estudo. Já o tratamento dos animais com MTF combinado com OXL diminuiu a intensidade da hiperalgesia mecânica plantar a partir do 21º dia em comparação ao grupo controle e a partir do 28º dia em comparação ao grupo OXL. Nossos dados são

consistentes com o estudos conduzidos por Pereira (2015), Azevedo *et al.* (2013) e Ling *et al.* (2007) que mostraram que a administração de OXL (2,0 mg/Kg, iv.) em camundongos e OXL (1,0 mg/Kg, iv.) em ratos realmente diminuiu os limiares de retirada das patas dos animais de maneira significativa em comparação ao grupo controle corroborando assim os nossos resultados. Porém estes pesquisadores não avaliaram o efeito protetor da MTF na NSP induzida por OXL em camundongos.

Adicionalmente, observamos que o tratamento dos animais com MTF combinado com OXL além de diminuir a hiperalgesia mecânica plantar nos animais também retardou o tempo de retirada da cauda dos mesmos de maneira significativa em comparação ao grupo OXL passando do 14^o dia para o 28^o dia após os tratamentos dos animais. Sugerindo um efeito antinociceptivo da MTF.

Em pacientes a neuropatia aguda ocorre abruptamente após a administração de OXL. Os pacientes experimentam disestesia e parestesias quando tocam em itens moderadamente frios que normalmente não produziriam dor (ATTAL *et al.*, 2009). Os sintomas ocorrem nas mãos, no rosto e raramente nos pés (ATTAL *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2002), diminuem durante o período de repouso de cada ciclo do fármaco e se repetem com administrações subsequentes de OXL (LEONARD *et al.*, 2005). A neuropatia crônica se desenvolve em pacientes após doses cumulativas de OXL e, uma vez estabelecida, a maioria dos pacientes apresentam os sintomas durante meses (DE GRAMONT, 2005). Pacientes queixam-se de disestesia e parestesia em curso nas mãos e pés, que são freqüentemente acompanhadas por alterações sensoriais de coordenação de extremidades (ATTAL *et al.*, 2009; PASETTO *et al.*, 2006). A avaliação de possíveis disestesia e parestesia em animais pode ser um desafio interessante.

Um estudo conduzido por Kawashiri *et al.* (2010) corroborou nossos dados de que o estabelecimento da alodinia térmica acontece mais precocemente à hiperalgesia mecânica plantar. Neste estudo foi mostrado que a administração repetida de OXL em ratos induziu alodinia térmica ao frio a partir do 5^o dia de tratamento e a hiperalgesia mecânica a partir do 15^o dia de tratamento. Adicionalmente a OXL causou também a degeneração (atrofia) das fibras mielinizadas no nervo ciático de ratos no 28^o dia de tratamento (KAWASHIRI *et al.*, 2010). Esses dados são consistentes com o estudo conduzido por Zhao *et al.* (2012) que observaram que a administração ip. de OXL em camundongos provocou aumento da hipersensibilidade ao frio nos animais.

No teste do rota-rod, observamos que os tratamentos dos animais com MTF e OXL isolados e combinados em todos os tempos testados por um período de 35 dias não alterou o tempo de permanência dos animais na barra giratória em comparação ao grupo controle nem em comparação ao grupo OXL. Mostrando desta forma que a MTF e OXL não influenciam a coordenação motora dos animais e os resultados de hiperalgesia e alodinia foram fidedignos aos testes realizados. O teste do rota-rod é ideal para avaliar o comprometimento neuromotor do animal relacionado com os fármacos testados. Este teste já foi bastante utilizado por outros pesquisadores para avaliar diversas condições neurológicas, destacando: neuropatias, miopatias, distrofias musculares e doenças da placa mioneural (GURNEY *et al.*, 1994; KASPAR *et al.*, 2003).

Um estudo conduzido por Mao-Ying *et al.* (2014) mostrou que a co-administração de MTF na dose de 200 mg/Kg combinado com CDDP impediu o estabelecimento da alodinia mecânica na pata posterior de camundongos induzida por dois ciclos de CDDP.

Adicionalmente, um estudo recente conduzido por Zhou *et al.* (2016) mostrou que a co-administração de uma dose mais baixa de MTF 100 mg/kg também preveniu completamente da alodinia mecânica induzida por três ciclos de CDDP em camundongos. Estes resultados indicam um importante efeito protetor da MTF na neuropatia induzida pelo fármaco antineoplásico como a CDDP.

Autores de uma revisão citaram que alguns fármacos quimioterápicos como CDDP, paclitaxel, vincristina e OXL são importantes em provocar neurotoxicidade. Além disso, os mecanismos de ação da neurotoxicidade destes quimioterápicos devam provavelmente ser diferentes (JAGGI; SINGH, 2012).

Na 4ª etapa do presente estudo além de estudar o efeito da MTF na hiperalgesia mecânica plantar e alodínia térmica ao frio, evidenciando um efeito antinociceptivo através de testes comportamentais, o efeito também foi observado por um método indireto envolvendo a expressão de c-Fos no GRD e ME.

Os resultados obtidos nesta etapa do estudo utilizando imunofluorescência e analisados por microscopia confocal mostraram no 35º dia após a administração de OXL aumento significativo da imunoposição de c-Fos no GRD dos animais em comparação ao grupo controle. Isso está de acordo com dados do estudo conduzido por Pereira (2015) que mostrou que OXL aumentou a imunoposição de c-Fos no

GRD de camundongos nos experimentos de 28 e 56 dias de maneira significativa em relação ao grupo controle.

No presente estudo o tratamento dos camundongos com MTF diminuiu significativamente a imunoexpressão de c-Fos no GRD após a administração de OXL. Nos grupos que não tiveram a administração de OXL não foi observado o desenvolvimento da neuropatia nos camundongos e não apresentaram também aumento da marcação de c-Fos em neurônios, mas curiosamente o grupo tratado somente com MTF (sem OXL) teve uma marcação de c-Fos em células não neuronais do GRD. A localização e morfologia destas células marcadas sugerem que correspondam a células satélites gliais.

As células satélites gliais e de Schwann são células gliais do sistema nervoso periférico que participam da patogênese da neuropatia diabética. As células de Schwann fornecem principalmente a bainha de mielina que envolve e isolam os axônios dos neurônios periféricos (CAMPANA, 2007). Já os gânglios sensoriais contêm os neurônios somatosensoriais que são fortemente cercados por células satélites gliais e são considerados componentes vitais da via da dor (HANANI *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2013; JASMIN *et al.*, 2010; TAKEDA *et al.* 2009). Evidências indicaram que distúrbios na função glial no diabetes (MILLER, 2005) e o mau funcionamento das células gliais afetadas por hiperglicemia podem contribuir para o desenvolvimento de doenças neuropáticas.

No nosso estudo a marcação de c-Fos em células satélites gliais ocorreu no grupo controle e de forma mais acentuada no grupo MTF (ambos não tratados com OXL), mas não foi observado nos animais neuropáticos. Não sabemos explicar porque essas células estão expressando c-Fos diante de um tratamento crônico com MTF, uma vez que essa proteína é um marcador clássico de ativação neuronal. Contudo, outros autores demonstraram que células satélites gliais de GRD expressam c-Fos em situação de injúria (ROIVAINEN; KOISTINAHO, 1990; HOLLY *et al.*, 2001). As células satélites estão ganhando cada vez mais destaque nas publicações relacionadas a lesões neuropáticas e inflamatórias exercendo um papel regulatório na sensibilização do neurônio periférico, tendo um papel semelhante à glia da ME (JASMIN *et al.*, 2010; TAKEDA *et al.*, 2009). Provavelmente tem também um papel na manutenção da homeostase neuronal a nível periférico. Sendo assim, podemos supor que o aumento de c-Fos nas células satélites gliais do GDR de animais tratados com MTF, demonstre uma ativação dessas células e possa

significar alguma participação no efeito neuroprotetor preventivo da MTF. Entretanto outros estudos são necessários para elucidar essa participação e significado desse aumento de c-Fos.

Já no corno dorsal da ME no 35º dia após a administração de OXL não houve alteração significativa da imunoexpressão de c-Fos em nenhum dos grupos. Talvez essa ausência de expressão de c-Fos na ME seja devido ao tempo de neuropatia apresentado nos animais induzida pela OXL. Esses dados são consistentes com os resultados de Pereira (2015) que no 28º dia após a administração de OXL observou aumento da imunoexpressão de c-Fos no corno dorsal da ME dos camundongos que não foi observado no 56º dia de experimento.

No estudo conduzido por Azevedo *et al.* (2013) foi observado que a partir do 14º dia de NSP induzida por OXL em camundongos houve uma diminuição progressiva no tamanho dos neurônios sugerindo uma atrofia desses neurônios e aumento de células gliais no corno dorsal da ME após análise por HE. Vale salientar que a coleta do GRD e ME no presente estudo foi realizada no 35º dia e não no 14º dia como no estudo de Azevedo *et al.* (2013), o que pode ter influenciado a expressão de c-Fos, ou seja, talvez o aumento da imunoexpressão de c-Fos aconteça somente em tempo mais inicial da neuropatia.

Diversos estudos publicados na literatura utilizaram a expressão de c-Fos como uma ferramenta para demonstrar a presença de neurônios noci-responsivos especialmente na ME (BULLITT *et al.*, 1992; CINTRA *et al.*, 1993; HERDEGEN *et al.*, 1994; MORGAN, GOGAS, BASBAUM, 1994; BULLITT, 1989).

Gogas *et al.* (1991) comentaram que a imunohistoquímica da proteína Fos pode ser utilizada como meio de monitorar a atividade de grandes populações neuronais, em resposta a estímulos nocivos persistentes. Já um estudo conduzido por Presley *et al.* (1990) mostraram que há forte correlação entre o comportamento gerado pela dor e o Nº de células que expressam a proteína Fos. O assunto foi bastante discutido na revisão realizada por Harris em 1998.

Nos estudos conduzidos por Huang *et al.* (2016a; 2016b) foi demonstrado que baixas concentrações de OXL ao penetrarem no SNC podem excitar diretamente o neurônio espinhal dorsal e contribuir para a dor aguda após única administração ip. de OXL. No entanto, o mecanismo subjacente do ingresso de baixas concentrações de OXL no SNC que podem estar levando a sensibilização central e neuropatia aguda ainda não estão claros. Dados do presente estudo

sugerem que a ativação do corno dorsal da ME talvez esteja acontecendo somente nos estágios iniciais da neuropatia associada á OXL em tempo inferior a 35 dias após a administração de OXL.

No presente estudo observamos que o aumento da imunoexpressão de c-Fos no GRD dos camundongos no 35º dia coincidiu com o mesmo intervalo temporal do aumento da intensidade da hiperalgesia mecânica plantar bem como com a diminuição do tempo de retirada da cauda dos camundongos nos teste de Von Frey e TIC. O mesmo não podemos afirmar com relação a expressão de c-Fos no corno dorsal de ME dos animais e os resultados conseguidos nos testes nociceptivos até o 35º de experimento.

De acordo com Teixeira (2009) a expressão de c-Fos está relacionada á atividade neuronal e a intensidade da dor reforçando essa ideia em outros estudos. Adicionalmente observamos de forma inédita uma proteção do grupo tratado com a combinação MTF e OXL de maneira significativa em comparação ao grupo OXL. Esses dados são consistentes com os resultados de Pereira (2015) que demonstrou aumento da imunoexpressão de c-Fos no GRD entre o 28º e 56º dia de tratamento com OXL e estes dados foram reforçados também pelo o estudo conduzido por Jacobs *et al.* (2010) em que alterações causadas pela OXL atinge principalmente o sistema nervoso periférico, devido á limitada penetração da OXL no SNC.

Desse modo, por atingir principalmente o SNP, a OXL pode provocar alterações nos neurônios do GRD, levando a hiperresponsividade desses neurônios. Essa responsividade aumentada pode estimular a liberação de neurotransmissores, como o glutamato, em neurônios no corno dorsal da ME. 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).

Ainda através do estudo por imunofluorescência, também procuramos avaliar se o efeito antinociceptivo estava combinado ou resultava de um possível efeito neuroprotetor da MTF através do estudo da imunoexpressão de ATF-3 no GRD e ME de camundongos.

No presente estudo, procuramos observar qual a relação da imunoexpressão de ATF-3 no GRD e no corno da ME dos camundongos após administração de OXL e tratamento com MTF.

O ATF-3 é um membro da família ATF/CREB (fatores de transcrição e ativação/proteína de ligação a elemento responsivo ao AMPc) é induzido em uma variedade de tecidos estressados. O ATF-3 regula a transcrição por ligação á locais do DNA com um homodímero ou heterodímeros 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 a resposta não é específica de tecido nem de estresse específico. Além disso, o ATF-3 não é expresso de forma constitutiva no GRD nem ME, sendo induzida 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 ME após a lesão do nervo e considerado um marcador de lesão neuronal. Além disso, o ATF-3 é um marcador nuclear de neurônios com axônios lesados (TSUJINO *et al.*, 2000).

O ATF-3 é induzido em estresse fisiológico em vários tecidos (CHEN; WOLFGANG; HAI, 1996). É também um marcador de regeneração após a lesão dos neurônios do GRD relacionado á dor (HANS *et al.*, 2011).

O estudo conduzido por Hans *et al.*, (2011) mostrou que a resposta da expressão de ATF3 à axotomia envolve um mecanismo dependente da distância. O ATF3 também parece ser um marcador neuronal útil e confiável de lesões nervosas, mesmo em seres humanos. Além disso, “up-regulation” de ATF3 em neurônios motores e sensoriais parece estar ligada a uma competência regenerativa.

No presente estudo a administração somente de OXL nos camundongos aumentou a imunoexpressão em neurônios para ATF-3, um marcador de lesão neuronal até o 35º dia de experimento no GRD de maneira significativa em comparação ao grupo controle. Já o tratamento dos animais com MTF combinado com OXL diminuiu a imunoexpressão das células para ATF-3 de maneira significativa em comparação ao grupo OXL.

Em um estudo conduzido por Di Cesare Mannelli *et al.* (2015) demonstrou-se um aumento da imunoexpressão de ATF-3, por imunohistoquímica, no nervo ciático e GRD a partir do 21º dia de administração de OXL em um modelo de neuropatia em ratos. Esses dados são consistentes com os resultados do presente estudo, que no 35º dia após as administrações de OXL foi observado um aumento da imunoexpressão de ATF-3 no GRD e corno dorsal da ME dos camundongos que foi protegido pelo tratamento com MTF.

Neste 4ª etapa do estudo, observamos uma diminuição da imunexpressão de c-Fos e ATF-3 no GRD bem como de ATF-3 no corno dorsal da ME. Talvez o dano provocado pela OXL e o estabelecimento da NSP se inicie mais precocemente no SNP e depois se estenda para o SNC. Ainda nesta etapa do estudo observamos um importante efeito neuroprotetor da MTF na NSP induzida por OXL tanto nos estágios iniciais como tardios do estabelecimento dessa neuropatia. Ainda é grande o desafio no entendimento dos mecanismos e mediadores envolvidos na NSP induzida por OXL bem como na busca de opções terapêuticas para o tratamento da neurotoxicidade crônica associada à OXL.

Um estudo conduzido por Russe *et al.* (2013) mostraram que a ativação da AMPK está associado a efeitos benéficos como a melhoria dos estados hiperglicêmicos no diabetes bem como na redução da obesidade e processos inflamatórios. Neste estudo, foi investigado o impacto da AMPK na nocicepção inflamatória utilizando 5-amino-1-β-D-ribofuranosil-imidazole-4-carboxamida (AICAR) e MTF como ativadores de AMPK. Observou-se efeito anti-inflamatório e antinociceptivo pela ativação da AMPK por esses ativadores. O mecanismo parece basear-se na regulação da subunidade AMPKα2 da quinase em neurônios e células imunes. Testes com camundongos nocaute para AMPKα2 mostraram aumento nociceptivo. Respostas que não foram revertidas por ativadores da AMPK. Esses efeitos são pelo menos parcialmente mediados por redução da ativação de diferentes quinases de AMPK na coluna vertebral. E subsequente diminuição na indução de c-Fos relevante para a dor, o que constitui um marcador de atividade elevada nos neurônios da ME após estimulação periférica nociva. Esses dados indicam que a ativação de AMPKα2 pode representar uma nova opção terapêutica para o tratamento da dor associada à inflamação, proporcionando analgesia com menos efeitos adversos indicando que AMPK poderia servir como um novo alvo terapêutico em dor com menos efeitos indesejáveis secundários.

Em um estudo bastante recente conduzido por Ling *et al.* (2017) disponível *online* e com publicação prevista para o ano de 2017 demonstraram que a atividade diminuída de AMPKα foi significativamente acompanhada pelo aumento da plasticidade sináptica induzida por estimulação de alta frequência.

A ativação de AMPK pode ser mediada por caminhos diferentes. Pode resultar da 1) ligação alostérica de AMP ou análogos estreitamente relacionados à subunidade G da enzima ou 2) fosforilação reversível da subunidade catalítica por LKB1, que ocorre principalmente em um resíduo de treonina na subunidade alfa (α). Ligação de AMP à subunidade (δ) gama também aumenta a extensão da fosforilação da subunidade alfa (α) por inibição da desfosforilação (CARLING *et al.*, 2012).

Diante das crescentes investigações disponíveis na literatura sobre o papel da via mTOR/AMPK na neuroproteção por MTF, associado aos nossos resultados demonstrando o seu efeito neuroprotetor na NSP por OXL, torna-se importante a continuidade da pesquisa desse fármaco nesse modelo associado a investigação do envolvimento dessa via no possível mecanismo.

Atualmente não existem fármacos aprovados para o tratamento da NSP induzida por OXL. Por isso, pacientes com CCR em tratamento com OXL podem está recebendo doses menores desse fármaco. Além disso a NSP induzida por OXL reduz acentuadamente a qualidade de vida dos pacientes durante e após o tratamento. Por isso é tão importante o entendimento da patogênese dessa neuropatia a fim de buscarmos alternativas para prevenção e/ou tratamento da neurotoxicidade consequente a OXL.

Estes resultados devem servir de estímulo para outros pesquisadores continuar suas pesquisas sobre o potencial papel neuroprotetor da neuropatia induzida por OXL. Além disso, devemos apostar na pesquisa de novos alvos celulares e moleculares bem com em fármacos com promissor potencial no tratamento e prevenção da neurotoxicidade induzida por OXL.

Acreditamos que os resultados apresentados no presente estudo possam melhorar a compreensão da patogênese da neuropatia induzida por OXL e sugerimos novos estudos sobre os efeitos neuroprotetores da MTF a fim de habilitá-la como fármaco para a prevenção e/ou tratamento da neuropatia induzida pela OXL.

8 CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados e discutidos no presente estudo, concluímos que uma condição pré-existente de DM associada com hiperglicemia persistente em camundongos, tanto antecipa como amplifica o desenvolvimento da NSP induzida por OXL.

A MTF apresentou importante papel protetor na NSP induzida por OXL diminuindo o comportamento nociceptivo frente aos estímulos mecânicos e térmicos assim como a expressão de c-Fos no GRD. Além disso, a MTF mostrou também importante papel neuroprotetor observado pela diminuição da imunoexpressão de ATF-3 no GRD e ME.

REFERÊNCIAS

ALESSANDRI-HABER, N. *et al.* Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. **J. Neurosci**, v. 28, p.1046–1057, 2008.

ALVES NETO. *et al.* **Dor**: Principios e prática. São Paulo: Artmed, 2009.

AHMED, N.; ZAHRA, N. Neurochemical correlates of alloxan diabetes: Glucose and related brain metabolism in the rat. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 494–505, 2011.

AHN, J. S.; LEE, T. H; LEE, M. C. Ultrastructure of neuromuscular junction in vacor induced diabetic rats. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v.13, p. 47–50, 1998.

ALBERTI, K.G.M.M; ZIMMET, PZ, World Health Organization Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Report of WHO Consultation**. Geneva: WHO, 1999.

ALI, B.H. Amelioration of oxaliplatin neurotoxicity by drugs in humans and experimental animals: a minireview of recent literature. **Basic & Clinical/ Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p.272-279, 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **American Cancer Society Global cancer facts and figures**, 2nd., Atlanta, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 38 (Suppl), p. S8-S16, 2015.

ANDRÉ, T. *et al.* A. Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. **N ENGL J Med**, v.350, n. 23, p.2343-2351, 2004.

- ANAND, U.; OTTO, W.R.; ANAND, P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. ***Molecular Pain***, v. 6, p. 82, 2010.
- ANG, L. et al. Glucose control and diabetic neuropathy: lessons from recent large clinical trials. ***Curr Diab Rep.*** V.14, p.528, 2014.
- ARGYRIOU, A.A. et al. A review on oxaliplatin induced peripheral nerve damage. ***Cancer Treat Rev***, v.34, p.368-77, 2008.
- 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.
- BAILEY, CC. et al. Alloxan diabetes with diabetic complications. ***New England J Med.*** v. 230, p. 533-536, 1944.
- BABU, P. V. A. et al. Green tea attenuates diabetes induced Maillard-type fluorescence and collagen cross-linking in the heart of streptozotocin diabetic rats. ***Pharmacol. Res***, v. 55, p. 433–440, 2007.
- BINDER, A. et al. Pain in oxiliplatina-induced neuropathy- Sensitisation in the peripheral and central nociceptive system. ***Europen journal of cancer.*** p. 2658-2663, 2007.
- BOEHMERLE, W. et al. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, v. 104, p. 11103–11108, 2007.
- BOSI, E. Metformin--the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us ? ***Diabetes Obes Metab.*** v. 11, p.3-8, 2009.
- BOULTON, A.J. et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. ***Diabetes Care.*** v. 28, p.956, 2005.

BULLITT, E. et al. The effect of stimulus duration on noxious stimulus induced c-Fos expression in the rodent spinal cord. **Brain Res**, v. 580, p. 172-179, 1992.

BULLITT, E. Induction of c-Fos-like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. **Brain Res**, v. 493, p. 391-397, 1989.

CARLING, D. et al., AMP-activated protein kinase: New regulation, new roles? **Biochem J**, v. 445, p.11-27, 2012.

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.

CHU, E. Oxaliplatin: The new member of the class. In: MARSHALL. J. The Clinical Use of Oxliplatin case studies and roundtable discussion. **Oncology**, v.1, 2004.

CHIANG, S. T. et al. Investigation of the protective effects of taurine against alloxan-induced diabetic retinal changes via electroretinogram and retinal histology with New Zealand white rabbits. **International Journal of Endocrinology**, v. 4, p. 63-79, 2014.

CINTRA, A. et al. Colocalization of c-Fos and glucocorticoid receptor-immunoreactivities is present only in a very restricted population of dorsal horn neurons of the rat spinal cord after nociceptiva stimulation. **Brain Res**, v. 632, p. 334-338, 1993.

CHEN, B.P.; WOLFGANG, C.D.; HAI, T. "Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10". **Molecular and Cellular Biology**. v. 16, n.3, p. 1157-68, 1996.

CHO, J.M. et al. Role of teh Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. **Cancer Letters, Amsterdam**, v. 260, p. 96-108, 2008.

DOMINGUEZ, L.J. *et al.* SOWERS JR. Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. ***Endocrinology***. v. 137, p.113-21, 1996.

DORNAS, W.C. *et al.*, Aoxano e Diabetes. ***Revista Brasileira de Toxicologia***, v. 19, n.2, p. 81-87, 2006.

DESCOEUR, J. *et al.* Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodeling of ion channel expression in nociceptors. ***EMBO Mol. Med***, v. 3, p. 266–278, 2011.

DEAN, PM; MATTHEWS E.K. The bioelectrical properties of pancreatic islet cells: effect of diabetogenic agents. ***Diabetologia***, v. 8, p.173-178, 1972.

DEL BARCO S. *et al.* Metformin: multi-faceted protection against cancer. ***Onco target***, v. 2, p. 896–917, 2011.

DOWLING RJ; GOODWIN PJ, STAMBOLIC V Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. ***BMC Med*** , v. 9, p. 33, 2011.

DWORKIN, R.H. *et al.* Advances in neuropathic pain diagnostic, mechanism, and treatment recommendations, ***Arch Neurosc***, v. 60, n.11, p. 1524-1534, 2003.

DEY, P. *et al.* Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant Nerium oleander through alloxan induced diabetes in mice. ***Journal of Ethno pharmacology***, v. 161, p.128–137, 2015.

DE GRAMONT A; FIGER, A; SEYMOUR M. Leucovorin and fluouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal câncer. ***J Clin Oncol***, v. 18, p. 2938-2947, 2000.

DI CESARE MANNELLI, L. *et al.* Antineuropathic Profile of N-Palmitolyethanolamine in a Rat Model od Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity, ***Plos One***, v.10, v.6, p.128-142, 2015.

DI CESARE MANNELLI, L. *et al.* Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Exp Neurol**, v. 26, p. 22–33, 2014.

DYCK, P.J. *et al.* The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. **Neurology**. V. 43, p.2345, 1993.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2015-2016)/Adolfo, Milech *et al.*; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - **São Paulo**: A.C. Farmacêutica, 2016.

DUMM, C.L.A.G. *et al.* Quantitative immune cytochemical study of islet cell population in diabetic calmodulin transgenic mice. **Virchows Archiv**, v.425, n.1, p.73-77,1994.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)**, v.46, n. 3, p. 208-9, 1957.

DZAMKO NL, STEINBERG GR. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 196, p.115-27, 2009.

EDDY NB; LEIMBACH D. Synthetic analgesic. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutyl amines. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 107, p. 385-393, 1953.

ELSNER, M. *et al.* Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. **Diabetologia**, v. 45, p1542-1549, 2002.

ENGLAND, J.D. *et al.* Distal symmetric polyneuropathy: a definition for clinical research: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. **Neurology**. V. 64, p.199, 2005.

ENGEL, C.C. Review: In neuropathy, fibromyalgia or chronic pain, duloxetine reduces pain but increases adverse events. **Ann Intern Med**, v. 160, n.8, p.12, 2014.

FAVARO, R. R., *et al.* Long-term type 1 diabetes alters the deposition of collagens and proteoglycans in the early pregnant myometrium of mice. ***Histology and Histopathology***, v.30, p.435–444, 2015.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. Diabetes Atlas [Internet]. 6a ed. Brussels: ***International Diabetes Federation***, 2014. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em: 19/jan/2014.

FEDERIUK, I. F. *et al.* Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. ***Comparative Medicine***, v. 54, p. 252–257, 2004.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. ***Int J Cancer***, v.136, n.5, p.E359-E386, 2015.

FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN 2012, v 1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N° 11. Lyon, France: ***International Agency for Research on Cancer***; 2013. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>. Acessado em 05/jan/2016.

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.

FRYER LG; PARBU-PATEL A; CARLING D. The Antidiabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. ***J Biol Chem***, v. 277, p. 25226-32, 2002.

GORDOIS, H. *et al.* The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US, 2006.

GOGAS, K.R. *et al.* The antinociceptive action of supraspinal opioids from an increase in descending inhibitory control; correlation of nociceptive behavior and c-Fos expression. ***Neuroscience***, v. 42, p.617-628, 1991.

GOLDBERG RM; SARGENT DJ; MORTON RF. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. ***J Clin Oncol***, v. 22, p. 22-30, 2004.

GILRON, R. *et al.* Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. ***Mayo Clinic Proceedings***. v. 90, p.532-545, 2015.

GUIGAS B; DETAILLE D, *et al.* Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological invitro study. ***Biochem J***.v.15, p. 877-84, 2004.

GURUSUBRAMANIAN, G.; ROY, V. K. Expression of visfatin in alloxan-induced diabetic rat testis. ***Acta Histochemica***, v.116, p. 1462–1468, 2014.

HAMILTON, J. *et al.* Metformin as an adjunct therapy in adolescents with type 1 diabetes and insulin resistance: a randomized controlled trial. ***Diabetes Care***, 26, 138-143, 2003.

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

HOWELL, S. J. *et al.* Degeneration of retinal ganglion cells in diabetic dogs and mice: relationship to glycemic control and retinal capillary degeneration. ***Molecular Vision***, v.19, p.1413, 2013.

HOLLY, D.S. *et al.* Differential and Prolonged Expression of Fos–lacZ and Jun–lacZ in Neurons, Glia, and Muscle Following Sciatic Nerve Damage. ***Experimental Neurology***, v. 167, p.1–14, 2001.

HANS, L. *et al.* "Activating transcription factor 3, a useful marker for regenerative response after nerve root injury". **Front Neurol**. v. 2, p. 30, 2011.

HOYERT, DL; XU, JQ. Deaths: preliminary data for 2011. **Natl Vital Stat Rep**, v. 61, n.6, p. 1-52, 2012.

HERDEGEN, T. *et al.* Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. **Mol. Brain**, v. 22, p.245-258, 1994.

HUNDAL, HS, *et al.* Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. **Endocrinology**, v. 131, p.1165-73, 1992.

HUNDAL, R.S. *et al.* Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 49, p.2063-9 ,2000.

HUANG, Z.Z., *et al.*, Mir-500-mediated GAD67 downregulation contributes to neuropathic pain. **J. Neurosci**. v. 36, p. 6321–6331, 2016a.

HUANG, Z.Z., *et al.*, Cerebrospinal fluid oxaliplatin contributes to the acute pain induced by systemic administration of oxaliplatin. **Anesthesiology** v. 124, p. 1109-1121, 2016b.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2016**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016.

IRSHAD, N. *et al.* Hypoglycaemic effects of Methanolic extract of *Canscora decussata* (Schult) whole plant in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 167–174, 2015.

IYNEDJIAN, P. B. Molecular physiology of mammalian glucokinase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p. 27–42, 2009.

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

JASMIN, L. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? **Neuron Glia Biol**, v. 6, p. 63-71, 2010.

JACONS, S. *et al.* Extracellular fluid concentrations of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in brain, muscle and blood measured using microdialysis in no human primates. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n.5, p. 817-824, 2010.

JERGOVA, S.; CIZKOVA, D. Long-term changes of c-Fos expression in the rat spinal cord following chronic constriction injury. **Eur J Pain**. v.3, p.345-54, 2005.

JÖRNS, A. *et al.* Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. **J Endocrinol**. v.155, n. 2, p. 283-93, 1997.

JÖRNS, A. *et al.* Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. **Free Radical Biol Med**. v. 26, p. n. 9-10, p.1300-4, 1999.

JOSEPH, E.K. *et al.* Oxaliplatin acts on IB4 positive nociceptors to induce an oxidative stress dependent acute painful peripheral neuropathy. **J Pain**, v. 9, p. 463–472, 2008.

JOSEPH, E.K.; LEVINE, J.D. Caspase signaling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. **Eur. J. Neurosci**, v.20, p.2896–2902, 2004.

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, p. 2009.

KALEY, T.G; DEAGELIS, L.M. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **British Journal of Hematology**, v. 145, p.3-14, 2009.

KATSUMATA, K., et al. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. ***Hormone and Metabolic Research***, v. 24, p. 508–510, 1992.

KATSUMATA, K. et al. Potentiating effects of combined usage of three sulfonylurea drugs on the occurrence of alloxan diabetes in rats. ***Hormone and Metabolic Research***, v. 25, p.125–126, 1993.

KATSUMATA, K.; MIYAO, M. Insulin potentiating effect on development of alloxan diabetes and its prevention by the Ca-channel blocker nifedipine. ***Hormone and Metabolic Research***, v. 30, p. 557–558, 1998.

KIM, H.K. *et al.* Phenyl Ntertbutylnitron, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy induced neuropathic pain in rats. ***Anesthesiology*** v.112, p. 432–439, 2010.

KIM, J. M. *et al.* H. Endoneurial microangiopathy of sural nerve in experimental vacor-induced diabetes. ***Ultrastructural Pathology***, v.26, p. 393–401, 2002.

KIRPICHNIKOV D, MCFARLANE SL, SOWERS JR, Metformin: an update. ***Ann Intern Med.***, n. 137, p. 25-33, 2002.

KOTZE, PAULO GUSTAVO *et al.* Comparison of the Number of Retrieved Lymph Nodes in Colorectal Cancer Resection Specimens Between Conventional and Laparoscopic Surgery. ***Rev Bras. Colo-Proctol***, v.30, n.2, p. 119-127, 2010.

KLIBER A, *et al.* Alloxan stimulation and subsequent inhibition of insulin release from in situ perfused rat pancreas. ***J Physiol Pharmacol.*** v. 47, n.2, p.321-8, 1996.

KIRSTEN V.R. *et al.* Modelos experimentais para o modelo do diabetes tipo 1. ***Medicina Ribeirão Preto***, v.43, n.1, p. 3-10, 2010.

KIM, H.R. *et al.* Role of Ca²⁺ in alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. ***Biochim Biophys Acta***, v.1227, p.87-91, 1994.

KING RH. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *Mol Pathol*. V. 54, p.400, 2001.

KIRPICHNIKOV, D; MCFARLANE, S.I; SOWERS, J. R. Metformin: an update. *Ann Intern Med*, v. 137, p.25-33, 2002.

LAIRD, J.M.A. *et al*. A New Model of Visceral Pain Referred Hyperalgesia in the Mouse. *Pain*, v. 92, p. 335-342, 2001.

LEE, J. H. *et al*. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, p. 1–23, 2010.

LERCO, M.M. *et al*. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, n. 2, p. 132-143, 2003.

LEONARD, GREGORY D *et al*. Survey oxaliplatin-associated neurotoxicity using an interview-based questionnaire in patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. N. 5, p.116, 2005

LENZEN, S. (Review) The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, p. 216-226, 2008.

LENZEN, S; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochemical Pharmacology*, v. 42, n.7, p.1385-1391, 1991.

LENZEN, S.; PANTENE U. Alloxan: History and mechanism of action. *Diabetologia*, v.31, p. 337-342, 1988a.

LENZEN, S.; PANTENE U. Signal recognition by pancreatic b-cells, *Biochem Pharmacol*, *Diabetologia* v. 37, p. 371-378, 1988b.

LE BARS, D; GOZARIU, M; CADDEN, SW. Animal models of nociception.

Pharmacol Rev, v. 53, n. 4, p. 597 – 652, 2001.

LING,B; AUTHIER N; BALAYSSAC D; Eschalier A; Coudore F. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. **Pain**, v. 128, p. 225–234, 2007.

LING, B. *et al.* Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. **Pain**, v. 128, p. 225–234, 2007.

LINO, J.A. **Efeito protetor da aminofostina na neuropatia sensitiva periférica experimental induzida por oxaliplatina**. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

LIM CT, KOLA B, KORBONITS M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. **J Mol Endocrinol**. v. 44, p.87-97, 2010.

LIN, H. V; ACCILI, D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. **Cell Metabolism**, v.14p. p.9–19, 2011.

LOPES, F.R.P. *et al.* Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy. **Neuropathology and Neurobiology**, v. 37, p. 600-612, 2011.

MAGALHÃES, L.A. *et al.* Influência da dieta hiperglicêmica e do diabetes aloxânico sobre a vitalidade do schistosoma mansoni sambon, 1907, em camundongos experimentalmente infectados. **Rev Saude Pub, São Paulo**, v. 12, p.267-276, 1978.

MATTHAEI, S. *et al.* Association of Metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. **Diabetes**. v. 40, p.850-7, 1991.

MARTINEZ, C.A.R. *et al.* Influence of tumor localization on the tissue expression of p53 protein in patients with colorectal cancer. study of 100 cases. **Rev. Col. Bras. Cir**, v.35, n.4, p. 235-243, 2008.

MARTÍNEK, J. *et al.* Morphometrical histochemical and biochemical parameters in the dog alloxan diabetes. **Functional and Developmental Morphology**, v. 3, p. 209–212, 1992.

MALERBI D; FRANCO LJ, the Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30 a 69 years. **Diabetes Care**. v. 15, n.11, p. 1509-16, 1992.

MARTIN, C.L. *et al.* Neuropathy and related findings in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. **Diabetes Care**. V. 37, p.31-8, 2014;

MENDONCA, C.F. *et al.* Unusual Manifestation of Colorectal Cancer - A Case Report. **Rev Bras. Colo-Proctol**, v.28, n.1, p. 99-103, 2008.

MEYERHARDT, J.A; MAYER R.J. Systemic therapy for colorectal cancer. **N Engl J Med** v. 352, p. 476-87, 2005.

MEYER, L. *et al.* The Benefits of Metformin Therapy During Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Treatment of Type 1 Diabetic Patients. **Diabetes Care** n 25, p. 2153-2158, 2003

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Mortalidade: Brasil**. 2015. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 30 set. 2016.

MILTENBURG NC & BOOGERD W. Chemotherapy-induced neuropathy: a comprehensive survey. **Rev Cancer Treat**, v.40, n.7, p.872-82, 2014.

MORGAN, M.M.; GOGAS, K.R.; BASBAUM, A.I. Diffuse noxious inhibitory controls reduce the expression of noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the superficial and deep laminae of the rat spinal cord. ***Pain***, v. 56, p.347-352, 1994.

MORAES AS DE. *et al.* Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil 2006: Projeto OBEDIARP. ***Cadernos Saúde Pública***, v.26, p. 929-41, 2010.

MUGNAINI, E. *et al.* Fos-like immunoreactivity induced by seizure in mice is specifically associated with euchromatin in neurons. ***Eur j Neurosci***, v.1, n.1, p.46-52. 1989.

MUTHURAMAN, A. *et al.* Ameliorative effects of amiloride and pralidoxime in chronic constriction injury and vincristine induced painful neuropathy in rats. ***Eur. J. Pharmacol***, v. 587, p.104–111, 2008.

MUSI, N. *et al.* Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. ***Diabetes***, v. 51, p. 2074-81, 2002.

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

NORCINI, N. *et al.* Supraspinal role of protein kinase C in oxaliplatin-induced neuropathy in rat, ***Pain***, v. 146, p.141-147, 2009.

NIETO, F.R. *et al.* Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. ***Pain***, v. 137, p. 520–531, 2008.

OWEN, MR; DORAN, E; HALESTRAP, A.P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. ***Biochem J***, v. 348, p.607-14, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global status report on non communicable diseases 2010. Geneva: ***World Health Organization***, p. 176, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life.** Geneve: WHO, 2002.

PARK, B.H. *et al.* Protective mechanism of glucose against alloxan induced pancreatic beta-cell damage. **Biochem Biophys Res Commun**, v.210, n.1, p.1-6, 1995.

PARTANEN, J. *et al.* Natural history of peripheral neuropathy in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**. V. 333, p.89, 1995.

ROIVAINEN, R. & KOISTINAHO, J. Decentralization induces long-term c-fos protein-like immunoreactivity in non-neuronal cells in the rat superior cervical ganglion. **Neuroscience Letters**, v.119, p.105-108, 1990.

PEREIRA, A.F. **Papel do oxalato na neuropatia periférica induzido por oxaliplatina em camundongos:** comparação entre a oxaliplatina e o seu análogo. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

PICE, J.A. Clinical Challenges: chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Seminars in Oncology Nursing**, v.25, n.2, p.8-19, 2009.

PRESLEY, R.W. *et al.* Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. **J. Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 322-335, 1990.

PONTES, R.B. **Desenvolvimento de modelo experimental de neuropatia sensitiva periférica induzida pelo agente antineoplásico oxaliplatina em camundongos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

PFUTZNER, A. *et al.* The influence of isolated small nerve fibre dysfunction on microvascular control in patients with diabetes mellitus. **Diabet Med**. V.18, p.489, 2001.

QUANG, P.N.; SCHMIDT, B.L. Peripheral endothelin B receptor agonist-induced antinociception involves endogenous opioids in mice. ***Pain***, v.142, n. 2, p.254-256, 2010.

RAMANATHAN, R.K. *et al.* Incidence and evolution of oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in diabetic patients with colorectal cancer: a pooled analysis of three phase III studies. ***Annals of Oncology***, v. 21, p. 754-758, 2010.

RADENKOVIĆ, M. *et al.* Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. ***Journal of Pharmacological and Toxicological Methods***, v. 78, p.13–31, 2016.

RICHARDS, J.S. *et al.* Efficacy of venlafaxine XR for the treatment of pain in patients with spinal Cord injury and major depression: a randomized controlled Trial. ***Arc Phys Med Rehabil***, v. 96, n. 4, p. 680-689, 2015.

ROOS, M; CLAUDIO I.L.P; SIQUEIRA, R. A., *Abordagem Farmacológica no Diabetes*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2009.

RUSSE, O.Q. *et al.*, Activation of the AMP-Activated Protein Kinase Reduces Inflammatory Nociception. ***The Journal of Pain***, p. 1-11, 2013.

SAKURAI, K; OGISO, T. Generation of alloxan radical in rat islet cells participation of NADPH cytochromo P-450 reductase. ***Biol. Pharm. Bull***, v. 17, n.11, p.1451-1455, 1994.

SAKURAI, K; OGISO, T. Effect of ferritin on DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPH cytochrome P450 reductase: ferritin's role in diabetogenic action of alloxan. ***Biol Pharm Bull***, v. 18, p. 262-266, 1995.

SALTZ, L.B. **Colorectal Cancer Multimodality Management**. 1^a ed. Humana Press, 2002. 530 p,

SELVARAJ, N.; BOBBY, Z.; SRIDHAR, M. G. Increased glycation of hemoglobin in chronic renal failure patients and its potential role of oxidative stress. **Arch. Med. Res**, v. 39, p. 277–284, 2008.

SCHMIDT, M.I. *et al.* Chronic non communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, v.377, n. 9781, p. 1949-61, 2011.

SCHMIDT, M.I; HOFFMANN, J.F; DINIZ, M.F.S *et al.* High prevalence of diabetes and intermediate hyperglycemia – The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Diabetol Metab Syndr**. v. 6, n. 123, p. 1-9. ,2014.

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

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res**. v. 50, p.536-546, 2001.

SCHOSSLER, D.R.C. *et al.* Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini* **Ciência Rural, Santa Maria**, v.34, n.6, p.1821-1825, 2004

SZKUDELSKI, T. *et al.* Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiological Research**, v. 47, p. 343–346, 1998.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **J. biol. Chem.**, v. 195, p.19-23, 1952.

SCHIFF, D. *et al.* Neurological adverse effects caused by cytotoxic and targeted therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, p. 596-603, 2009.

TAKEDA, R. *et al.* Analgesic effect of milnacipran is associated with c-Fos expression in the anterior cingulate cortex in the rat neuropathic pain model. **Neuroscience Research**, v. 64, p.380–384. 2009.

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

TORRE, *et al.* Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

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

UWAH, A.N. *et al.* The Effect of Diabetes on Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 11, n. 4, p. 275-9, 2012.

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: **Blood Flow and Metabolism**, v. n.9, p.1077-1089, 2001.

VOLPATO, M.G; KOCH, K.S. Bad Prognostic Factors on the Operatory Peace of Patients Submitted to Surgical Treatment of Colorectal Cancer. **Rev Bras. Colo Proctol**, v.28, n.4, p. 414-424, 2008.

YANG, R.B. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, v. 395, p. 217–219, 1998.

YANG YX; *et al.* Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients. **Gastroenterology**, v. 127, p. 1044–1050, 2004.

ZHOU, W; KAVELAARS, A; HEIJNEN, CJ. Metformin Prevents Cisplatin-Induced Cognitive Impairment and Brain Damage in Mice. **PLOS ONE**, v. 28, 2016.

ZOU, MH. *et al.* Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo – role of mitochondrial reactive nitrogen species. **J Biol Chem**, v. 279, p.43940-51, 2004.

- ZANG, M. *et al.* AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. ***J Biol Chem.*** v. 279, p.47898-905, 2004.
- ZHANG, X. *et al.* Hepatic glucokinase activity is the primary defect in alloxan-induced diabetes of mice. ***Biomedicine & Pharmacotherapy,*** v.63, n. 3, p.180–186, 2009.
- WATKINS, J. B., & SHERMAN, S. E. Long-term diabetes alters the hepatobiliary clearance of acetaminophen, bilirubin and digoxin. ***Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,*** v. 260, p. 1337-1343, 1992.
- WILSON, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. ***Journal of Experimental Biology,*** v. 206, p. 2049–2057, 2003.
- WEISBREN, B. A. Alloxan diabetes in mice. ***Proc. Soc. exp. Biol., New York,*** v. 67, p.154-7, 1948.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 27/2012, sobre o projeto intitulado: **“INFLUÊNCIA DO DIABETES INDUZIDO POR ALLOXANO NO CURSO DA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRIA CONSEQUENTE À OXILIPLATINA: MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS”**, de responsabilidade de Ronaldo de Albuquerque Ribeiro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 14 de maio de 2012.

Fortaleza, 29 de maio de 2012


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA