

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**RENATA BESSA PONTES**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE  
NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO  
AGENTE ANTINEOPLÁSICO OXALIPLATINA EM  
CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA**  
**2009**

RENATA BESSA PONTES

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE  
NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO AGENTE  
ANTINEOPLÁSICO OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Mariana Lima Vale

Co-orientador:

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

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

FORTALEZA  
2009

P859d Pontes, Renata Bessa

Desenvolvimento de modelo experimental de neuropatia sensitiva periférica induzida pelo agente antineoplásico oxaliplatina em camundongos / Renata Bessa Pontes – Fortaleza, 2009.

139 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Lima Vale

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009

1. Compostos de Platina 2. Doenças do Sistema Nervoso Periférico 3. Camundongos I. Vale, Mariana Lima (orient.)  
II. Título

CDD: 546.645

RENATA BESSA PONTES

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DE  
NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO AGENTE  
ANTINEOPLÁSICO OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS

Essa dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial da referida Universidade.

**Data da aprovação: 18/12/2009**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Danielle Silveira Macedo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha  
Faculdade de Medicina Ribeirão Preto (USP)

**Dedico essa dissertação a toda minha família que tanto me apóia. Em especial aos meus pais que sempre acreditaram no meu sucesso, aos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado e ao meu noivo pelo apoio e dedicação.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades em minha vida, pelos dons da ciência e sabedoria tão necessários para o desenvolvimento desse trabalho.

Muito especialmente à minha orientadora Profa. Mariana Lima Vale pela sua paciência e apoio transmitindo-me exemplo de competência para a realização desse trabalho.

Aos professores Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza e Gerly Anne de Castro Brito que estiveram presentes no desenvolvimento desse estudo.

Aos voluntários do projeto Flávio Esmeraldo e Marcell Paiva pela participação neste trabalho.

À Roberto César e Deysi, pela amizade e disposição para ajudar.

Aos amigos do LAFICA: Rosinha, Adriana Lima, Juliana Lino, Antoniella, Jand-Verne, André Luis, Pedro, Graciela e aos colegas de sala de aula Otacílio, Ana Paula e Tiago.

Aos Funcionários: Vandinha, Tiara, Carol, Socorro, Aura e Francisco pelo reiterado carinho e apoio.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela formação que me legaram.

Aos meus pais, amigos incondicionais, pelo eterno e imensurável amor, pela minha existência e o que dela sou.

Aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhos, tios, primos e amigos por sempre acreditarem na minha dedicação e nos frutos dela colhidos.

Ao meu noivo, Júlio César, amigo e confidente, pelo lindo amor que me dedica, por me tornar uma pessoa mais feliz e por acreditar em meus e em nossos sonhos.

À CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça, e todas as coisas vos serão acrescentadas. (Mt 6, 33).

## RESUMO

**Desenvolvimento de modelo experimental de neuropatia sensitiva periférica induzida pelo agente antineoplásico oxaliplatina em camundongos. PONTES, Renata Bessa; LIMA, Mariana Lima. Renata Bessa Pontes. Orientadora: Profa. Dra. Mariana Lima Vale. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2009.**

Oxaliplatina (OXL) é a 3ª geração de agentes platinos com amplo espectro de atividade antitumoral. Exibe potente atividade citotóxica, incluindo câncer colorretal, ovariano e pulmonar. Dentre os efeitos tóxicos estão: laringoespasma, náuseas, vômitos, fadiga e neuropatia periférica, foco desse trabalho. Essa pesquisa objetivou desenvolver um modelo experimental para estudo da neuropatia sensitiva periférica induzida por OXL em camundongos que são animais geneticamente mais semelhantes ao ser humano, econômicos e dado a existência de espécies diferentes para vários fatores. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC (protocolo nº 70/07). Camundongos Swiss machos (20-40g) foram tratados com OXL (1-4 mg/kg, EV) por 4 semanas paralelamente aos testes neuropáticos utilizados para avaliar o desenvolvimento da neuropatia sensitiva e Rota Rod para verificar comprometimento motor. A hiperalgesia e alodínia térmica foram avaliadas pelo teste de imersão da cauda (TIC) em água fria (4 ou 10°C) e em água aquecida (46 ou 42°C). O teste de hiperalgesia e alodínia mecânica (HPM; Von Frey) consistiu na estimulação das patas traseiras com um sensor de força (g) até a sua retirada por um movimento de “flinch”. Foi ainda verificado a ação analgésica da carbamazepina (CZP), oxcarbazepina (OZP), gabapentina (GABAP) e indometacina (INDO) no TIC água fria. Foi realizado a imunohistoquímica das patas traseiras dos animais em 24h e de 7 a 28 dias. Como resultados observou-se que no HPM houve uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no limiar nociceptivo a partir do 14º dia atingindo o máximo na dose de 2mg/kg comparado ao grupo controle. No TIC 4°C houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no limiar nociceptivo no 56º dia, no TIC alodínia pelo frio (10°C) foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) no limiar nociceptivo também no 56º dia, no TIC alodínia pelo quente (42°C) foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no limiar nociceptivo a partir do 35º dia. Esses testes atingiram o máximo na dose de 1mg/kg comparados com o grupo controle e no TIC 46°C foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) no limiar nociceptivo a partir do 49º dia atingindo o máximo na dose de 1 e de 4mg/kg comparado ao grupo controle. No teste Rota Rod nenhuma variação significativa foi observada em nenhum dos grupos, indicando a ausência de comprometimento motor. O tratamento com CZP (0,3-30mg/kg), OZP (0,3-100mg/kg) e GABAP (6-54mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo, indicando efeito analgésico e INDO (1-4mg/kg) não demonstrou atividade analgésica nesse modelo. Na análise da imunohistoquímica ficou comprovado que existe a participação provável de SP, CGRP e NMDA periféricos e nitrotirosina. Portanto, o uso de camundongos e do diferente método de administração da OXL (EV) pode ser utilizado em modelos futuros viabilizando o uso do fármaco para tratamento do câncer, principalmente o colorretal, com todo o esquema terapêutico, sem que a NSP interfira nas atividades de vida do paciente tratado.

Palavras-chave: Compostos de Platina. Doenças do Sistema Nervoso Periférico. Camundongos.



## ABSTRACT

**Development of experimental model of peripheral sensitive neuropathy prompted by the oxaliplatin in mice. Renata Bessa Pontes. Principal guide: Profa. Dra. Mariana Lima Vale. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2009.**

Oxaliplatin (OXL) is a third-generation platinum-based chemotherapy with broad spectrum of anti-tumoral activity. Exhibit potent cytotoxic activity including against cancer colorectal, ovarian and lung cancer. Among the toxic effects are: laryngospasm, nausea, vomiting, fatigue and peripheral neuropathy, focus of that work. That research planned to develop an experimental model for study of the peripheral neuropathy induced by OXL in mice that are animal genetically more similar to the human, economic and given the knockout species existence for several factors. The study was approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the UFC (protocol nº 70/07). Mice Swiss male (20-40g) were treated with OXL (1-4 mg/kg, EV) for 4 weeks in parallel to the neurophatic tests utilized for evaluate the development of the peripheral neuropathy and Route Rod for verify some motor compromise. To mechanical hyperalgesia and allodynia thermal were evaluated by the test of immersion of the tail (TIC) in cold water (4 or 10°C) and in water heated (46 or 42°C). The test of hyperalgesia and allodynia (HPM; Von Frey) consisted of the stimulation of the rear paws with a sensor of force (g) up to his retreat by a movement of "flinch". It was still verified the analgesic action of the carbamezepine (CZP), oxcarbazepine (OZP), gabapentin (GABAP) and indomethacin (INDO) in the TIC cold water. It was carried out to immunohistochemical of the hands paws of the animals in 24h and of 7 to 28 days. The results shows that in the HPM had a significant reduction ( $p < 0,001$ ) in the nociceptive threshold from the 14<sup>o</sup> day reaching the maximum one in the dose of 2mg/kg compared to the control group. In the TIC 4°C had a significant reduction ( $p < 0,05$ ) in the nociceptive threshold in the 56<sup>o</sup> day, in the TIC allodynia by the cold one (10°C) was observed a significant reduction ( $p < 0,01$ ) in the nociceptive threshold also in the 56<sup>o</sup> day, in the TIC allodynia by the hot one (42°C) was observed a significant reduction ( $p < 0,05$ ) in the nociceptive threshold from the 35<sup>o</sup> day. Those tests reached the maximum one in the dose of 1mg/kg compared with the control group and in the TIC 46°C was observed a significant reduction ( $p < 0,01$ ) in the nociceptive threshold from the 49<sup>o</sup> day reaching the maximum one in the doses of 1 and 4mg/kg compared to the control group. In the test Route Rod no significant variation was observed in no of the groups, indicating the absence of motor compromise. The handling with CZP (0,3-30mg/kg), OZP (0,3-100mg/kg) and GABAP (6-54mg/kg) increased the nociceptive threshold, indicating analgesic effect and INDO (1-4mg/kg) did not show analgesic activity in that model. In the analysis of the immunohistochemical was verified that exists the probable participation of SP, CGRP and NMDA peripheral and nitrotyrosine. Therefore, the use of mice and of the different approach of administration of the OXL (EV) can be utilized in future models making feasible the use of the drug for handling of the cancer, mainly the colorectal, with all the therapeutic plan without that to NSP interfere in the activities of the treated patient.

Keywords: Platinum Compound. Peripheral Neuropathy. Mice.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Novos casos estimados de câncer por sexo .....	19
FIGURA 2	Estrutura química de análogos platinos .....	26
FIGURA 3	Mecanismo de ação da oxaliplatina .....	29
FIGURA 4	Expectativa de vida do câncer colorretal metastático .....	34
FIGURA 5	Administração na veia lateral da cauda.....	56
FIGURA 6	Curva dose resposta para escolha da dose de oxaliplatina.....	57
FIGURA 7	Investigação do efeito de fármacos analgésicos.....	58
FIGURA 8	Investigação por imunohistoquímica.....	60
FIGURA 9	Aparelho eletrônico Von Frey.....	61
FIGURA 10	Teste de imersão da cauda .....	62
FIGURA 11	Aparelho de Rota Rod .....	63
FIGURA 12	Avaliação do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica plantar induzida por oxaliplatina .....	66
FIGURA 13	Avaliação do desenvolvimento de alodínia térmica ao frio (10°C) induzida por oxaliplatina. ....	68
FIGURA 14	Avaliação do desenvolvimento de alodínia térmica ao calor (42°C) induzida por oxaliplatina .....	69
FIGURA 15	Avaliação do desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao frio (4°C) induzida por oxaliplatina .....	71
FIGURA 16	Avaliação do desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor (46°C) induzida por oxaliplatina .....	72
FIGURA 17	Avaliação do efeito do tratamento crônico com oxaliplatina sobre da coordenação motora e equilíbrio de camundongos no teste do Rota Rod .....	74
FIGURA 18	Avaliação da média ponderal dos animais tratados com oxaliplatina .....	75
FIGURA 19	Efeito do anticonvulsivante carbamazepina (CBZ) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina .....	77

<b>FIGURA 20</b>	<b>Efeito do anticonvulsivante oxcarbazepina (OZP) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina .....</b>	<b>78</b>
<b>FIGURA 21</b>	<b>Efeito do anticonvulsivante gabapentina (GABAP) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina .....</b>	<b>80</b>
<b>FIGURA 22</b>	<b>Efeito do anticonvulsivante indometacina (INDO) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina .....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 23</b>	<b>Avaliação do efeito da carbamazepina, oxacarbazepina, gabapentina e indometacina sobre da coordenação motora e equilíbrio de camundongos tratados com oxaliplatina no teste do Rota Rod .....</b>	<b>83</b>
<b>FIGURA 24</b>	<b>Análise histopatológica de pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina .....</b>	<b>86</b>
<b>FIGURA 25</b>	<b>Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para CGRP em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina .....</b>	<b>87</b>
<b>FIGURA 26</b>	<b>Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para SP em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina .....</b>	<b>88</b>
<b>FIGURA 27</b>	<b>Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para NMDA em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina .....</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 28</b>	<b>Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para TNF em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina .....</b>	<b>90</b>
<b>FIGURA 29</b>	<b>Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para VR1 em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina .....</b>	<b>91</b>
<b>FIGURA 30</b>	<b>Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para nitrotirosina em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina .....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	<b>Esquemas de combinação FOLFOX.....</b>	<b>31</b>
<b>TABELA 2</b>	<b>Características clínicas da neuropatia induzida pela oxaliplatina.....</b>	<b>36</b>
<b>TABELA 3</b>	<b>Evolução da neurotoxicidade da oxaliplatina .....</b>	<b>37</b>
<b>TABELA 4</b>	<b>Estratégias para profilaxia e tratamento da neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina.....</b>	<b>38</b>
<b>TABELA 5</b>	<b>Seleção de termos e definições de dor (IASP) .....</b>	<b>41</b>
<b>TABELA 6</b>	<b>Modelos de dor neuropática em animais .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CBZ	Carbamazepina
CDME	Corno Dorsal da Medula Espinhal
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Cis[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Cis-diaminodicloroplatina II
CM	Centímetros
CTC INC	Critério de Toxicidade Comum do Instituto Nacional do Câncer
DACH	1-2-Diaminociclohexano
DLT	Dose Limite de Toxicidade
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOPA	Dopamina
DRG	Raiz Dorsal do Gânglio
EMG	Eletromiografia
ENM	Eletroneuromiografia
EPM	Erro Padrão da Média
ERCC1	<i>Excisionrepair</i> cruz complementação grupo 1
EUA	Estados Unidos da América
EV	Via Endovenosa
FU	Fluourouracil
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOLFOX	5-Fluorouacil, Oxaliplatina e Leucovorin
FOLFOX/BEV	5-Fluorouaci, Oxaliplatina, Leucovorin e Bevacizumab
G	Gramas
GABA	Ácido gaba-aminobutírico
GABAP	Gabapentina
H	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hMLH1	<i>human mut L homolog</i>

hMSH2	<i>human mut S homolog</i>
hMSH3	<i>human mut S homolog</i>
hMSH6	<i>human mut S homolog</i>
hPMS1	<i>human post meiotic segregation</i>
hPMS2	<i>human post meiotic segregation</i>
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
INDO	Indometacina
IP	Via Intraperitoneal
IROX	FOLFOX 4 e Irinotecano
INC	Instituto Nacional de Câncer
L-OHP	trans- <i>l</i> -diaminociclohexano oxalatoplatino
LV	Leucovorin
MIN	Minutos
MM	Milímetros
MMR	Reparo de má combinação
Na <sup>+</sup>	Sódio
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartato
NSP	Neuropatia Sensitiva Periférica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPTIMOX	Estratégia Stop-and-Go
OSNS	Escala de Neurotoxicidade Específica de Oxaliplatina
OXL	Oxaliplatina
OZB	Oxcarbazepina
Pt	Platinos
RNM	Ressonância Magnética
RPM	Rotações Por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Universidade Federal do Ceará

VO	Via Oral
VR1	Receptor Vanilóide
XELOX	Oxaliplatina e Capecitabina
δ	Delta

## SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Câncer .....	18
1.2 Tratamentos para o câncer .....	20
1.2.1 Cirurgia .....	21
1.2.2 Radioterapia .....	22
1.2.3 Quimioterapia .....	23
1.3 Classificação química dos quimioterápicos .....	23
1.3.1 Complexos de Platina .....	23
1.4 Oxaliplatina (OXL) .....	26
1.4.1 Mecanismo de ação antitumoral da oxaliplatina .....	27
1.4.2 Mecanismo de resistência da oxaliplatina .....	29
1.4.3 Farmacocinética da oxaliplatina .....	30
1.4.4 Esquemas quimioterápicos .....	31
1.4.5 Importância da oxaliplatina no tratamento do câncer .....	32
1.4.6 Efeitos colaterais do uso de oxaliplatina .....	34
1.4.6.1 Neurotoxicidade aguda .....	35
1.4.6.2 Neurotoxicidade crônica .....	35
1.4.6.3 Neurotoxicidade da oxaliplatina aspectos celulares e moleculares .....	38
1.5 Dor neuropática .....	39
1.5.1 Tratamento da dor neuropática .....	44
1.6 Modelos animais de dor neuropática .....	45
1.7 Justificativa e caracterização do problema .....	49
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>



2.1	Objetivo geral .....	51
2.2	Objetivos específicos .....	51
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
3.1	Animais .....	53
3.2	Aspectos éticos .....	53
3.3	Ambientes .....	53
3.4.	Horário dos experimentos .....	54
3.5	Observações clínicas .....	54
3.6	Aparelhos e instrumentos laboratoriais .....	54
3.8	Drogas, soluções, líquidos.....	55
3.9	Protocolo experimental e desenho do estudo .....	56
3.9.1	Curva dose-resposta para escolha da dose de oxaliplatina .....	56
3.8.2	Investigação do efeito de fármacos analgésicos .....	57
3.8.3	Avaliação histopatológica .....	58
3.8.4	Investigação por imunohistoquímica .....	59
3.10	Testes .....	60
3.10.1	Testes neuropáticos .....	60
3.10.1.1	Teste de hiperalgesia/alodínia mecânica plantar (Von Frey eletrônico) .....	60
3.10.1.2	Teste de hiperalgesia/alodínia térmica (teste de imersão da cauda) .....	61
3.10.1.3	Atividade motora forçada, locomoção e equilíbrio (Rota Rod) .....	62
3.10	Análise estatística .....	63
4	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>64</b>
4.1	Curva dose resposta para escolha da dose de oxaliplatina .....	65
4.1.1	Estudo da neuropatia sensitiva periférica .....	65
4.1.1.1	Estudo da hiperalgesia mecânica plantar (Von Frey) .....	65
4.1.1.2	Estudo da hiperalgesia e alodínia térmica (Imersão da cauda) .....	67
4.1.2	Estudo da atividade motora forçada, locomoção e equilíbrio .....	73
4.2	Média ponderal .....	73
4.3	Investigação do efeito de fármacos analgésicos .....	76
4.3.1	Carbamazepina (CBZ) .....	76
4.3.2	Oxcarbazepina (OZP) .....	76
4.3.3	Gabapentina (GABAP) .....	79

4.3.4	Indometacina (INDO) .....	79
4.3.5	Estudo da atividade motora forçada, locomoção e equilíbrio analisando o efeito dos fármacos analgésicos .....	82
4.4	Análise histopatológica .....	84
4.5	Análise de mediadores periféricos por imunohistoquímica .....	84
5	DISCUSSÃO .....	93
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	115
	REFERÊNCIAS .....	118
	APÊNDICES .....	131

## **INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

Neoplasia (*neo*= novo + *plasia* = tecido) é o termo que designa alterações celulares que acarretam um crescimento exagerado dessas células, ou seja, proliferação celular anormal, sem controle e de forma autônoma, na qual reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar, em consequência de mudanças nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular. A neoplasia pode ser maligna ou benigna.

As doenças neoplásicas representam um grave problema de saúde pública em todo o mundo, acometendo, a cada ano, nove milhões de pessoas das quais aproximadamente cinco milhões, evoluem para o óbito (OMS, 2009). O câncer de mama é a neoplasia de maior ocorrência entre as mulheres de países desenvolvidos ou em desenvolvimento. No Brasil é o primeiro ou o segundo câncer mais frequente, dependendo da região do país (GUIRRO; GUIRRO, 2004).

As neoplasias malignas representam uma classe de doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células aberrantes. A invasão destrutiva de órgãos normais por estas células, por extensão direta ou por disseminação à distância que pode ser através do sangue, linfa ou superfície serosa, leva a perda de funções dos órgãos atingidos e conseqüentemente à morte do organismo. Dentre essas neoplasias malignas há o câncer (SANTOS et al., 2008).

O termo *neoplasia* significa literalmente “crescimento novo. O termo *tumor* foi originalmente aplicado ao intumescimento causado pela inflamação. As neoplasias também podem induzir intumescimentos; entretanto, com o decorrer do tempo, o uso não-neoplásico do termo *tumor* foi abandonado, de modo que, na atualidade, o termo é sinônimo de neoplasia. A *oncologia* (do grego *oncos* = tumor) refere-se ao estudo dos tumores ou neoplasias. A palavra câncer é o termo comum utilizado para referir-se a todos os tumores malignos. Embora as origens antigas destes termos sejam umas tanto incertas, ele provavelmente, deriva do latim caranguejo, *câncer*,

presumivelmente pelo fato de um câncer “aderir a qualquer parte e agarrar-se de modo obstinado, como um caranguejo” (COTRAN; KUMAR; COLLINS; 2000).

Podemos definir o câncer como um termo genérico para um grupo de mais de 100 doenças que podem afetar somente uma parte do corpo ou ocorrer em metástase, sendo esta a maior causa de morte. Em 2008, o câncer correspondeu a 466.730 novos casos de câncer, sendo 231.860 casos em homens e 234.870 em mulheres. Tendo diferenças por região do país e por sexo como mostra a figura 1 abaixo (SANTOS et al, 2008).

<b>Sexo masculino</b>			<b>Sexo feminino</b>		
<b>Prótata</b>	<b>49,530</b>	<b>28 %</b>	<b>Mama</b>	<b>49,400</b>	<b>28 %</b>
<b>Pulmão</b>	<b>17,810</b>	<b>10 %</b>	<b>Útero</b>	<b>18,680</b>	<b>11 %</b>
<b>Estômago</b>	<b>14,080</b>	<b>8 %</b>	<b>Colorretal</b>	<b>14,500</b>	<b>8 %</b>
<b>Colorretal</b>	<b>12,490</b>	<b>7 %</b>	<b>Pulmão</b>	<b>9,460</b>	<b>5 %</b>
<b>Oral</b>	<b>10,380</b>	<b>6 %</b>	<b>Estômago</b>	<b>7,720</b>	<b>4 %</b>
<b>Esôfago</b>	<b>7,900</b>	<b>4 %</b>	<b>Leucemia</b>	<b>4,320</b>	<b>2 %</b>
<b>Leucemia</b>	<b>5,220</b>	<b>3 %</b>	<b>Oral</b>	<b>3,780</b>	<b>2 %</b>
<b>Melanoma de pele</b>	<b>2,950</b>	<b>2 %</b>	<b>Melanoma de pele</b>	<b>2,970</b>	<b>2 %</b>
<b>Outros</b>	<b>55,610</b>	<b>32 %</b>	<b>Esôfago</b>	<b>2,650</b>	<b>2 %</b>
			<b>Outros</b>	<b>62,270</b>	<b>35 %</b>

**Figura 1 - Novos casos estimados de câncer por sexo.**  
**Fonte: SANTOS et al, 2008.**

O prognóstico da doença e o manuseio terapêutico estão relacionados ao grau de penetração do tumor, presença de envolvimento de linfonodos regionais e metástases à distância. Essas características formam a base para o sistema de estadiamento desenvolvido para esta doença.

Atualmente se acredita que o câncer tenha origem em uma única célula, como resultado de um acúmulo de anormalidades (mutações) no ácido desoxirribonucléico (DNA) daquela célula. Quando ocorrem nos genes fundamentais, como por exemplo, aqueles envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e, essas mutações podem causar crescimento celular descontrolado e, finalmente, talvez, um tipo celular que adquiriu a capacidade de se metastatizar. Foi reconhecido um grande número de agentes etiológicos que causam lesão genética e transformação neoplásica (SPENCE; JOHNSTON, 2003).

É possível obter importantes esclarecimentos sobre a etiologia do câncer a partir de estudos epidemiológicos que relacionam as influências ambientais, raciais, possivelmente hereditárias e culturais com a ocorrência de neoplasias malignas. Além disso, certas doenças associadas a um risco aumentado de desenvolver câncer podendo fornecer dados esclarecedores sobre a patogenia da malignidade (COTRAN; KUMAR; COLLINS; 2000).

Nos doentes oncológicos manifestam-se síndromes álgicas frequentes e mais incapacitantes que em outras condições patológicas. Decorrem de fatores relacionados direta ou indiretamente com o tumor primário e suas metástases. E muitas vezes as síndromes álgicas estão relacionadas ou são exacerbadas pelo tratamento.

Dependendo da fase do câncer, dois ou até três esquemas terapêuticos podem ser combinados ao mesmo tempo ou de forma sequencial para tratar o câncer. Os antineoplásicos possuem atividade biológica antiproliferativa que envolve baixa seletividade e alta toxicidade que limita seu uso no tratamento de doenças neoplásicas. Dentre os antineoplásicos a oxaliplatina (OXL), objeto de estudo do presente trabalho, vem se destacando por ser a primeira linha de tratamento de diversos tipos de câncer dentre eles o colorretal, ovariano, pulmonar e mais recentemente na terapêutica do câncer de pâncreas.

## **1.2 Tratamentos para o câncer**

O tratamento do câncer consiste em inibir a proliferação excessiva de células neoplásicas, podendo incluir três tipos principais de tratamento como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Esses dois últimos métodos podem acarretar efeitos colaterais.

### 1.2.1 Cirurgia

A cirurgia é a forma mais antiga de tratamento do câncer. Aproximadamente 60% dos pacientes de câncer serão submetidos à cirurgia isoladamente ou em combinação com outras terapias. Há sete tipos de cirurgia de câncer classificadas pelo Instituto Nacional do Câncer - INC (2009):

- **Cirurgia preventiva:** é usada para impedir o câncer de acontecer, como por exemplo, em casos de cânceres de cólon que podem ser prevenidos removendo pólipos pré-cancerosos antes de se tornarem malignos.
- **Cirurgia diagnóstica:** também é conhecida como biópsia. Neste procedimento, o cirurgião remove alguns fragmentos ou o todo de um tumor para exame e determinar se o crescimento é canceroso.
- **Cirurgia de estadiamento:** é utilizada para determinar a extensão de um câncer que auxilia no planejamento da melhor forma de tratamento.
- **Cirurgia curativa:** envolve remoção de um tumor canceroso localizado que não têm metástases para outras partes do corpo. Pode ser seguido de radioterapia ou quimioterapia para se certificar que todas as células cancerosas foram destruídas.
- **Cirurgia suportiva:** é usada para dar suporte em outros tratamentos de câncer. Por exemplo, alguns dispositivos de quimioterapia requerem um portal (dispositivo) a ser inserido debaixo da pele.
- **Cirurgia restauradora:** devolve a aparência e função normal ou próximo ao normal após o tratamento de câncer. A cirurgia reconstrutiva mais comum é a reconstrução da mama após uma mastectomia.
- **Cirurgia paliativa:** realizada para alívio da dor, fornece via alimentar ou outras complicações que vêm com câncer avançado. Cirurgia paliativa pode melhorar a qualidade de vida, mas não é uma cura para o câncer.

## 1.2.2 Radioterapia

É um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada (INCA, 1993).

As radiações ionizantes são eletromagnéticas ou corpusculares e carregam energia. Ao interagirem com os tecidos, dão origem a elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. A morte celular pode ocorrer então por variados mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução (INCA, 1993).

A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, assim como a qualidade e a quantidade da radiação e o tempo total em que ela é administrada.

Normalmente, os efeitos das radiações são bem tolerados, desde que sejam respeitados os princípios de dose total de tratamento e a aplicação fracionada. Os efeitos colaterais podem ser classificados em imediatos e tardios, sendo os efeitos imediatos observados nos tecidos que apresentam maior capacidade proliferativa, como as gônadas, a epiderme, as mucosas dos trato digestivo, urinário e genital e a medula óssea. Os efeitos tardios (mais raros) ocorrem quando as doses de tolerância dos tecidos normais são ultrapassadas e manifestam-se por atrofia e fibroses. As alterações de caráter genético e o desenvolvimento de outros tumores malignos são raramente observados (INCA, 1993).

Todos os tecidos podem ser afetados, em graus variados, pelas radiações. Normalmente, os efeitos se relacionam com a dose total absorvida e com o fracionamento utilizado. A cirurgia e a quimioterapia podem contribuir para o agravamento destes efeitos (INCA, 1993).



### **1.2.3 Quimioterapia**

A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral (INCA, 1993).

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. A partir da publicação, em 1946, dos estudos clínicos feitos com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, verificou-se avanço crescente da quimioterapia antineoplásica. Atualmente, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos encontram-se disponíveis para uso na prática clínica (INCA, 1993).

Os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, têm facilitado consideravelmente a aplicação de outros tipos de tratamento de câncer e permitido maior número de curas (INCA, 1993).

## **1.3 Classificação química dos quimioterápicos**

### **1.3.1 Complexos de Platina**

O estudo de complexos metálicos para uso na quimioterapia teve grande impulso depois da descoberta das propriedades antitumorais do cis-diaminodichloroplatina II ( $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ), comumente chamado “cisplatina”, e que é um dos compostos mais utilizados no tratamento do câncer (CHU et al., 2004).

Esse complexo foi primeiramente descrito por Reiset em 1844 e, um ano após, Peyrone descreveu outro composto com a mesma fórmula molecular, sendo que apenas em 1893 Werner propôs os dois compostos isômeros: o complexo de

Reiset correspondia ao isômero trans 5, e o de Peyrone à forma *cis* (CHU et al., 2004).

Entretanto, as propriedades antitumorais de compostos contendo platina (Pt) só foram descobertas mais de um século após a descrição dos compostos de Reiset e Peyrone. No final da década de 60 do século XX, Barnet Rosenberg, um físico, então trabalhando na Universidade do Estado de Michigan, nos Estados Unidos, procurava estudar os efeitos do campo elétrico em uma cultura de bactérias *Escherichia coli*. Rosenberg observou que a divisão celular era inibida, e durante o processo, as células de *E. coli*, como não podiam se dividir, cresciam formando filamentos alongados. Iniciou-se então uma busca pelos possíveis agentes responsáveis pelo fenômeno, e as pesquisas mostraram que a Pt do eletrodo se dissolvia no meio de cultura, que continha sais de amônio, para formar espécies complexas do metal. Levou-se em consideração a hipótese de formação do sal  $(\text{NH}_4)_2 [\text{PtCl}_6]$  (CHU et al., 2004).

A partir desses resultados, uma série de complexos de Pt foi sintetizada e submetida a testes em camundongos portadores de sarcoma-180, um modelo de tumor usado para ensaios farmacológicos. Os compostos que se mostraram mais eficazes eram todos neutros e de configuração *cis* e, dentre eles, o que apresentou maior atividade foi o *cis*-3, cisplatina ( $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ), que provocou a regressão total do tumor em 36 dias, enquanto o seu isômero, trans-diaminodicloroplatina II (5, transplatina), se mostrou inativo (CHU et al., 2004).

Já no início da década de 70, a cisplatina começou a ser submetida a testes clínicos, inicialmente em pacientes terminais e posteriormente em tumores localizados, como câncer de testículo e ovário, tendo sido lançado no mercado americano em 1979. O carcinoma testicular, que era quase sempre letal, tornou-se curável em cerca de 80% dos casos quando submetido ao tratamento com esse composto. Atualmente a cisplatina é usada em vários outros tipos de neoplasias, como câncer de pulmão, cabeça, esôfago, estômago, linfomas, melanoma, osteossarcoma, de mama e cervix, sobretudo em associação com outras drogas, em vários esquemas terapêuticos (CHU et al., 2004).

A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina provou ser possível encontrar novos complexos metálicos com propriedades terapêuticas excelentes e constituiu um grande incentivo para o desenvolvimento e procura de novos complexos metálicos com atividade semelhante (CHU et al., 2004).

Este fármaco tem apresentado potencial terapêutico em grande variedade de neoplasias humanas. É um dos agentes cito-redutores mais eficazes no tratamento de vários tumores, sendo particularmente eficaz no tratamento dos tumores do testículo, ovário, cabeça, pescoço, melanomas malignos, carcinomas da bexiga e do pulmão (BEHLING, 2004; AL-SARRAF et al., 1997). Contudo, seu uso clínico está limitado devido ao surgimento de efeitos colaterais peculiares, tais como a ototoxicidade e a nefrotoxicidade.

A descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina constituiu um marco na história da Química Medicinal, a qual inicialmente dedicava-se principalmente ao estudo de compostos orgânicos e produtos naturais. Depois dessa descoberta pode-se dizer que se abriu uma nova perspectiva, com a inclusão de complexos metálicos como possíveis agentes terapêuticos. Desde então vários trabalhos se dedicaram a investigar o mecanismo de ação da cisplatina e compostos correlatos no organismo.

Apesar do inquestionável sucesso da cisplatina na quimioterapia do câncer, tornava-se urgente melhorar a sua eficiência clínica em termos da resistência e redução da toxicidade. Na etapa seguinte do desenvolvimento dos complexos de Pt, pretendia-se a identificação de um novo derivado que mantivesse a atividade antitumoral da cisplatina, mas reduzisse seus efeitos tóxicos (HARRAP, 1985). Foram sintetizados milhares de novos complexos com estrutura semelhante à cisplatina e cerca de mil foram sujeitos a teste pré-clínicos.

A carboplatina é um composto de Pt de segunda geração, tendo origem na cisplatina e também age interferindo na síntese de DNA (LANORE; DELPRAT, 2004). O espectro e atividade são semelhantes à cisplatina, com exceção da toxicidade renal e da êmese que aparecem de forma menos intensa. Os efeitos colaterais descritos com o uso da carboplatina são relacionados a alterações renais além de efeitos gastrointestinais como anorexia, vômitos e constipação, também podendo levar a alterações hepáticas. Entretanto, o principal efeito colateral da carboplatina é hematológico, que se manifesta principalmente por leucopenia, podendo, também, ocorrer anemia. A mielossupressão pode ser observada entre 10 e 14 dias e pode ser severa (CHUN; GARRET; MACEWVEN, 2001).

Um dos problemas principais associados à cisplatina e carboplatina além da toxicidade renal e hematológica é a resistência tumoral. Dessa forma o desenvolvimento de novos complexos de Pt, evolui no sentido de se alterar a estrutura base por modificação da natureza ou número dos ligandos fixos, com o

objetivo principal de se ultrapassar esse problema da resistência. Dessa investigação surgiu uma classe principal de complexos, designada por complexos de terceira geração, baseada no ligando 1,2-diaminociclohexano (DACH), por exemplo, a oxaliplatina (HOLLIS; AMURDSEN; STERN, 1989).

Os compostos Pt representam uma importante classe de compostos anticancer e são usados para tratar em larga escala tumores sólidos (Figura 2).

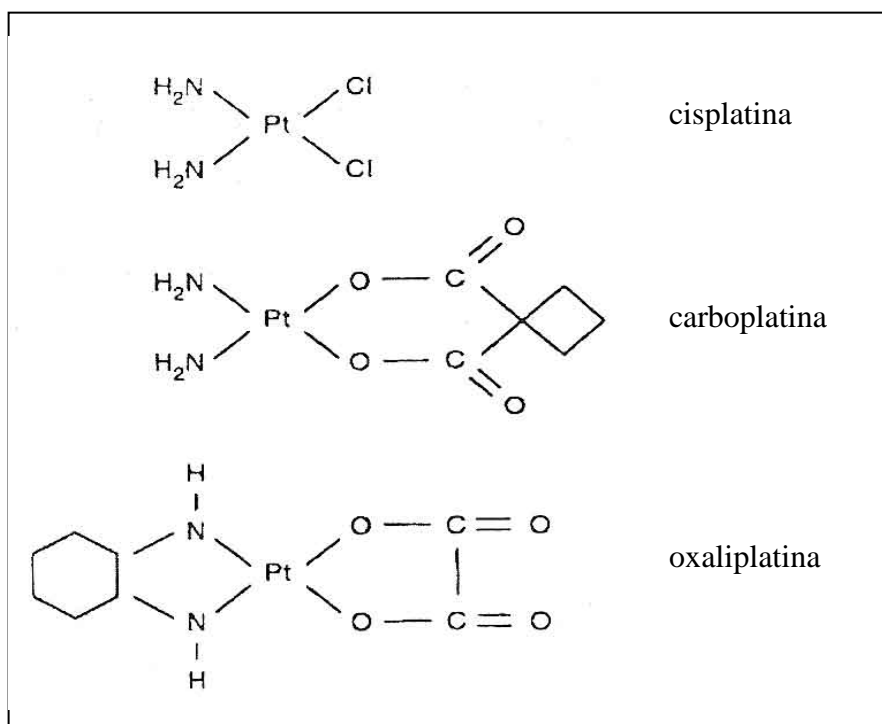


Figura 2 – Estrutura química de análogos platinos.  
Fonte: MARSHALL, 2004

## 1.7 Oxaliplatina (OXL)

A oxaliplatina (OXL), um trans-1,2-diaminociclohexano oxalatoplatino (L-OHP), foi desenvolvida na década de 70 como um dos vários compostos platinos 1,2-Diamino-Ciclo-Hexano (DACH) na tentativa de se obter análogos com índice terapêutico mais favorável, basicamente menos nefrotoxicidade (CVITKOVIC; BEKRADDA, 1999). Esses compostos 1,2-DACH provocaram um entusiasmo imediato por não apresentarem resistência cruzada com a cisplatina e carboplatina e

por terem um perfil pré-clínico distinto dos análogos mais antigos. Entretanto o interesse nesses agentes esfriou após a constatação dos severos efeitos tóxicos neurológicos nos estudos de fase I com a tetraplatina, um dos compostos 1,2 DACH mais promissores da época.

Os testes clínicos com OXL, mais de uma década depois, revelaram a sua poderosa atividade antitumoral e sua toxicidade relativamente favorável. Assim a OXL provou ser efetiva como primeira e segunda linha no tratamento dos tumores refratários ao 5- fluorouracil (5-FU). A OXL mostrou-se efetiva contra o câncer ovariano avançado pré-tratado e não tratado (MACHOVER et al., 1996).

Outro ponto positivo a favor da OXL é que ela não provoca os efeitos tóxicos renais e hematológicos e nem induz ototoxicidade, comumente observados com cisplatina. Os efeitos eméticos também são mais bem controlados. A neurotoxicidade, entretanto, apesar de ser na maioria das vezes reversível, parece ser o efeito colateral que mais chama a atenção (MACHOVER et al., 1996; CHOLLET et al., 1996).

Resultados pré-clínicos mostram que a OXL e outros compostos DACH-Pt são indicados com significativa atividade citotóxica em linhagens de células cancerosas humanas que tinham resistência à cisplatina e à carboplatina. Especificamente a OXL exibe uma potente atividade citotóxica em larga escala de células cancerosas como colorretal, ovariano e pulmonar (CHU, 2004). Os efeitos antitumorais da OXL aumentam o seu uso em combinação com outros agentes anticancer (CHU, 2004).

### **1.7.1 Mecanismo de ação antitumoral da oxaliplatina**

Como todos os outros compostos Pt a OXL precisa ser convertida em espécie reativa em reações de desacoplamento e tanto no sangue como no meio intracelular. Observa-se na figura 3 um esquema do mecanismo de ação. Os nucleófilos fracos como o bicarbonato do sangue ou dihidrogênio fosfato do meio intracelular desacoplam o grupamento oxalato resultando na formação de intermediários não estáveis que são rapidamente hidrolisados a espécies platinas diaqua 1,2-DACH dicloreto (CVITKOVIC, 1998). Esse composto é então convertido a

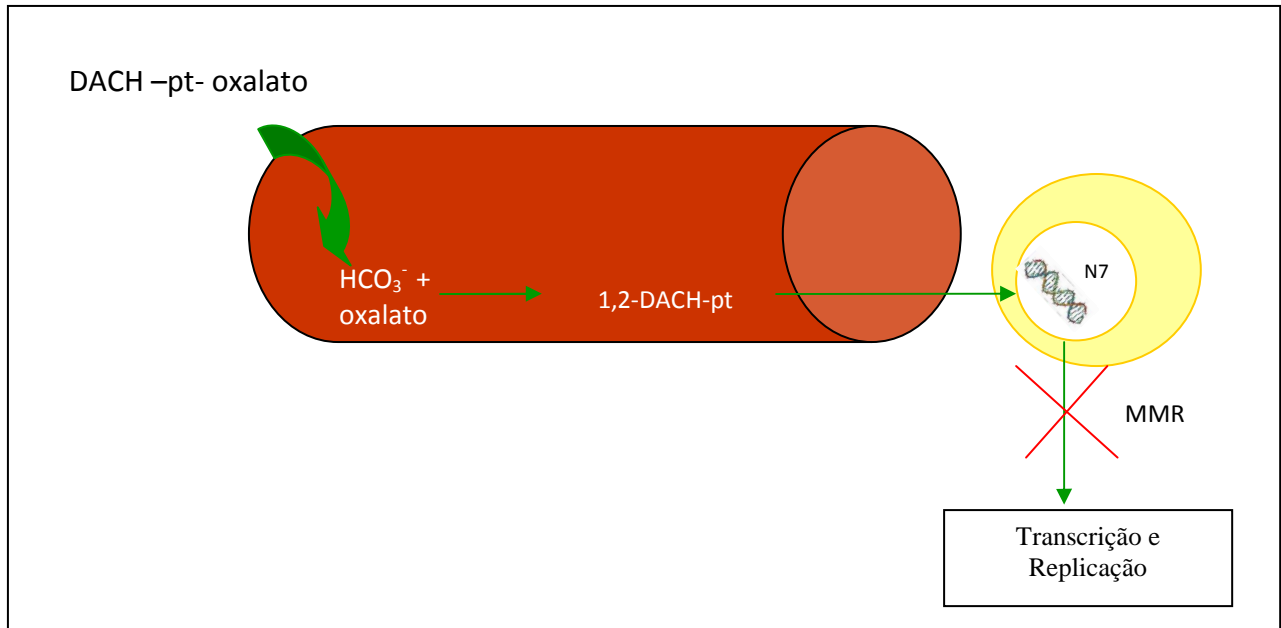
monocloroplatino de monoaquá-1,2-DACH e a dicloretoplatino de 1,2-DACH os quais reagem instantaneamente com o DNA celular. Como resultado forma-se aductos platinados guanina-guanina ou adenina-guanina intracadeia (CHU et al., 2004).

A ligação dos metabólitos da OXL ao DNA resulta em inibição da síntese e da função, bem como a inibição da transcrição. Apesar da lesão ao DNA pela OXL aparentar semelhança com a lesão provocada por cisplatina/carboplatina, os metabólitos 1,2-DACH-Pt produzidos pela OXL são significativamente mais citotóxicos do que os metabólitos formados por cisplatina/carboplatina. As evidências sugerem que o 1,2-DACH formado pela OXL liga-se de forma mais potente e também é capaz de escapar do reconhecimento pelo complexo de enzimas de reparo de má combinação (MMR do inglês mismatch repair) que é a correção de bases mal pareadas do DNA (CVITKOVIC; BEKRADDA, 1999).

A presença do 1,2-DACH retido no DNA previne o *bypass* replicativo, um dos mecanismos de resistência observados com o uso de cisplatina (CVITKOVIC; BEKRADDA, 1999).

O fato dos aductos de OXL escaparem do complexo MMR explica a sua excelente atividade contra tumores que exibem complexos MMR aberrantes, como é o caso dos carcinomas colorretais e também explica um efeito melhor do que a cisplatina em tumores sensíveis a essa droga, assim como tumores refratários à cisplatina possivelmente respondem bem a OXL (MACHOVER et al., 1996, CHOLLET et al., 1996).

Aproximadamente 75-85% da dose de OXL liga às proteínas celulares, preferencialmente nos átomos de enxofre presentes nos resíduos dos aminoácidos cisteína ou metionina. A determinação da atividade citotóxica de OXL, em relação a sua potencial ligação a proteínas-chaves nucleares ou citoplasmáticas, ainda está sendo elucidado (CHU, 2004).



**Figura 3 – Mecanismo de ação da oxaliplatina.**  
 Fonte: Pesquisador, 2009.

#### 1.4.2 Mecanismo de resistência da oxaliplatina

Mecanismos gerais de resistência de compostos Pt e OXL tem sido identificados, incluindo o acúmulo de droga secundariamente a alterações no transporte celular, aumento da inativação por proteínas contendo grupo sulfidril como a glutatona ou enzimas relacionadas com a glutatona e aumento da reparação de DNA com incremento da expressão de enzimas-chaves como ERCC1 (*excision repair cruz complementação grupo 1*), uma proteína implicada na reparação do DNA que tem maior expressão na célula do carcinoma escamoso (RAYMOND et al., 2002) É a principal enzima da cascata NER (*nucleotide excision repair*), mecanismo responsável pela reparação do DNA. Esta enzima de 33 kDa é codificada pelo gene ERCC1, de 15 kb, localizado no cromossoma 19q. Este gene foi altamente preservado durante a evolução e é expresso em todos os tecidos em níveis relativamente elevados (CARVALHO et al., 2009).

O sistema de reparo de bases mal pareadas humano MMR é formado por seis genes capazes de sintetizar proteínas com a função de reparo do DNA: hMSH2 (do inglês *human mut S homolog*); hMLH1 (do inglês *human mut L homolog*); hMSH3 (do inglês *human mut S homolog*); hPMS1 (do inglês *human post meiotic*

*segregation*); hPMS2 (do inglês *human post meiotic segregation*) e hMSH6 (do inglês *human mut S homolog*). As proteínas produzidas por esses genes possuem a capacidade de remover um segmento de DNA contendo uma alteração na sequência de bases e posteriormente corrigi-lo (NUNN, 2003).

Alterações na atividade de MMR com aumento da expressão de hMLH1, hMLH2 ou outras enzimas MMR, conferem resistência para cisplatina/carboplatina, mas não à OXL. Esses achados conferem particular relevância em pacientes com câncer colorretal hereditário não poliposo que tem defeitos em MMR, ou em pacientes com câncer colorretal esporádicos nos quais os defeitos de MMR são observados em torno de 10-20% e pode explicar a atividade da OXL em câncer colorretal, mas não a de cisplatina ou carboplatina (CHU, 2004).

### **1.4.3 Farmacocinética da oxaliplatina**

A OXL é extensamente distribuída por todas as células do corpo, com volume de distribuição mais elevado que a cisplatina. Depois de uma infusão de OXL há acúmulo de compostos Pt em três compartimentos: plasma, ultra filtrado e associado à hemácias. Aproximadamente 85% de todos os compostos Pt ligam-se nas proteínas plasmáticas e 40% nas hemácias dentro de 2-5 horas de administração. Contudo, esse acúmulo em hemácias tem pequena relevância clínica (CHU, 2004).

Com respeito ao metabolismo, a OXL faz uma extensa conversão não enzimática para ativar espécies citotóxicas, semelhante ao observado com cisplatina e carboplatina. Essa é uma reação aquosa que ocorre na presença de cloreto, e as espécies formadas são monoclóro-DACH, dicloro-DACH e monodiaquo-DACH Pt. Somente uma pequena fração da droga (<2%) é eliminada nas fezes, a OXL é realmente excretada pelos rins, com mais de 50% pela urina (CHU, 2004).



#### 1.4.4 Esquemas quimioterápicos

Existem diversos esquemas terapêuticos de administração únicas de OXL e em bolus como:

- Oxaliplatina com 5-fluourouracil e leucovorin (FOLFOX);
- Oxaliplatina 5-fluourouracil, leucovorin e bevacizumab (FOLFOX/BEV);
- Oxaliplatina com capecitabina (XELOX);
- FOLFOX 4 e irinotecano (IROX);

O esquema FOLFOX possui classificações diferentes como visto na tabela abaixo:

**Tabela 1 - Esquemas de combinação FOLFOX (em 2 semanas)**

Droga	FOLFOX 2	FOLFOX 3	FOLFOX 4	FOLFOX 6	FOLFOX 6 modificado	FOLFOX 7
Oxaliplatina (OXL)	100mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão no dia 1.	85mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão no dia 1.	85mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão no dia 1.	100mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão no dia 1.	85mg/m <sup>2</sup> IV no dia 1.	130mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão no dia 1.
Leucovorin (LV)	500mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão nos dias 1 e 2.	500mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão nos dias 1 e 2.	200mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão nos dias 1 e 2.	400mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão no dia 1.	400mg/m <sup>2</sup> IV no dia 1.	400mg/m <sup>2</sup> em 2h de infusão no dia 1.
Fluourouracil (FU)	1,5-2,0g/m <sup>2</sup> em 24h de infusão nos dias 1 e 2.	1,5-2,0g/m <sup>2</sup> em 24h de infusão nos dias 1 e 2.	400mg/m <sup>2</sup> em bolus e 600mg/m <sup>2</sup> Em 22h de infusão nos dias 1 e 2.	400mg/m <sup>2</sup> em bolus e 2,4-3,0g/m <sup>2</sup> em 46h de infusão nos dias 1 e 2.	400mg/m <sup>2</sup> em bolus no dia 1 e 2,4g/m <sup>2</sup> em 22h em IV contínuo em 46h, nos dias 1 e 2.	2,4g/m <sup>2</sup> em bolus em 46h de infusão nos dias 1 e 2.

Fonte: MARSHALL, 2004.

#### 1.4.5 Importância da oxaliplatina no tratamento do câncer

O antineoplásico OXL obteve uma autorização para comercialização na França no tratamento de segunda linha do câncer colorretal metastático em 1996 e no de primeira linha em 1998. Em julho de 1999, a OXL foi registrada no tratamento de primeira linha do câncer colorretal em estágio avançado, nos principais países europeus. Em seguida, OXL atendeu as diversas etapas do processo de reconhecimento mútuo europeu em dezembro de 2003, o que permitiu um registro para tratamento do câncer colorretal metastático (tanto de primeira quanto de segunda linha), em associação com 5-FU e ácido folínico (MARSHALL, 2004)

Nos Estados Unidos da América (EUA) a OXL, em associação com o protocolo 5-FU/LV em infusão, foi aprovada em 2004 para o tratamento de primeira linha do carcinoma do cólon ou do reto em estágio avançado (primeiro tratamento de pacientes que apresentam câncer colorretal metastático). Esta mesma associação, à base de OXL, havia inicialmente recebido aprovação da agência americana, a *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento de segunda linha dessa população de pacientes (tratamento de pacientes que apresentam câncer colorretal metastático anteriormente tratados) (MARSHALL, 2004).

Nesse sentido nota-se que o principal uso de OXL está no tratamento do câncer colorretal de atual importância epidemiológica mundial, visto que, a cada ano, aproximadamente um milhão de novos casos é diagnosticado em todo o mundo. Aproximadamente 194.000 novos casos são detectados na Europa e 150.000 nos EUA. De acordo com a *American Cancer Society*, o câncer colorretal é a segunda maior causa de morte relacionada ao câncer nos EUA, representando 10% a 15% de todas as mortes causadas por câncer. Durante a vida, aproximadamente 1 em 18 indivíduos desenvolve câncer colorretal, e mais de 56.000 indivíduos morrem devido a este câncer nos EUA a cada ano. Na Europa, 94.000 indivíduos morrem devido ao câncer colorretal a cada ano (MARSHALL, 2004).

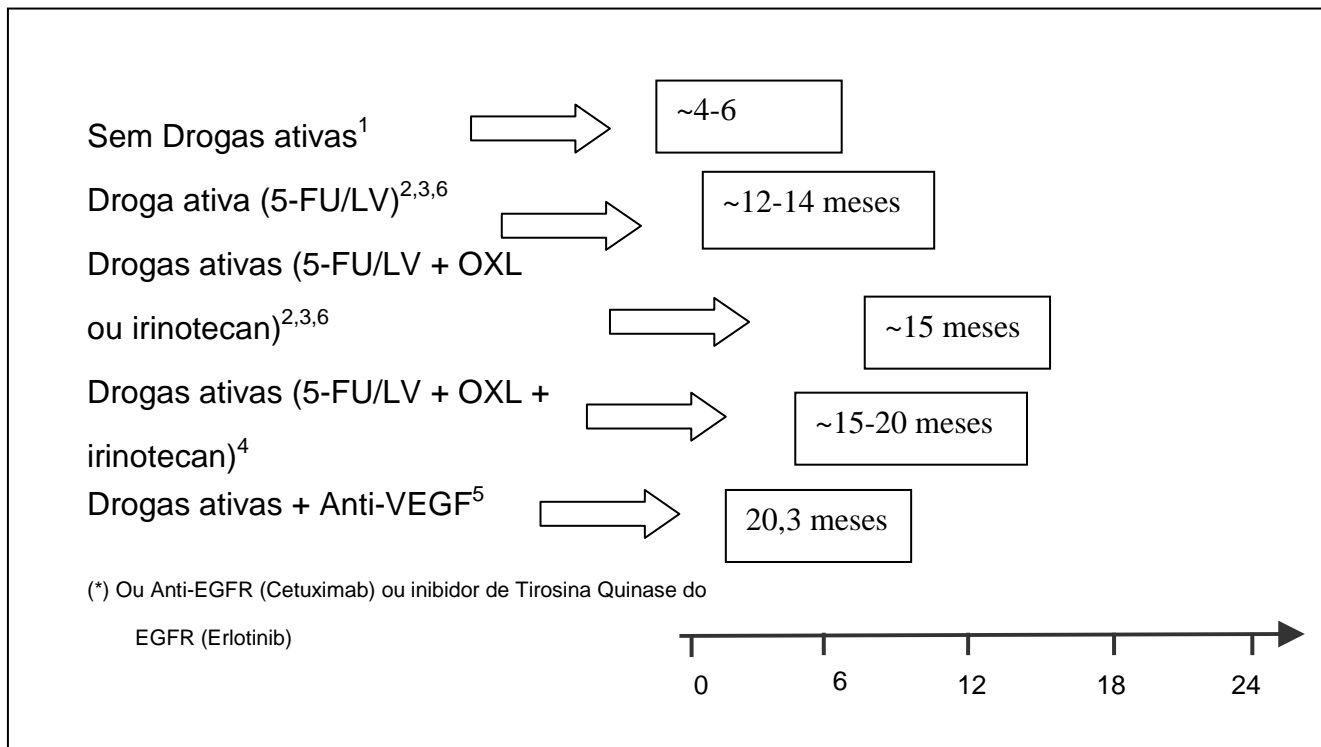
O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado para o Brasil no ano de 2010 será de 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais frequente nas

regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (19/100.000). Na Região Centro-Oeste (11/100.000) ocupa a quarta posição. Nas regiões Nordeste (5/100.000) e Norte (4/100.000) ocupam a quinta posição. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sul (22/100.000) e Sudeste (21/100.000); o terceiro nas regiões Centro-Oeste (11/100.000) e Nordeste (6/100.000), e o quinto na região Norte (4/100.000) (BRASIL, 2009).

O câncer colorretal é o câncer que se inicia nas células de revestimento do cólon ou reto. Quando estas células se disseminam além do cólon para locais distantes no organismo, o câncer é denominado metastático. As células cancerosas podem se disseminar ou metastatizar através do sistema hemático ou linfático, ou crescer diretamente nos tecidos adjacentes ao câncer original (MARSHALL, 2004).

Um diagnóstico de câncer colorretal está associado a um estágio que reflete a extensão do câncer e se há metástase. Os pacientes com câncer colorretal com metástase para órgãos ou tecidos distantes são denominados como apresentando câncer colorretal avançado ou metastático, também conhecido como câncer colorretal estágio IV (MARSHALL, 2004).

As mortes por câncer se caracterizam por uma demanda física e mental à que estão expostos tanto os pacientes como seus familiares. Dentre os cânceres o de colorretal metastático é um dos mais agressivos. Com a introdução de novas drogas quimioterápicas para o seu tratamento a expectativa de vida aumentou de aproximadamente 6 meses para 20,3 meses como mostra a figura 4 abaixo:



**Figura 4 – Expectativa de vida do câncer colorretal metastático**

Fonte: <sup>1</sup>CUTSEM; <sup>2</sup>VERSLYPE, 2002; <sup>3</sup>DOUILLARD et al., 2000; <sup>4</sup>DE GRAMONT et al., 2000; <sup>5</sup>GOLDBERG et al., 2003; <sup>6</sup>HURWITZ et al., 2003; <sup>6</sup>SALTZ et al., 2000.

A sobrevida para esse tipo de neoplasia é considerada boa, se a doença for diagnosticada em estágio inicial. A sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. Esse relativo bom prognóstico faz com que o câncer de cólon e reto seja o segundo tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo, com aproximadamente 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas com essa neoplasia, ficando atrás somente do câncer de mama em mulheres (BRASIL, 2009).

#### 1.4.6 Efeitos colaterais do uso de oxaliplatina

Dos compostos Pt a OXL é aquela que apresenta menos efeitos colaterais graves. Como foi dito, possui pouco efeito hemato, nefro e ototóxico. O efeito que mais chama a atenção no uso de OXL é a sua toxicidade neurológica que

dependendo do grau de intensidade causa muito desconforto e promove limitação das dosagens e continuação do tratamento.

A neurotoxicidade manifestada pela OXL apresenta dois distintos sintomas uma síndrome aguda que pode durar pouco após a infusão e uma dose limite de toxicidade (DLT), crônica.

#### **1.4.6.1 Neurotoxicidade aguda**

As toxicidades agudas mais comuns são: laringoespasma, náuseas, vômitos, diarreia e reações de hipersensibilidade (MARSHALL, 2004).

Essa toxicidade aguda é rápida e pode ocorrer durante a infusão ou horas depois e geralmente é induzida pela exposição ao frio. Pode ser manifestada toxicidade motora e sensorial, os componentes sensoriais consistem em: parestesia e/ou disestesia em extremidades e/ou na região oral (MARSHALL, 2004).

#### **1.4.6.2 Neurotoxicidade crônica**

Os sintomas crônicos mais comuns, não induzidos pelo frio, são as disestesias e parestesias de extremidades que persistem entre os ciclos e aumentam com o acúmulo das doses. Podem ocorrer ataxia, déficit em coordenação sensório-motora fina. Esses sintomas são reversíveis na maioria dos pacientes do grau 3 de toxicidade para o grau 1 em 6-12 meses após o término da terapia (MARSHALL, 2004). As características clínicas mais comuns da neuropatia induzida por OXL pode ser vista na tabela 2 abaixo.

**Tabela 2 - Características clínicas da neuropatia induzida pela oxaliplatina.**

	OXALIPLATINA	
	Agudo	Crônico
Incidência	85-95%	Grau 3/4 em 16%
Dose limite de toxicidade	Não	Sim
Sintomas	Parestesias, disestesias	Perestesias, disestesias, ataxia sensorial
Localização	Extremidades, perioral	Extremidades
Ativação	Exposição ao frio	Nada sugerido
Sintomas motores	Espasmos musculares raros	Nenhum
Início	agudo	Demorado
Recuperação	Rápida, completa	Devagar, mas completa
Dependência de modulação	Sim	Provavelmente não
Outros	Disestesias faringolaringeal	nenhuma

**Fonte: GROTHEY, 2003.**

A nível crônico verifica-se dor e diminuição da sensibilidade tátil (TA; LOW; WINDEBANK, 2009), sendo uma das mais significantes toxicidades da OXL a neuropatia periférica (SAIF; REARDON, 2005).

As neuropatias periféricas podem ser classificadas de acordo com seis parâmetros principais: a velocidade de instalação: aguda (menos de uma semana), subaguda (menos de um mês) ou crônica (mais de um mês); quanto ao tamanho da fibra nervosa: fina, grossa ou mista; o tipo de fibra nervosa: sensitiva, motora, autonômica ou mista; a patologia: desmielinização, degeneração axonal ou mista; distribuição: proximal, distal ou difusa e padrão: mononeuropatia ou polineuropatia (MARCHIORI; HIRATA, 2003).

A OXL tem causado neuropatia periférica que pode ser dividida em duas categorias. A primeira, a neuropatia sensorial, frequentemente exacerbada pelo frio, que ocorre geralmente nas primeiras horas e dias após a infusão de OXL e geralmente é resolvida em poucas horas; a segunda, a neuropatia periférica cumulativa, é mais duradoura, pode ser classificada em até 3 graus e tem reversão mais lenta (HWANG, 2004).

A incidência de neuropatia periférica induzida por OXL aguda apareceu ser estimativamente alta (até 100%) em dois estudos aplicados clínico e neurológico e

exame de eletrofisiologia em 35 pacientes tratados com OXL e capecitabina. A temperatura fria representou o principal fator de risco de neuropatia periférica induzida por OXL aguda (GAMELIN et al., 2002).

A evolução da neurotoxicidade da OXL pode ser classificada de acordo com o Critério de Toxicidade Comum do Instituto Nacional de Câncer (CTC NCI) como mostra a tabela abaixo:

**Tabela 3 - Evolução da neurotoxicidade da oxaliplatina**

	<b>Grau 1</b>	<b>Grau 2</b>	<b>Grau 3</b>
<b>INC</b>	Assintomático: perda de reflexos tendíneos ou parestesias, mas não interferindo na função.	Alteração sensorial ou parestesia interferindo na função, mas não com atividades de vida diária.	Alteração sensorial ou parestesia interferindo nas atividades de vida diária.
<b>OSNS</b>	Disestesias ou parestesias que regridem completamente antes do próximo ciclo de terapia.	Disestesias ou parestesias persistindo entre os ciclos de terapia.	Disestesias ou parestesia causando dano funcional

**Legenda: INC – Instituto Nacional do Câncer. OSNS – Escala de Neurotoxicidade específica de oxaliplatina**  
**Fonte: PARK et al., 2009.**

Como tratamento da neurotoxicidade induzida pela OXL há dois tipos de tratamento como mostra a tabela 4 abaixo:

**Tabela 4 - Estratégias para profilaxia e tratamento da neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina**

---

1 – Estratégia Stop-and-go (ex. OPTIMOX)

*Stop*

Depois da dose acumulada da oxaliplatina ser alcançada

Quando a neurotoxicidade sensorial de um grau ser desenvolvido

*GO*

Quando a neurotoxicidade sensorial tiver regredido

Quando a terapia com oxaliplatina for indicada para parar um tumor em progressão

2 – Agentes neuromoduladores

Infusão de cálcio e magnésio

Glutaciona

Carbamazepina

Gabapentina

Amifostina

Ácido  $\alpha$ -lipólico

---

**Fonte: GROTHEY, 2003**

#### **1.4.6.3 Neurotoxicidade da oxaliplatina aspectos celulares e moleculares**

A neuropatia periférica crônica induzida por OXL ainda é pouco estudada, no que diz respeito aos aspectos moleculares e celulares, entretanto, alguns autores sugerem que o fenômeno possa ser resultado do metabolismo celular diminuído e transporte axoplasmático resultando da acumulação de compostos de Pt na Raiz Dorsal do Gânglio (DRG). O exame histológico da neuropatia periférica induzida por OXL em modelos animais revela perda axonal com atrofia secundária seletiva das células DRG, assim sugerindo que a neuropatia periférica induzida por OXL deve ser mais bem descrita como uma neuropatia periférica. Foi sugerido ainda que, além de mudanças morfológicas e mudanças funcionais nas células de DRG, a ativação prolongada de canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) voltagem-dependentes poderia induzir estresse celular, assim afetando as células sensoriais nervosas (ARGYRIOU et al., 2008).

Mais recentemente foi demonstrado que nos primeiros estágios do desenvolvimento da neuropatia aguda induzida por OXL, fibras nociceptivas periféricas são lesionadas por estresse oxidativo e que substâncias antioxidantes previnem esse efeito. Esses mesmos autores sugerem que o fenômeno pode ser um



dos eventos iniciais que podem levar ao desenvolvimento dos sintomas sensitivos relacionados à neurotoxicidade da OXL (JOSEPH et al., 2008).

## **1.8 Dor neuropática**

A dor é um sinal de alerta que ajuda a proteger o corpo de danos nos tecidos (CAILLET, 1999; READY, 1992). A dor apresenta dois componentes importantes: o componente sensorial e o componente emocional/afetivo. O componente sensorial (nociceptivo), que corresponde ao mecanismo neurofisiológico, permite por meio da ativação dos receptores, a transmissão e interpretação do estímulo nociceptivo, que em geral, é forte o suficiente para produzir lesão tecidual. Componente emocional corresponde à percepção do estímulo doloroso pelo indivíduo que é seguida pela tomada de consciência e pela reação à dor (ansiedade, medo, pânico, sofrimento), é uma resposta afetiva à percepção do estímulo doloroso (RAMADABRAN; BANSINATH, 1996). Ao se tornar crônica pode constituir razão para a incapacidade funcional e que se manifesta mesmo na ausência de agressões teciduais vigentes, tal como ocorre em casos de neuropatia periférica ou central (TEIXEIRA; FIGURERÓ, 2001).

A definição inicial de dor neuropática proposta pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) a considerava como “dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção ou perturbação transitória no sistema nervoso periférico (SNP) ou sistema nervoso central (SNC)” (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Posteriormente a essa definição, por possuir ambiguidades, foi sugerida a definição de dor neuropática como “devida à lesão primária do SNP ou SNC” (HANSSON, 2002). Essa definição é mais específica e baseia-se nos diferentes mecanismos neurofisiopatológicos.

As características da dor neuropática são a dor e sintomas sensitivos que persistam além do período de cura, presença de fenômenos sensitivos negativos e positivos e presença também de fenômenos motores positivos e negativos e de fenômenos autonômicos (BACKONJA, 2003).

Em recente estudo realizado em 15 países europeus e em Israel, estimou-se uma prevalência de dor crônica em 19% (BREIVIK et al., 2006). Entretanto, a

prevalência específica de dor neuropática ainda não está estabelecida, com estimativas que vão de 1,5% a 20% (BENNETT, 1998), ou 5% na população geral (DAOUSI et al., 2004) ou 1,5% (TAYLOR, 1998). Mais recentemente, entretanto, a prevalência de dor neuropática foi estimada em 7 a 8% (BENNETT; BOUHASSIRA, 2007).

Outros aspectos de impacto sobre as condições de vida levam em consideração a presença de depressão ou ansiedade, transtorno do sono, questões relacionadas ao trabalho, expectativas do tratamento, necessidades de reabilitação e disponibilidade de apoio social da família e amigos (DWORKIN et al., 2003) e também as co-morbidades psiquiátricas (HARDEN; COHEN, 2003).

A dor nociceptiva é gerada por estímulos que acionam unidades nociceptivas periféricas e centrais onde é necessária a integridade das vias sensitivas, enquanto a dor por desaferentação ou dor neuropática refere-se à dor ocasionada por lesão neural periférica ou central. Podem ser causadas por afecções traumáticas físicas ou químicas, doenças inflamatórias ou infecciosas degenerativas, oncopáticas, vasculares, tóxicas (MILLAN, 1999). Nesse sentido o dano parcial ou mesmo a destruição de nervos periféricos deve estar associado a uma variedade de síndromes incluindo: hiperalgesia e alodínia, sensações parestésicas ou disestésicas e dor espontânea (ver tabela 5).

Os descritores verbais de dor neuropática são elementos de grande valia para o diagnóstico. Pacientes com dor neuropática descrevem-na como sensação de choque elétrico (53%), queimação (54%), formigamento (48%), frio, picada e prurido. Uma terminologia apropriada como mostra a tabela 5 (HANSSON, 2002).

**Tabela 5 – seleção de termos e definições de dor (IASP)**

<b>Termo de dor</b>	<b>Definição</b>
Alodínia	Dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor.
Causalgia	Síndrome de dor queimante sustentada, alodínia e hiperpatia após lesão neural traumática.
Dor central	Dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso central.
Disestesia	Sensação anormal desagradável, espontânea ou evocada.
Hiperalgesia	Resposta aumentada a um estímulo normalmente doloroso.
Hiperestesia	Sensibilidade aumentada a um estímulo excluindo as sensibilidades especiais.
Hiperpatia	Síndrome dolorosa caracterizada por reação anormalmente dolorosa a um estímulo, especialmente estímulo repetitivo, e por limiar elevado.
Neuralgia	Dor no território de inervação de nervos.
Parestesia	Sensação anormal, espontânea ou evocada.

**Fonte: ALVES NETO et al., 2009**

Em seguimento à investigação verbal, torna-se importante a avaliação multidimensional por escalas. A avaliação da dor neuropática mediante escalas é ainda uma exaustiva tarefa não-concluída. O alvo das escalas é definir sintomas e intensidade da dor e diferenciar dor neuropática de dor não-neuropática (ALVES NETO et al., 2009).

O exame neurológico deverá concentrar-se principalmente no exame da sensibilidade dolorosa, tátil, pressão, frio e calor, posição segmentar, vibração e tato discriminativo. A sensibilidade dolorosa deve ser pesquisada com alfinete ou objeto pontiagudo, a sensibilidade térmica com estímulo térmico (tubos ou bastões com água) a 20º e 45ºC, a sensibilidade tátil com mecha de algodão, escova ou toque, a

sensibilidade vibratória com o uso de diapasão nos maléolos e articulações das falanges e a posição segmentar com o movimento articular do polegar e hálux (HANSSON, 2002).

As outras funções que deverão ser pesquisadas são força, tônus muscular, reflexos osteotendinosos, coordenação, marcha e também as funções corticais com uso do mini exame do estado mental. Por meio da análise da motricidade e reflexos, juntamente com a da sensibilidade, poderão se configurar sinais e sintomas negativos e positivos que serão coadjuvantes ao diagnóstico de dor neuropática e sua origem periférica e central (ALVES NETO et al., 2009).

Também poderão ser úteis exames complementares para confirmação do diagnóstico etiológico, dentre os quais há o estudo da velocidade de condução e a eletroneuromiografia (ENM), a ressonância magnética (RNM), o teste sensitivo quantitativo e o estudo de potenciais evocados (ALVES NETO et al., 2009).

O uso de testes farmacológicos como lidocaína tópica, fentolamina endovenosa, opióide e cetamina, que avaliam o diagnóstico e a resposta terapêutica estão sendo utilizados (DELLEMIJIN; VAN DUIJN; VANNESTE, 1998; JENSEN; BARON, 2003).

As condições etiológicas associadas à dor neuropática, dizem respeito a entidades clínicas decorrentes de fenômenos patológicos que comprometem o SNP e SNC e são classificados em de etiologias periféricas como dor pós-amputação, neuropatias periféricas dolorosas, neuralgia trigeminal e glossofaríngea, síndrome complexa de dor regional, radiculopatias e aracnoidite e de etiologias centrais como dor central encefálica (doença vascular cerebral, esclerose múltipla, abscesso, tumores, doenças inflamatórias, epilepsia e doença de Parkinson) e dor central medular (traumática, siringomielia e sífilis) (ALVES NETO et al., 2009).

Os mecanismos mais importantes envolvidos na gênese da dor neuropática é a atividade neuronal ectópica nos neurônios lesados e nos gânglios das raízes sensitivas, as correntes efáticas, a sensibilização das unidades neuronais centrais, o desenvolvimento de sinapses aberrantes e as reações físicas, psíquicas e neuroendócrinas associadas à dor e às incapacidades (TEIXEIRA; FIGUEIRÒ, 2001).

Esses mecanismos podem ser periféricos como sensibilização periférica, descargas ectópicas (neuroma, brotamento colateral e mudança de fenótipo de neurônios do DRG), acoplamento simpático-sensitivo, excitação cruzada “efática” e

“não-efática” e alterações fenotípicas e podem ser mecanismos centrais como sensibilização central, alterações da neuroplasticidade e redução ou perda de mecanismos inibitórios (ALVES NETO et al., 2009).

Quanto aos mecanismos periféricos a sensibilização periférica está vinculada a uma resposta aumentada dos terminais nociceptivos, decorrente da ação dos mediadores inflamatórios, o que dá origem a alodínia e hiperalgesia. Isso é consequência, a nível dos nociceptores, da diminuição do limiar, indução de descargas ectópicas e aumento na quantidade de canais de Na<sup>+</sup> (DEVOR, 2006).

As descargas ectópicas são constituídas de impulsos elétricos anormais espontâneos evocados e repetitivos a partir de locais incomuns e diferentes das terminações nervosas. As fontes incomuns das descargas ectópicas são constituídas de neuromas, axônios desmielinizados por traumas, processos auto-imunes, aferentes adjacentes intactos e DRG (DEVOR, 2006). Essa atividade ectópica é originada em fibras mielinizadas A e não mielinizadas C. Focos de desmielinização em fibras danificadas por traumatismos são também fontes de atividades ectópicas por brotamento de fibras (BAKER; BOSTOCK, 1992). Outras fontes de descargas ectópicas são aferentes residuais intactos expostos aos produtos de regeneração e mediadores inflamatórios (WU et al., 2001) e corpos neuronais do DRG (DEVOR, 2006).

As expressões comportamentais de atividade ectópica em animais são autonomia e comportamentos autodirigidos como lambe-se, vibrar as patas posteriores e morder-se. Clinicamente, em humanos, são à base do sinal de Tinel (ALVES NETO et al., 2009).

A excitação cruzada efática é o processo fisiopatológico pelo qual, a partir de fibra nervosa danificada há o desenvolvimento de curto-circuito elétrico por correntes iônicas com fibras nervosas adjacentes intactas (SELTZER; DEVOR, 1979). Outro fenômeno relacionado é a excitação cruzada “não-efática” por mediadores químicos difusíveis (AMIR; DEVOR, 1996), o que pode ser à base do *tic douloureux* na neuralgia do trigêmio (ALVES NETO et al., 2009).

Alterações fenotípicas por expressão gênica modificada de neurônios do DRG e de neurônios do Corno Dorsal da Medula Espinhal (CDME) constituem importantes mecanismos de dor neuropática (HÖKFELT et al. 2006). Os genes modificados após axotomia envolvem os relacionados a neuropeptídeos, receptores, canais iônicos,

enzimas, transmissão sináptica, proteínas de crescimento, citoesqueleto e mobilidade celular e metabolismo (HÖKFELT et al. 2006).

Quanto aos mecanismos centrais medulares de dor neuropática são consequentes as lesões periféricas ou centrais e se expressam pelo desenvolvimento de sensibilização central, alterações neuroplásticas e redução ou perda de controle inibitório (ALVES NETO et al., 2009). Nesse sentido a sensibilidade central pode ser resultado de ativação do receptor do ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), aumento do conteúdo do glutamato, aspartato e cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular, além de ativação também de receptores AMPA e receptores metabotrópicos de glutamato (KAWAMATA; OMOTE, 1996).

Outro fenômeno importante na gênese da dor neuropática é a redução ou perda de mecanismos inibitórios tanto locais como descendentes, reduzindo assim a inibição pré e pós-sináptica, expressa também por redução gabaérgica (GABA) (LAIRD; BENNETT, 1992).

### **1.8.1 Tratamento da dor neuropática**

A dor neuropática, por sua complexidade, é um desafio constante para os profissionais da dor. O tratamento baseado nas etiologias não é, entretanto, eficaz em vista da maior importância representada pelos mecanismos subjacentes à expressão dolorosa. Contudo, o tratamento da etiologia obviamente deve ser realizado buscando minimizar os mecanismos e sintomas, os quais serão o centro-alvo do tratamento (ALVES NETO et al., 2009).

A dor neuropática pode ser tratada com abordagens psicológicas, físicas, cirúrgicas e farmacológicas como: anticonvulsivantes, antidepressivos, opióides, antiarrítmicos, gabaérgicos, antagonistas de NMDA, bloqueios anestésicos, L-dopamina (DOPA), anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e neurolépticos (ALVES NETO et al., 2009). O tratamento farmacológico tem a grande vantagem de visar aos mecanismos e de poder ser avaliado por ensaios clínicos bem controlados e desenhados, o que tem sido feito em menor escala em relação aos métodos físicos, psicológicos e aos métodos cirúrgicos e invasivos, nos quais as limitações éticas são maiores (ROWBOTHAM, 2005).

Medicamentos de primeira linha como gabapentina (GABAP), lidocaína, opióides, tramadol e antidepressivos tricíclicos são muito utilizados, assim como os de segunda linha lamotrigina, carbamazepina (CBZ) e inibidores seletivos da recaptação da serotonina (DWORKIN et al., 2003).

Os anticonvulsivantes têm seu papel como analgésicos por serem drogas que exercem seu efeito sobre os canais iônicos envolvidos tanto na epilepsia como na dor neuropática. Os canais alvo para esse efeito são os de  $\text{Na}^+$  e de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (ALVES NETO et al., 2009). Sendo assim drogas bloqueadoras dos canais de  $\text{Na}^+$  que englobam anti-convulsivantes (CBZ, fenitoína, e lamotrigina), anti-arrítmicos (mexiletina, flecainida e tocainida) e anestésicos locais de gênero lidocaína são bastante utilizadas. Da mesma forma dois dos principais moduladores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  como a GABAP e a pregabalina são utilizadas também. Ambas se ligam a uma subunidade  $\alpha 2\delta$  do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (TAYLOR et al., 1998).

## 1.9 Modelos animais de dor neuropática

Nos estudos experimentais de dor nós, inadequadamente, humanizamos os animais quando referimos que eles sentem dor já que não são passíveis de serem aferidas durante os experimentos, pois os testes nociceptivos se baseiam em respostas comportamentais ou reflexos inatos, que não sabemos se reflete um estado doloroso do animal. Essa subjetividade que a dor se expressa é que torna vulneráveis os procedimentos destinados a avaliação dos resultados (TEIXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001).

Inicialmente existe base fisiopatológica para que se faça uma diferenciação entre hiperalgesia e alodínia, em se tratando de dor experimental. Deve-se lembrar que a sensibilização dos nociceptores é uma característica comum dos processos inflamatórios. Alodínia e hiperalgesia são termos usados para descrever essa sensibilização (FERREIRA, 2003).

Como dito anteriormente a alodínia é um termo destinado à sensação dolorosa a um estímulo que não causava dor e passou a produzi-la em presença de sensibilização de nociceptores, cuja qualidade e intensidade não poderia ser evocada por estímulos idênticos. Visto que *allos* significa em grego outro, um

estímulo térmico seria percebido como doloroso e um estímulo de pequeníssima intensidade produziria dor excruciante ou de longa duração. A presença de alodínia indicaria lesão neuropática, portanto, um sintoma importante para definir um diagnóstico de comprometimento do tecido nervoso (FERREIRA, 2003).

A hiperalgesia é conceituada como uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso (MERSKEY; BOGDUK, 1986). Nos testes dever-se-ia utilizar o termo hipernocicepção na quantificação do aumento da sensibilidade do neurônio nociceptivo primário, abolindo os termos hiperalgesia e alodínia nesses casos, pois são termos usados para referir sintomas humanos, com os quais o teste experimental com animais pode não ter nenhuma relação (FERREIRA, 2003).

A dor neuropática se refere à dor de origem patológica do sistema nervoso. A diabetes, infecção por herpes zoster, compressão nervosa, trauma neural e doenças auto-imunes são exemplos de doenças que podem causar dor neuropática. Infelizmente nenhum tratamento satisfatório está ainda disponível para esse tipo de dor. Esta consideração levou a um grande interesse em descobrir os mecanismos subjacentes, sendo acompanhado por um número crescente de modelos animais. Anteriormente, a maioria dos modelos de dor neuropática inicialmente desenvolvida em ratos foi modificada para camundongos geneticamente modificados (COLLEONI; SACERDOTE, 2009).

Obviamente os modelos animais mais úteis de dor seriam aqueles que a etiologia da dor seria endógena e não induzido pelos experimentos, junto com os modelos clássicos baseados em ligação periférica do nervo. Nos últimos anos outras técnicas estão sendo desenvolvidas que imitam as síndromes de dor observada na clínica frequentemente por tentar induzir a doença associada à dor neuropática. Embora algumas variáveis devam ser levadas em conta quando se usa modelos animais para imitar dor neuropática da clínica, um número enorme de modelos que existem reproduzem e bem caracterizam metas importantes na compreensão de mecanismos e descobrem o alvo terapêutico para cada doença (COLLEONI; SACERDOTE, 2009).

A dor neuropática pode ser dividida em periférica ou central baseada na localização anatômica da lesão ou da doença: no SNP (por exemplo, nervos periféricos, DRG e raízes dorsais) e SNC (por exemplo, espinha dorsal e tálamo) (TREEDE et al., 2008).



Essas lesões surgem da neuropatia diabética, infecções virais (vírus de Herpes e vírus da imunodeficiência humana - HIV), cirurgias importantes ou trauma (amputação, toracotomia, encarceramento ou compressão), lesão de espinha dorsal, e golpe. Os exemplos de dor neuropática incluem síndrome do túnel do carpo, neuralgia trigeminal, neuralgia pós-herpética, radiculopatia, dor fantasma de membro, síndromes de dor regionais complexas e as várias neuropatias periféricas, tal como os derivados de quimioterapia (ZIMMERMANN, 2001).

A procura por novas drogas para aliviar a dor neuropática é prioritária hoje em dia e a busca por elucidar os mecanismos moleculares dessa dor é um requisito importante para o desenvolvimento racional de fármacos analgésicos para a terapia dessa dor crônica (TREEDE et al., 2008).

A pesquisa em animais sempre deve ser avaliada por quatro critérios gerais: a geração de conhecimento, a capacidade de estudos a serem reproduzidos, a relevância do estudo e a validação de estados clínicos de dor. Modelos em animais fornecem sistemas principais para estudos pré-clínicos de dor neuropática e servem como base experimental para investigações e novas intervenções terapêuticas (COLLEONI; SACERDOTE, 2009).

Numerosos modelos de dor neuropática podem ser classificados de diferentes maneiras como modelo de dor central, injúria nervosa periférica, induzida por patologias, induzida por quimioterápicos e induzida por irritação como mostra a tabela 6:

**Tabela 6 – Modelos de dor neuropática em animais**

Dor central	Injúria nervosa periférica	Induzida por patologias	Induzida por quimioterápicos	Induzida por irritação
Síndrome talâmica	Nervo ciático	Pós-herpética	Vincristina	Irritação espontânea
Injúria da espinhal dorsal	Plexo Braquial	Associada ao vírus do HIV	Paclitaxel	Gênica
Excitotóxico	Ligação nervosa espinhal	Esclerose múltipla	Cisplatina	
Fotoquímico	Injúria parcial do nervo da cauda e da safena	Neuropatia Diabética periférica		
	Neuralgia trigeminal	Relacionado ao câncer		

---

Fonte: COLLEONI; SACERDOTE, 2009

## 1.7 Justificativa e caracterização do problema

A OXL é um agente da família das Pt, originalmente desenvolvido no Japão. O seu mecanismo de ação é semelhante a outros derivados da platina, porém seu espectro de ação antineoplásica, difere da cisplatina e carboplatina. Estudos experimentais mostraram atividade em tumores de cólon resistentes à cisplatina e também se observou ação sinérgica quando combinada ao 5-FLU (MARSHALL, 2004).

Por ser um fármaco muito utilizado na terapêutica do câncer têm sua importância clínica muito ressaltada, porém os pacientes que fazem uso prolongado não conseguem terminar o esquema terapêutico de tratamento por apresentarem efeito colateral de neuropatia sensitiva periférica (NSP) em extremidades, assim devido a sua importância clínica a OXL é objeto desse estudo.

Em vista do fator econômico, por ser a OXL um fármaco de alto custo foi montado o modelo em camundongos, também para reduzir os gastos com a manutenção dos animais. Estudos em diferentes modelos experimentais são importantes, pois podem contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e ajudar no melhor entendimento da fisiopatologia da doença para o tratamento dos pacientes com câncer.

Contudo, justifica-se a necessidade de um estudo mais aprofundado dos mecanismos que acarretam a neuropatia periférica, a dor, a hiperalgesia pelo frio e a dificuldade na execução de movimentos delicados, sendo uma possível consequência de dano sensitivo ocasionado pela OXL. Em função de não se conhecer adequadamente os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da NSP, há protocolos e tratamentos clínicos estabelecidos sem, entretanto, haver tratamento farmacológico adequado para esta entidade visando à importância do seu entendimento.

## **OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um modelo experimental para estudo da neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Identificar a natureza sensitiva ou motora da neurotoxicidade induzida por OXL;

Analisar a hiperalgesia e a alodínia mecânica e térmicas induzidas pela OXL;

Avaliar o efeito de fármacos analgésicos na hiperalgesia e alodínia induzidos por OXL;

Investigar o perfil periférico de alguns moduladores da nocicepção (neuropeptídeos, receptores e mediadores) na neurotoxicidade da oxaliplatina.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Para a realização do modelo experimental para estudo da NSP pelo agente antineoplásico OXL foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando entre 25 e 30 gramas (g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC.

#### **3.2 Aspectos éticos**

Os protocolos experimentais utilizados no estudo seguiram as recomendações da Universidade Federal do Ceará (UFC). O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC sendo aprovado de acordo com o protocolo nº 70/07.

#### **3.3 Ambientes**

Os camundongos foram colocados, em número aproximadamente de 20 a 25 animais, em gaiolas de plástico medindo 40 centímetros (cm) de comprimento, 31 cm de largura e 17 cm de altura. O fundo destas gaiolas foi coberto por raspas de madeira e o teto consistia em grade de metal com um espaço para serem colocados comida e água. Os animais foram deixados em ambiente com temperatura de 25° C, com exaustão de ar, ciclo claro-escuro de 12 horas (h) e acesso à água e comida *ad libitum*.

Os animais foram alimentados com ração Fri-lab camundongos, tal ração leva composto de milho moído, farelo de arroz desengordurado, farelo de arroz integral,

farelo de girassol, fosfato monoamônico. Cada 100g de ração contém 23% de proteína, 22% de água, 4% de extrato etérico, 8% de fibra, 11% de minerais (ferro, cobalto, cobre, manganês, zinco, iodo), 1% de cálcio, 0,45% de fósforo e vitaminas (A, B1, B2, B6, ácido nicotínico, ácido pantotênico, C, D3, E, potássio e folato).

### **3.4 Horário dos experimentos**

Todos os experimentos, observações clínicas e comportamentais foram realizados entre 8 e 18 h. Os animais foram testados 1 vez por semana durante 4 semanas para um dos estímulos.

### **3.7 Observações clínicas**

Diariamente foram realizados exames clínicos atentando para trofismo muscular, coloração e aspecto do pelo, cor dos olhos, presença de parasitas, sinais de infecção local ou generalizada, marcha e sinais de autonomia.

### **3.8 Aparelhos e instrumentos laboratoriais**

- Agulhas (0,45 x 13) descartáveis;
- Algodão;
- Aparelho eletrônico Von-Frey eletrônico;
- Balança analítica (Sartorius modelo BL2105);
- Balança para pesagem de animais modelo ID-1500 (Filizola®);
- Beckers (SIMAX);
- Bisturi;
- Capela de fluxo laminar, vertical (modelo TROX do Brasil);
- Cassetes;



- Cronômetro;
- Eppendorf (1ml);
- Esparadrapo;
- Filtro;
- Gelo;
- Glicose;
- Caixas térmicas de isopor;
- Luvas descartáveis;
- Micropipetas automáticas (GILSON);
- Papel alumínio;
- Pincel para marcação dos animais (PILOT);
- Ponteiras para as pipetas automáticas estéreis (SIGMA);
- Seringas de 1 e 5ml (BD Plastipak);
- Termômetro;
- Tubos de plástico de 15 e 45ml (FALCON);
- Sonicador (THORNTOW – TT7);

### **3.7 Drogas, soluções, líquidos**

- Água destilada;
- Água filtrada;
- Álcool à 70%;
- Éter etílico P.A. (Dinâmica Brasil);
- Formol à 10%;
- Carbamazepina (AMS 300mg) diluída em cloreto de sódio a 0,9% VO;
- Gabapentina (PFIZER 600 mg) diluída em água filtrada VO;
- Indometacina (Sigma®) diluída em 500mg de bicarbonato de sódio e 10ml de água destilada IP;
- Oxaliplatina (Sigma® 5 mg) diluída em solução glicosada endovenosa (EV);
- Oxcarbazepina (100mg) diluída em água filtrada VO;
- Solução gliocosada (D-glucose anidra – dextrose synth);

- Solução salina estéril (NaCl 0,9%).

### 3.11 Protocolo experimental e desenho do estudo

#### 3.11.1 Curva dose-resposta para escolha da dose de oxaliplatina

Os animais foram levemente anestesiados para proceder à injeção via endovenosa (EV 0,3 ml/30g) de OXL dissolvida em solução glicosada estéril na veia lateral da cauda do camundongo (Figura 5) utilizando-se agulha de calibre 0,45 x 0,75 em seringa de 1ml. Os animais utilizados como controle receberam solução glicosada estéril na veia lateral da cauda via endovenosa (EV 0,3 ml/30g). Foi realizada curva dose-resposta pela aplicação de OXL nas doses de 1, 2 e 4mg/kg para definir a dosagem experimental a ser utilizada nos outros testes.



**Figura 5 - Administração na veia lateral da cauda**  
**Fonte: PESQUISADOR, 2008**

No início do estudo toda a amostra (n=6-12 camundongos swiss) foram pesados utilizando uma balança de precisão digital Filizola® e aferido os testes em tempo zero. Em seguida foi realizada a divisão dos grupos, cada grupo recebeu nove administrações EV de OXL nas doses de 1, 2 e 4mg/kg durante quatro

semanas e meia, duas vezes por semana e no grupo controle foi administrado via EV solução glicosada a 5%. Foram realizados os testes nociceptivos/neuropáticos e de atividade motora forçada concomitantemente às administrações de OXL uma vez por semana durante 56 dias (quatro semanas e meia). Após a realização dos testes os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. No início de cada experimento os animais (n=6-12 camundongos swiss) foram submetidos ao teste térmico (10°C) e ao teste de atividade motora forçada antes das nove administrações de OXL (1mg/kg EV) durante 4,5 semanas (Figura 6).

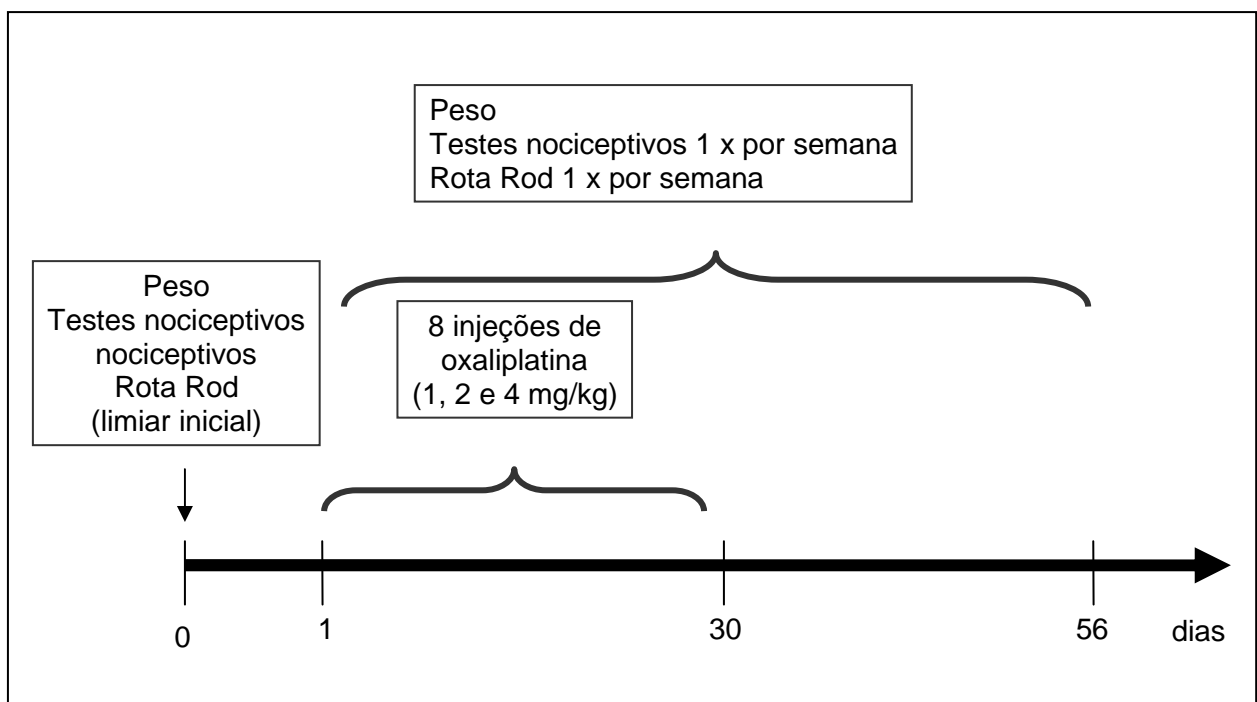


Figura 6 - Curva dose resposta para escolha da dose de oxaliplatina.

### 3.8.2 Investigação do efeito de fármacos analgésicos

Para investigar o efeito de fármacos comumente utilizados no tratamento das neuropatias periféricas, os animais foram administrados com carbamazepina (CBZ: 0,3mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg e 30mg/kg), oxcarbazepina (OZP: 0,3mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 30mg/kg e 100mg/kg) ou gabapentina (GABAP: 6mg/kg, 18mg/kg e 54mg/kg) todos por via oral (VO). Como controle negativo utilizamos a indometacina (INDO: 1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg) por via intraperitoneal (IP). Esses fármacos foram

administrados depois de 4 semanas de tratamento com OXL (1mg/kg), com o quadro neuropático já instalado, comprovado através de testes mecânicos e térmicos.

O efeito dos fármacos foi avaliado através do teste térmico frio (10°C) durante 105min a cada 30min e através do teste motor, realizado em 5,5 RPM no aparelho de Rota Rod, sendo observados por 2min. Ambos os testes foram realizados após uma única administração das doses citadas (Figura 7).

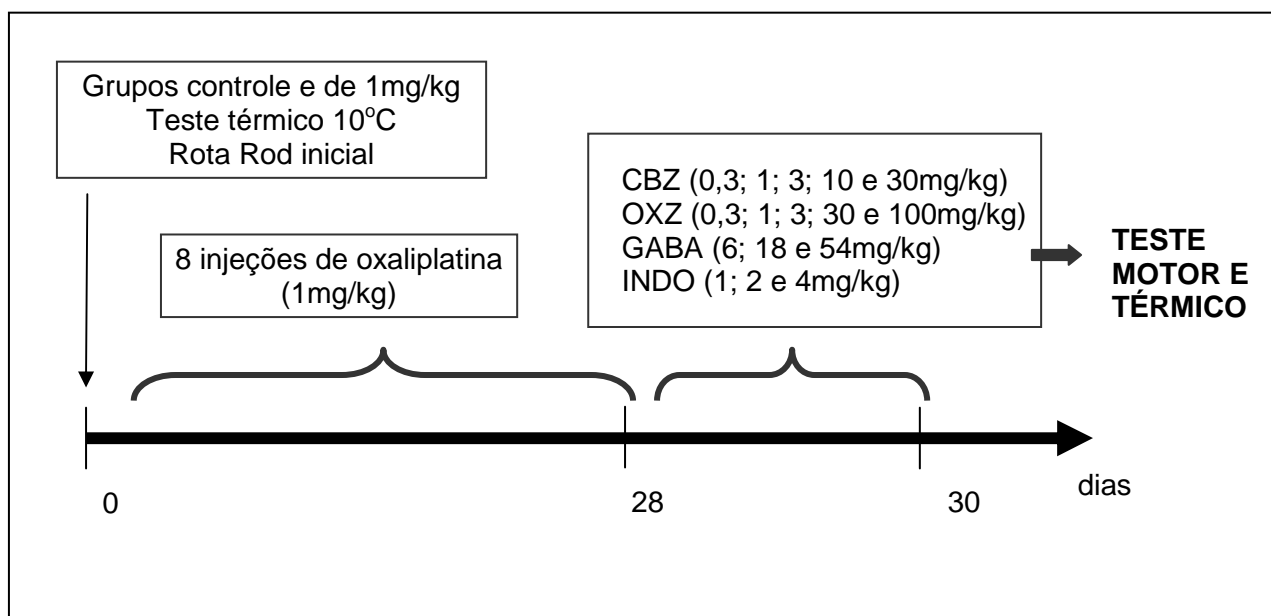


Figura 7 - Investigação do efeito de fármacos analgésicos.

### 3.8.5 Avaliação histopatológica

Para verificação das alterações teciduais microscópicas na pele das patas traseiras foram realizados cortes histológicos dos grupos tratados com OXL (até o 28º dia) e de animais normais (controle). O tecido foi fixado em formaldeído tamponado 10% e incluído em parafina. Os cortes foram obtidos através de micrótomo 4µm, corados em laminais com hematoxilina – eosina e examinados a microscopia ótica. A análise histopatológica foi realizada pela Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito, do Depto. de morfologia da UFC.

### 3.8.6 Investigação por imunohistoquímica

Camundongos swiss receberam injeções de OXL (1mg/kg EV) seguindo o mesmo protocolo dos outros experimentos. No entanto, grupos de 6 animais foram eutanasiados por deslocamento cervical a cada semana e foi retirada a pele das patas traseiras para realização de imunohistoquímica, seguindo o esquema cronológicos de 24h, 7,14 21 e 28 dias. Ou seja, o protocolo de 2 injeções por semana foi seguido, com exceção do grupo 24h que recebeu apenas 1 injeção 24h antes da eutanásia. As peles das patas traseiras foram coletadas com o auxílio de um bisturi e foram fixadas em formol. Posteriormente foram desidratadas em álcool e depois em xilol e então parafinadas.

No dia seguinte foram cortadas no plano transversal com 5µm de espessura com o auxílio de um micrótomo. As secções de tecido foram montadas em lâminas silanizadas especiais para imunohistoquímica. O ensaio de imunohistoquímica foi realizado na seguinte sequência: desparafinização e hidratação dos cortes; depois foi realizada a ativação antigênica (98°C por 13min) no microondas; inibição da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% por 10min; em seguida as secções foram incubadas em anticorpos policlonais para o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), receptor vanilóide (VR1), NMDA, fator de necrose tumoral (TNF - rabbit policlonal IgG, Santacruz Biotechnology) e nitrotirosina (rabbit policlonal IgG, Santacruz Biotechnology); ficaram *over night* a 4°C; no dia seguinte, incubação com anticorpo secundário biotilado universal (LSAB – DAKO) durante 30min; incubação com o complexo strepto-avidina-peroxidase (LSAB – DAKO) durante 30min; a coloração foi realizada pela adição do diaminobenzedine DAB-peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Mayer; foi realizada a desidratação e montagem das lâminas que foram examinadas no microscópio Leica® e foram registradas as fotografias das lâminas das patas (Figura 8).

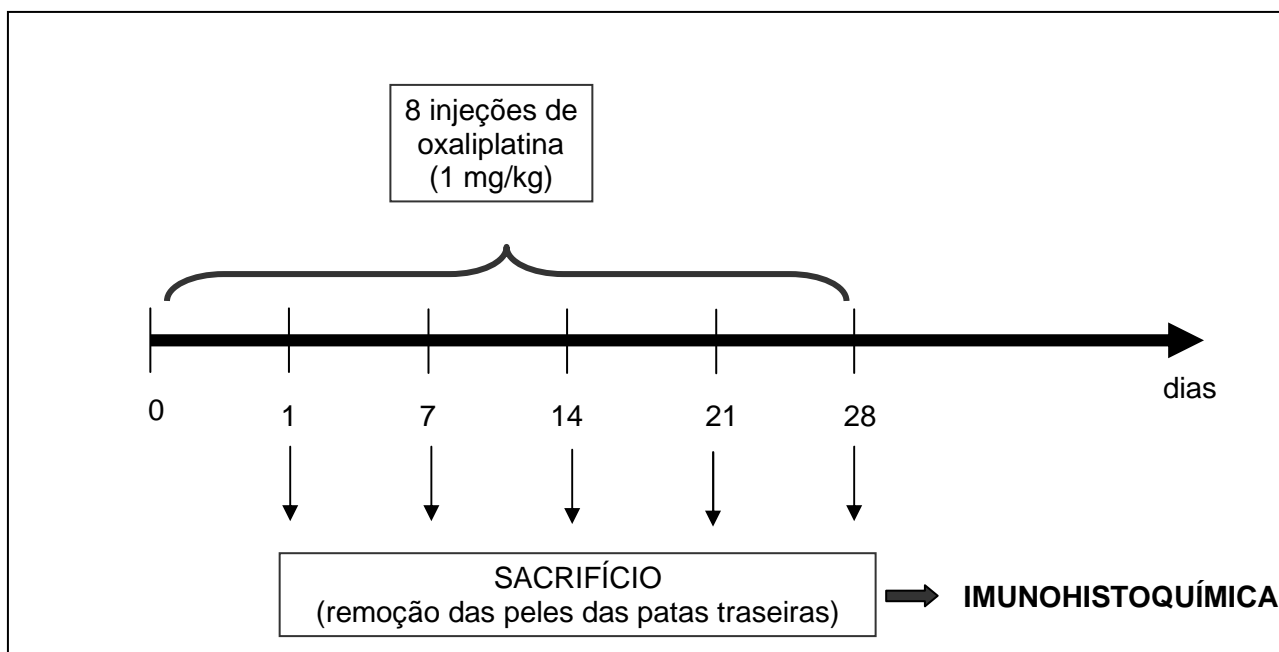


Figura 8 - Investigação por imunohistoquímica.

### 3.9 Testes

#### 3.9.1 Testes neuropáticos

##### 3.9.1.1 Teste de hiperalgesia mecânica plantar (Von Frey eletrônico)

A intensidade de hiperalgesia foi avaliada pelo limiar de sensibilidade de cada animal a um estímulo mecânico produzido pela pressão gradual exercida por um filamento rígido acoplado a um aparelho que registra a pressão em gramas exercida na ponta desse filamento.

A estimulação mecânica foi exercida na região plantar das patas traseiras. O aparelho eletrônico Von Frey (Figura 9) registra a pressão em gramas suficiente para provocar uma reação descrita como uma flexão da pata seguida por um “flinch” após a retirada da pata em contato com o aparelho. A hiperalgesia mecânica (grau de sensibilidade ao estímulo mecânico) foi medida antes (tempo zero) e após a injeção do tratamento. Foi avaliado o limiar mecânico de cada animal (CUNHA et al., 2004).



Figura 9 - Aparelho eletrônico Von Frey.  
Fonte: PESQUISADOR, 2009

### 3.9.1.2 Teste de hiperalgesia/alodínia térmica (teste de imersão da cauda)

- **Teste de imersão da cauda em água fria**

Baseado no modelo de Necker e Hellon (1978) e Authier et al. (2003), a cauda do camundongo foi imersa em água (Figura 10) fria mantida a temperatura de 4°C ou 10°C para testar hiperalgesia ou alodínia respectivamente, sendo contado o tempo de permanência até o camundongo levantar a extremidade da cauda em contato com a água fria.

- **Teste de imersão da cauda em água aquecida**

A cauda do camundongo foi imersa em água aquecida mantida a temperatura de 46°C ou 42°C para testar hiperalgesia ou alodínia, sendo contado o tempo de permanência até o camundongo levantar a extremidade da cauda em contato com a água aquecida (AUTHIER et al., 2003)



**Figura 10- Teste de imersão da cauda**  
**Fonte: PESQUISADOR, 2009**

### **3.9.1.3 Atividade motora forçada, locomoção e equilíbrio (Rota Rod)**

Foi realizado um teste de desempenho baseado na atividade motora forçada em uma haste alternada, usado por roedores. Parâmetros incluem o tempo de marcha (segundos) ou a resistência. O teste é usado para avaliar o equilíbrio e a coordenação dos animais, em particular em modelos animais experimentais, e os transtornos neurológicos e os efeitos de drogas (INSIGHT, 2003).

O Rota Rod (Figura 11) é um equipamento em acrílico resistente, motorizado com aceleração progressiva e invariável de 5 a 25 rotações por minuto (RPM) no eixo do motor, podendo ser variada, no eixo de atividade, mudando-se a relação de polias, assim chegando a uma variação de 4 até 37 RPM. Com dimensões de: 440 milímetros (mm) de altura, 370mm de largura, 530mm de comprimento com peso de 12 quilos (INSIGHT, 2003).

Há quatro baias que possuem sistema de detecção de queda do animal através de impacto, circuito microprocessado para cronometragem de permanência do animal na baia e contagem de vezes em que o animal caia.

Inicialmente os camundongos foram treinados 24h antes da realização do experimento, ao serem individualmente posicionados no aparelho de Rota Rod (5,5



RPM). O animal que permaneceu 2 minutos (min) na barra foi selecionado para o estudo (DUNHAM; MIYA, 1957).



**Figura 11 - Aparelho de Rota Rod.**  
**Fonte: INSIGHT, 2003.**

### **3.10 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos dos testes comportamentais e farmacológicos foi utilizado à análise de variância (one way - ANOVA) e o nível de significância entre os grupos foram determinados pelos testes Bonferroni e Dunnet para detectar as diferenças entre o grupo controle e os grupos em tratamento.

O número (n) de animais por grupo experimental foi no mínimo de 6. Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menos que 5% ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

## **4 RESULTADOS**

Considerando-se o caráter relevante do ineditismo do presente trabalho e a necessidade metodológica de se estabelecer parâmetros para delineamento experimental da investigação da NSP seguem abaixo os resultados da neuropatia ocasionada pelo antineoplásico OXL.

### **4.1 Curva dose resposta para escolha da dose de oxaliplatina**

#### **4.1.1 Estudo da neuropatia sensitiva periférica**

##### **4.1.1.1 Estudo da hiperalgesia mecânica plantar (Von Frey)**

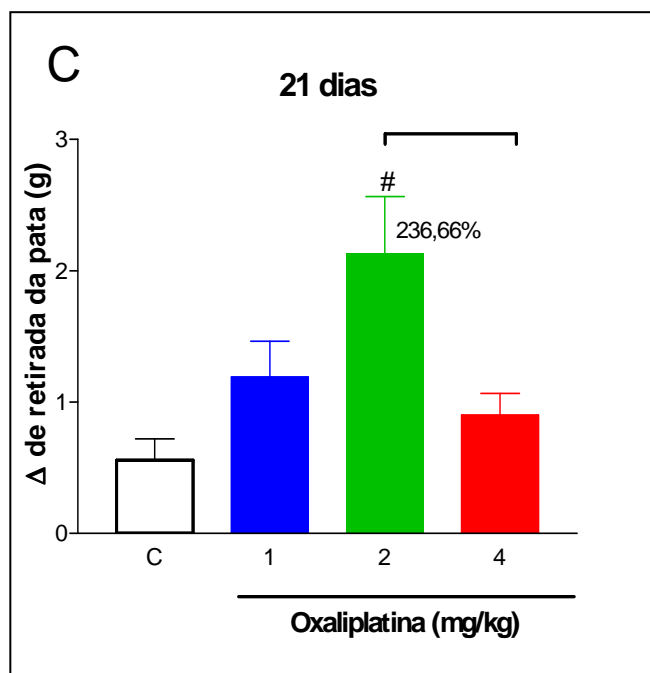
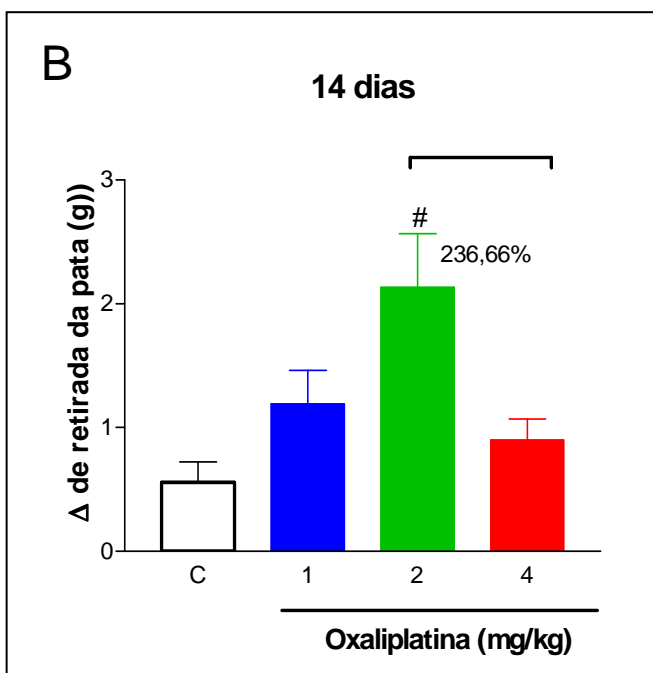
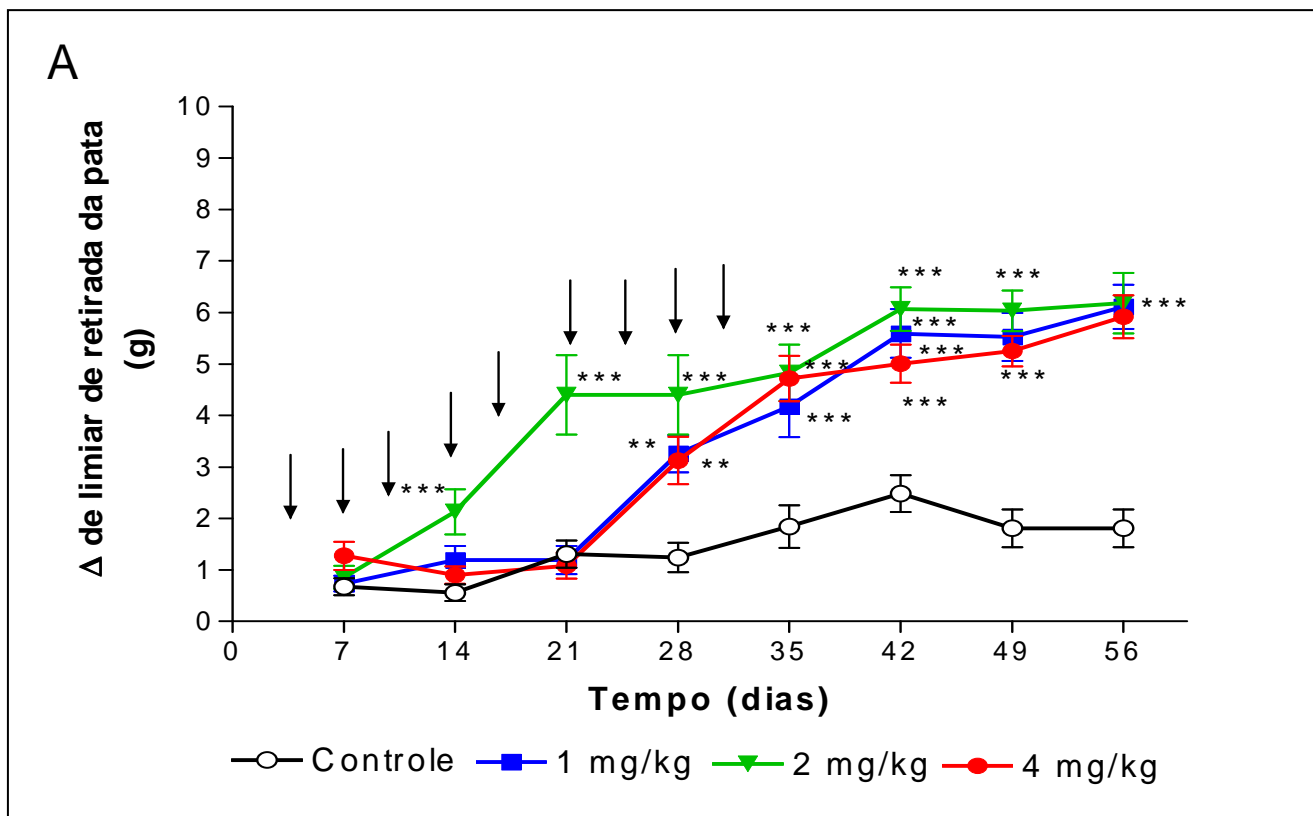
No teste de Von Frey foi observado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) a partir do 14º dia atingindo o máximo na dose de 2mg/kg (381,72%) comparado ao grupo controle no 56º dia. No 14º e 21º dias houve aumento no limar de 236,66% e 381,72% respectivamente no grupo de 2mg/kg ( $p < 0,001$ ) comparado com o grupo controle.

No 28º dia houve aumento significativo de 251,61%, 354,26% e 262,31% nos grupos de 4mg/kg ( $p < 0,01$ ), 2mg/kg ( $p < 0,001$ ) e 1mg/kg ( $p < 0,01$ ) respectivamente quando comparados com o controle.

No 35º dia houve aumento significativo de 256,08%, 262,37% e 226,65% nos grupos de 4mg/kg ( $p < 0,001$ ), de 2mg/kg ( $p < 0,001$ ) e de 1mg/kg ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o controle.

A partir do 42º dia houve aumento significativo de 201,69%, 244,34% e 225,21% nas doses de 4, 2 e 1mg/kg ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o grupo controle. Os grupos são medianamente diferentes nos dias 14 e 21.

No 14º e 21º dias houve aumento significativo de 236,66% no grupo de 2mg/kg (#  $p < 0,05$ ) comparado com o grupo de 4mg/kg (Figura 12).



**Figura 12 - Avaliação do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica plantar induzida por oxaliplatina.** Oxaliplatina (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=12) ou veiculo (Controle, n=12) foram administrados por via EV durante 4,5 semanas. Cada animal recebeu nove injeções (setas). O teste nociceptivo (alodínia plantar mecânica – Von-Frey eletrônico) foi realizado uma vez por semana durante 56 dias. Painel A: os pontos representam a média ± EPM da variação do limiar de retirada da pata em gramas (intensidade de alodínia). Os painéis B e C mostram separadamente o 14º e 21º dias respectivamente. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\*p<0,05; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; ANOVA e teste de Bonferroni, painel A). # indica diferença estatística entre as doses de 2 e 4 mg/kg (# p<0.05; ANOVA e teste de Bonferroni; painéis B e C).

#### **4.1.1.2 Estudo da hiperalgesia e alodínia térmica (Imersão da cauda)**

- **Alodínia térmica**

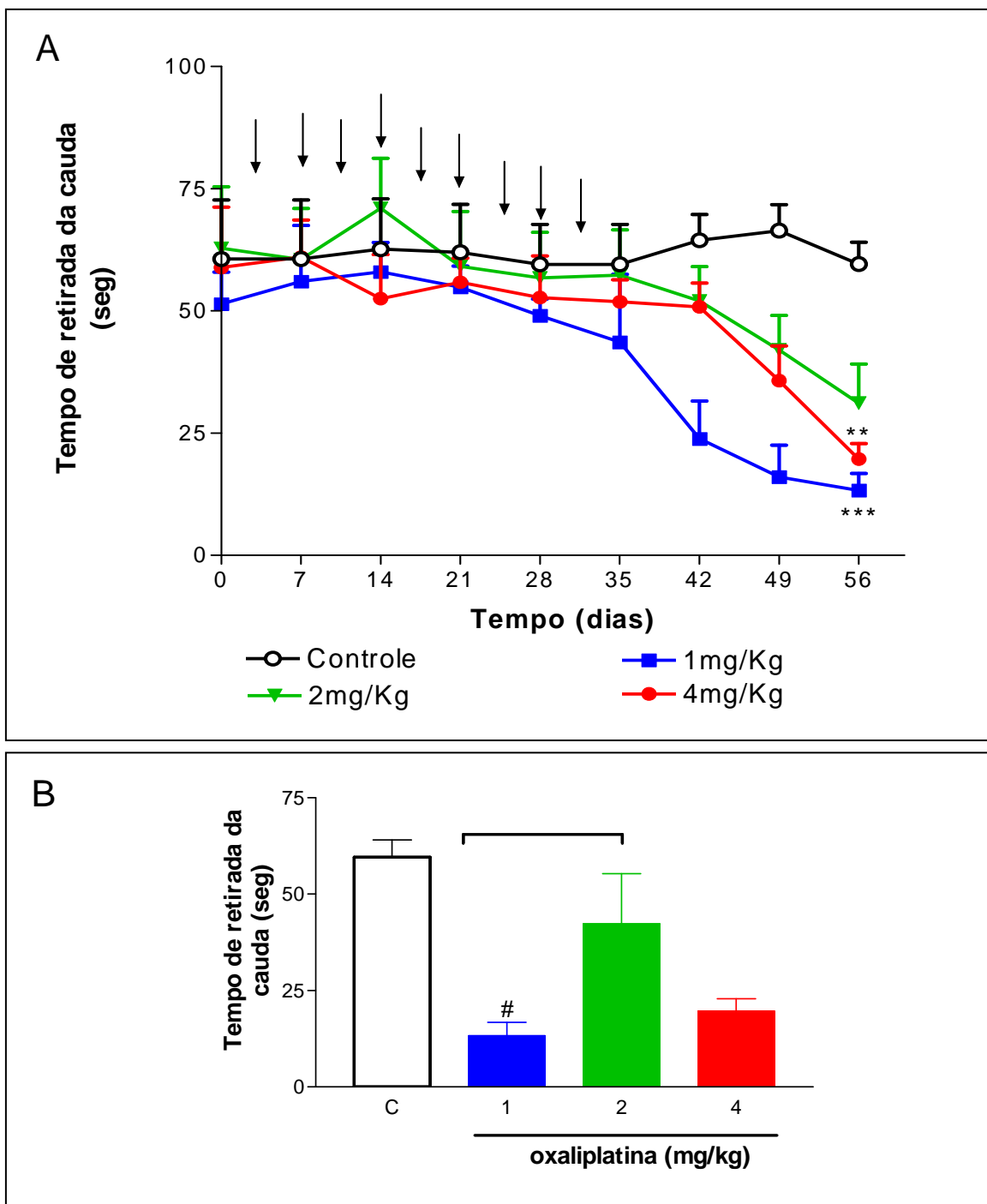
- **Teste da imersão da cauda em água fria (10°C)**

Foi observada uma diminuição significativa no limiar nociceptivo a partir do 49º dia ( $p < 0,01$ ). Na dose de 4mg/kg houve redução de -33,01% comparado ao grupo controle no 56º ( $p < 0,01$ ) dia. Houve redução de -22,24% na dose de 1mg/kg comparado com o controle no 56º dia ( $p < 0,001$ ).

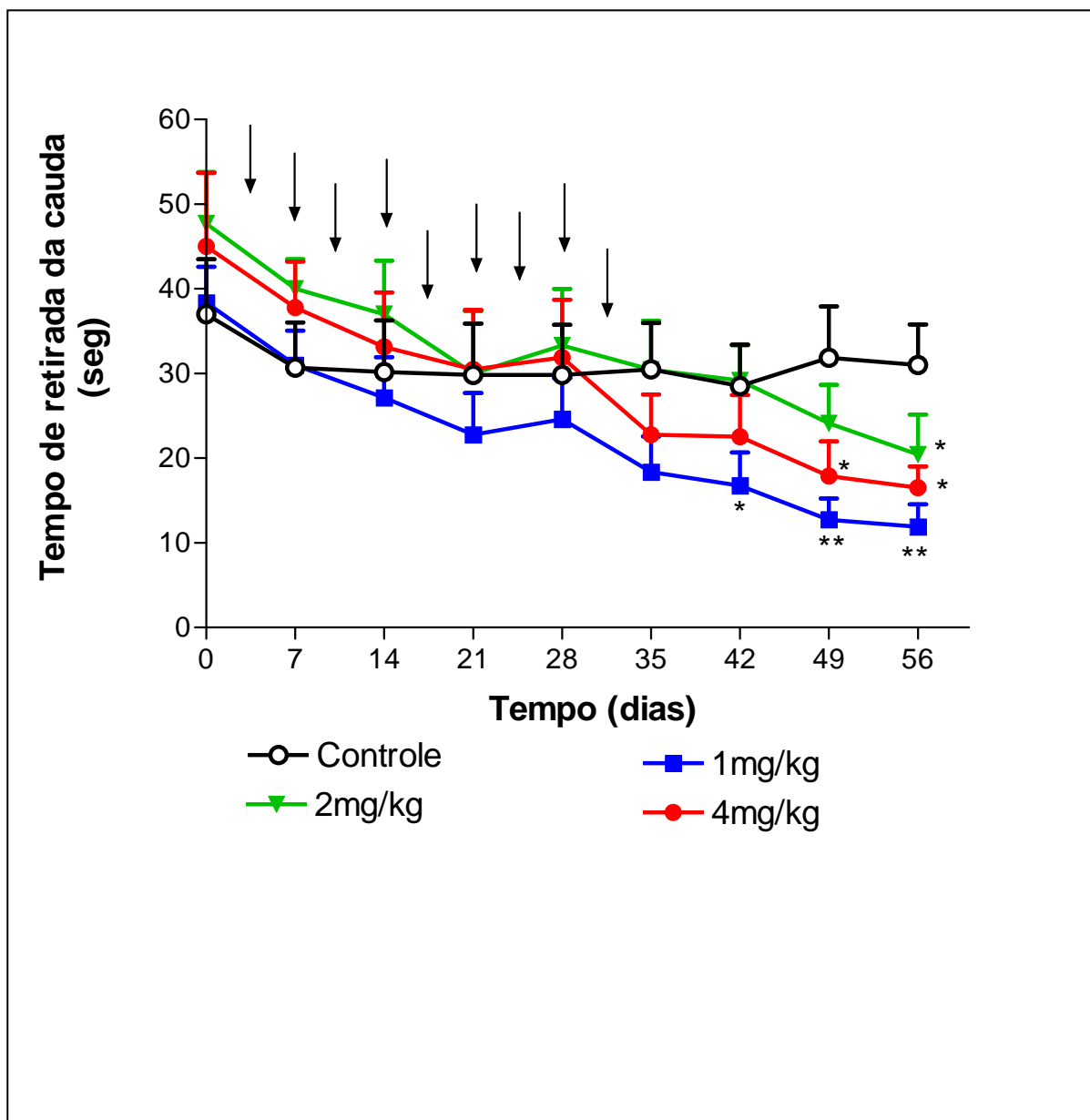
Também se notou uma redução significativa do limiar nociceptivo na dose de 1mg/kg (-31,36%) comparado com o grupo de 2mg/kg ( $p < 0,05$ ) no 56º dia. Os grupos são medianamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) (Figura 13).

- **Teste de imersão da cauda em água aquecida (42°C)**

Foi observada uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) no limiar nociceptivo a partir do 35º dia. Na dose de 1mg/kg houve redução de -35,44%, -27,27% e -24,48% comparado ao grupo controle no 42º ( $p < 0,05$ ), 49º ( $p < 0,01$ ) e 56º ( $p < 0,01$ ) dias. Houve redução de -40,97% na dose de 2mg/kg comparado com o controle no 56º dia ( $p < 0,05$ ). Também se notou uma redução significativa do limiar nociceptivo na dose de 4mg/kg (-38,23% e -34,02%) comparado com o controle no 49º ( $p < 0,05$ ) e 56º dia ( $p < 0,05$ ) respectivamente. Os grupos são medianamente diferentes ( $p = 0,001$ ) (Figura 14).



**Figura 13 - Avaliação do desenvolvimento de alodínia térmica ao frio (10°C) induzida por oxaliplatina.** Oxaliplatina (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=12) ou veiculo (Controle, n=12) foram administrados por via EV durante 4,5 semanas. Cada animal recebeu nove injeções (setas). O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda a 10°C) foi realizado uma vez por semana durante 56 dias. Painel A: os pontos representam a média  $\pm$  EPM do tempo de retirada da cauda em segundos (intensidade de alodínia térmica). O painel B mostra separadamente o 56º dia. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; ANOVA e teste de Bonferroni; painel A). # indica diferença estatística entre as doses de 2 e 1 mg/kg (# p<0.05; ANOVA e teste de Bonferroni; painel B).



**Figura 14 - Avaliação do desenvolvimento de alodínia térmica ao calor (42°C) induzida por oxaliplatina.** Oxaliplatina (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=12) ou veículo (Controle, n=12) foram administrados por via EV durante 4,5 semanas. Cada animal recebeu nove injeções (setas). O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda a 42°C) foi realizado uma vez por semana durante 56 dias. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM do tempo de retirada da cauda em segundos (intensidade de alodínia térmica). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ; ANOVA e teste de Bonferroni).

- **Teste de hiperalgesia térmica**

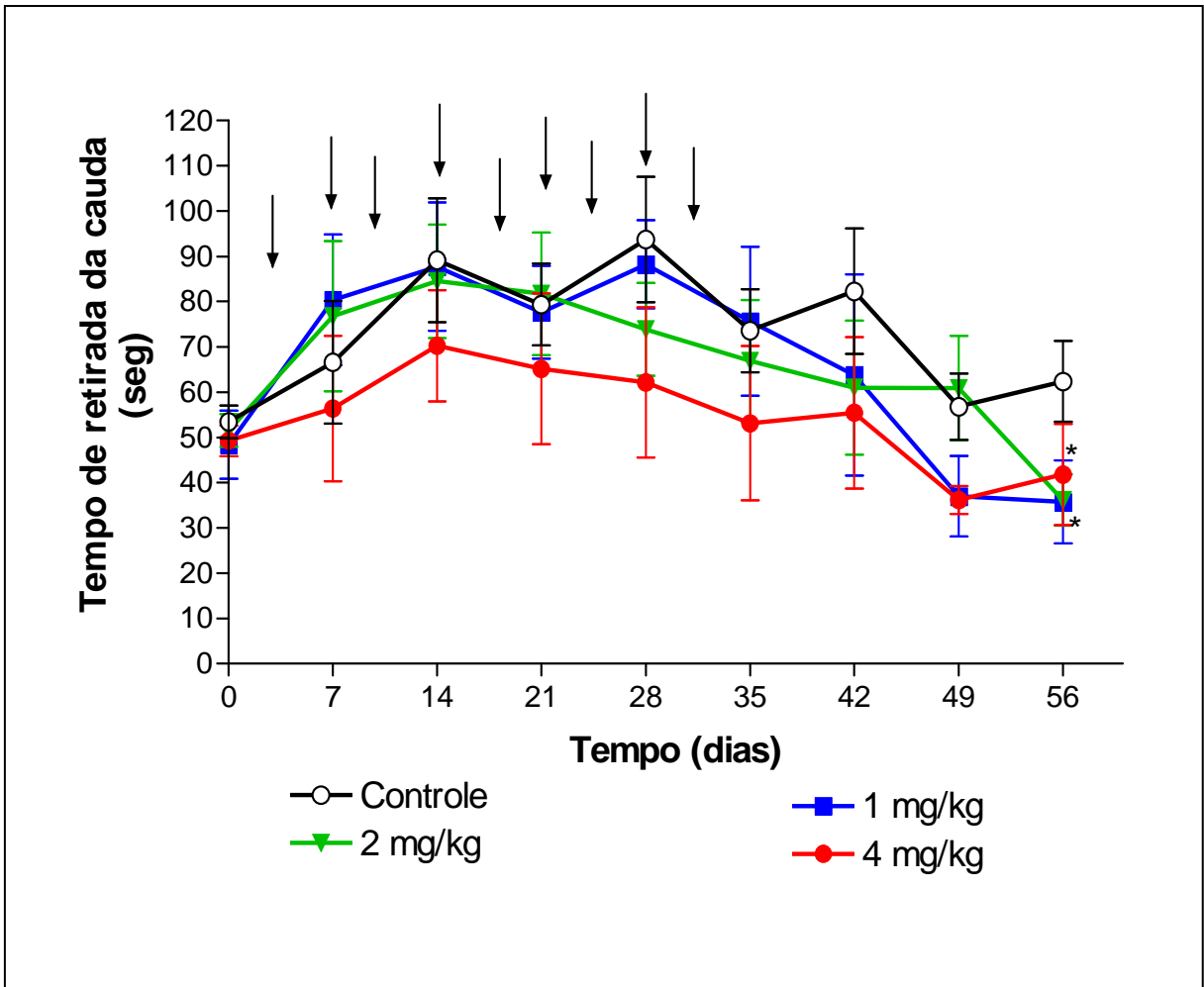
- **Teste da imersão da cauda em água fria (4°C)**

Foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) no limiar nociceptivo no 56º dia atingindo -47,08% na dose de 4mg/Kg e -39,79% na dose de 1mg/kg comparado ao grupo controle. Os grupos não são medianamente diferentes (Figura 15).

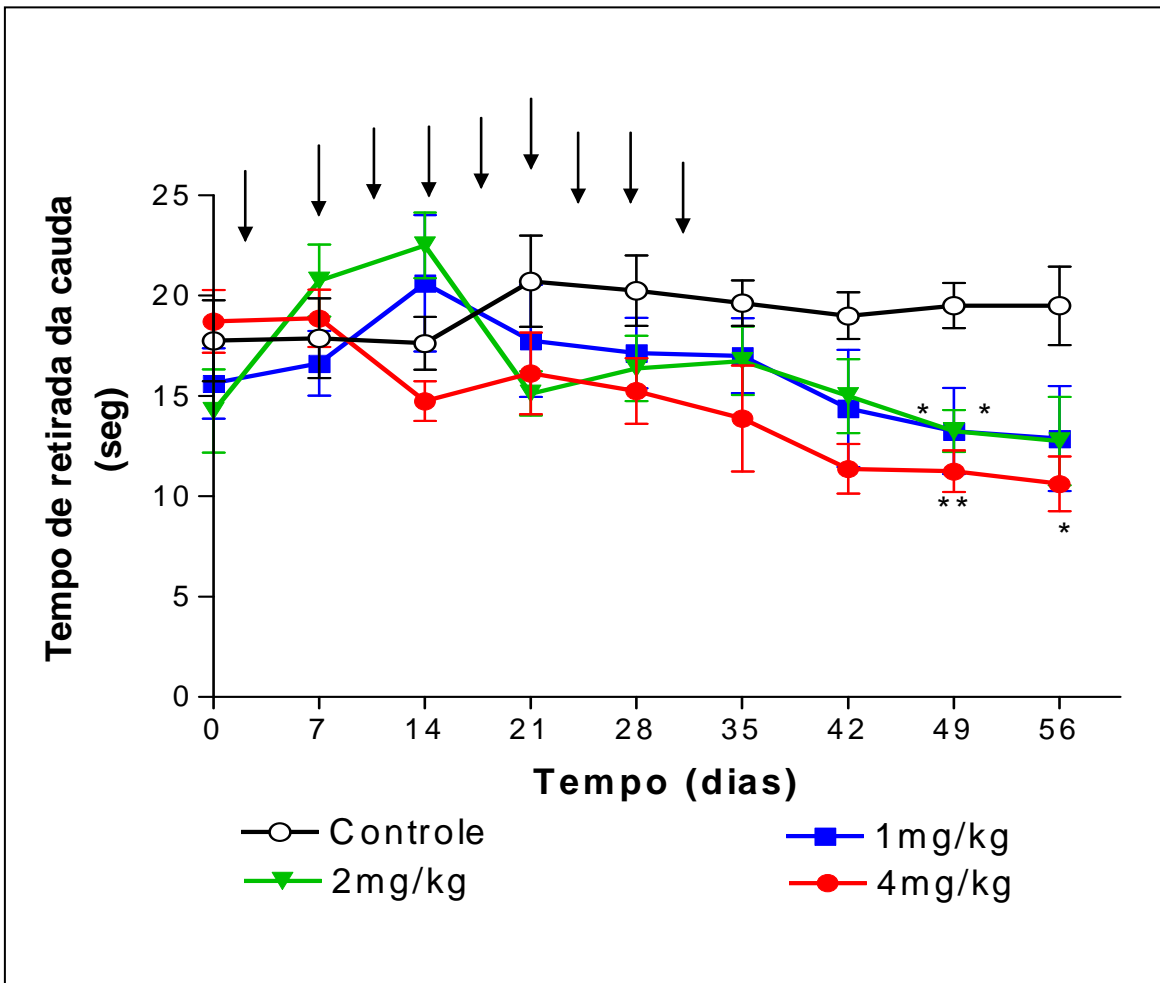
- **Teste de imersão da cauda em água quente (46°C)**

Foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no limiar nociceptivo a partir do 49º dia atingindo -57,69% na dose de 4mg/kg ( $p < 0,01$ ) comparado ao grupo controle, -67,94% na dose de 2mg/kg ( $p < 0,05$ ) e -67,94% na dose de 1mg/kg ( $p < 0,05$ ). Houve redução de -54,48% na dose de 4mg/kg comparado com o controle no 56º dia ( $p < 0,05$ ). Os grupos não são medianamente diferentes (Figura 16).





**Figura 15 - Avaliação do desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao frio (4°C) induzida por oxaliplatina.** Oxaliplatina (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=8) ou veículo (Controle, n=12) foram administrados por via EV durante 4,5 semanas. Cada animal recebeu nove injeções (setas). O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda a 4°C) foi realizado uma vez por semana durante 56 dias. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM do tempo de retirada da cauda em segundos (intensidade de hiperalgesia térmica). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\*  $p < 0.05$ ; ANOVA e teste de Bonferroni).



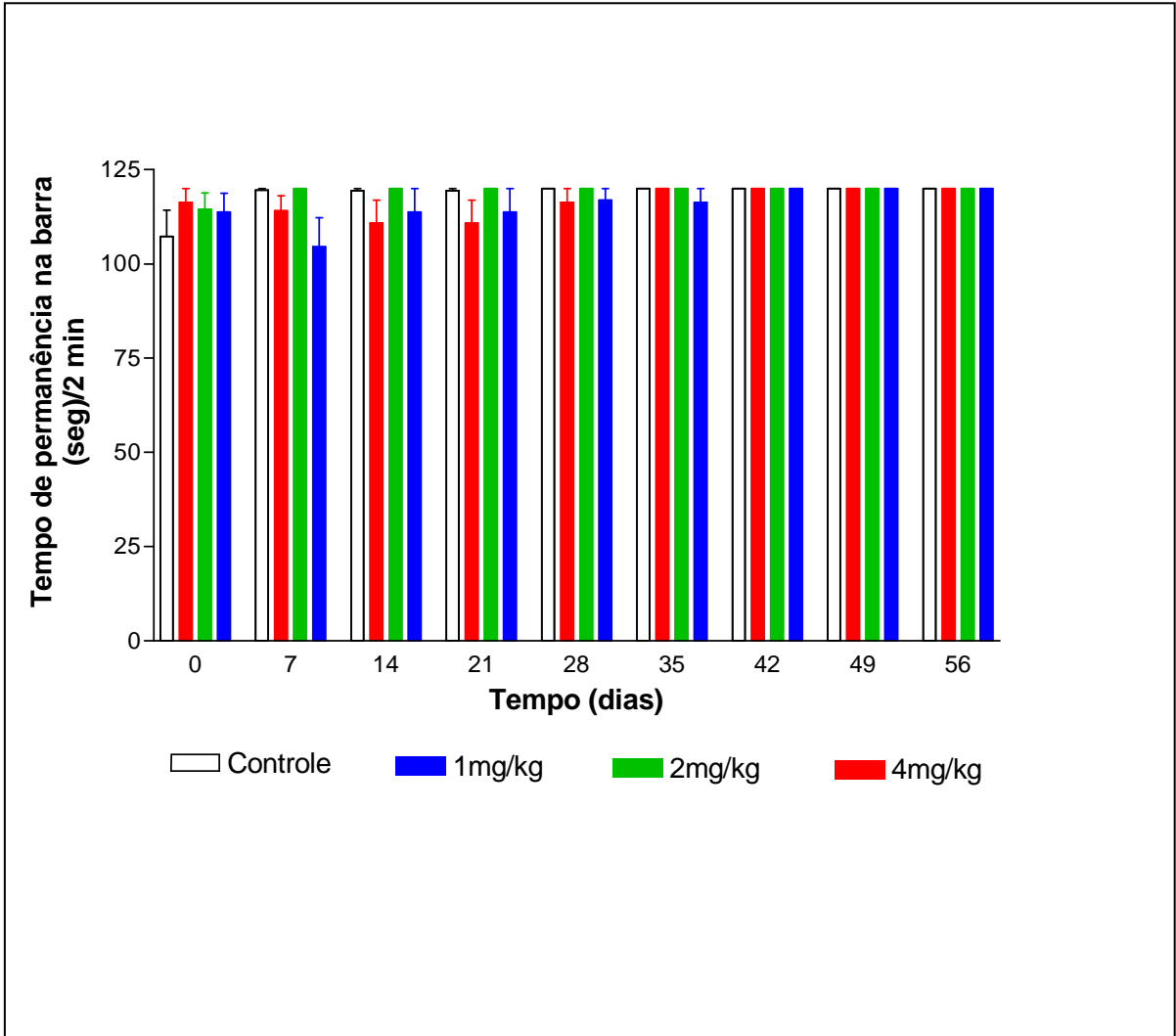
**Figura 16 - Avaliação do desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor (46°C) induzida por oxaliplatina.** Oxaliplatina (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=8) ou veiculo (Controle, n=12) foram administrados por via EV durante 4,5 semanas. Cada animal recebeu nove injeções (setas). O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda a 46°C) foi realizado uma vez por semana durante 56 dias. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM do tempo de retirada da cauda em segundos (intensidade de hiperalgesia térmica). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\*  $p < 0.05$  e \*\* $p < 0,01$ ; ANOVA e teste de Bonferroni).

#### **4.3.2 Estudo da atividade motora forçada, locomoção e equilíbrio**

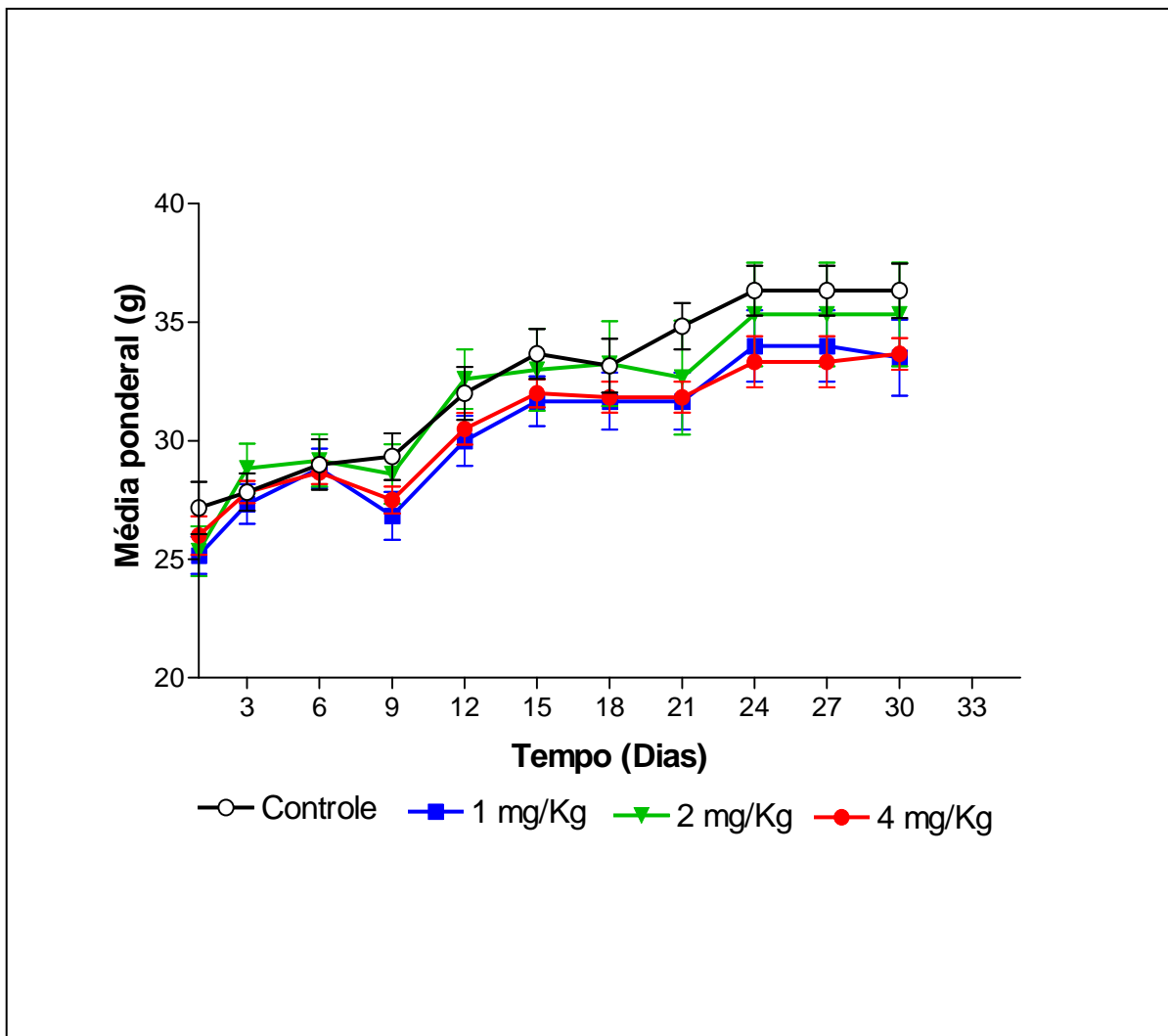
No teste do Rota Rod, com 5,5 RPM, realizado entre o grupo controle e os grupos com doses diferentes de OXL (1, 2 e 4mg/kg) as médias encontradas foram semelhantes (controle 118,4; dose de 4mg/kg 116,5; dose de 2mg/kg 119,4 e dose de 1mg/kg 115,4) não havendo variação significativa em nenhum grupo comparado com o controle nem entre si (Figura 17).

#### **4.4 Média ponderal**

O peso corporal foi medido antes de cada administração de OXL e até o final dos testes. O peso dos animais não sofreu variação significativa com o antineoplásico OXL nas diferentes doses administradas (Figura 18).



**Figura 17 - Avaliação do efeito do tratamento crônico com oxaliplatina sobre a coordenação motora e equilíbrio de camundongos no teste do Rota Rod.** Oxaliplatina (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=8) ou veículo (Controle, n=8) foram administrados por via EV durante 4,5 semanas. Cada animal recebeu nove injeções. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo dos animais no aparelho de Rota Rod durante 2 minutos a cada semana num total de 9 semanas (56 dias). Foram utilizados 6 animais por grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. (ANOVA e teste de Bonferroni).



**Figura 18 - Avaliação da média ponderal dos animais tratados com oxaliplatina.** Oxaliplatina (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=6) ou veículo (Controle, n=6) foram administrados por via EV durante 4,5 semanas. Cada animal recebeu nove injeções. O peso dos animais foi medido antes de cada administração de OXL, sendo verificado 2 vezes por semana até o final das administrações. Os valores representam a média  $\pm$  EPM e não houve diferença estatística em relação ao controle (ANOVA e teste de Bonferroni).

Após a realização dos testes de hiperalgesia e alodínia mecânica e térmicos observou-se que o melhor resultado encontrado foi com a dose de 1mg/kg entre os testes, assim na segunda etapa dos experimentos foi realizado o teste térmico de alodínia (10° C) e de Rota Rod com diversos fármacos anticonvulsivantes e anti-inflamatório após a instalação da NSP verificando a dose acumulada (crônico).

## **4.5 Investigação do efeito de fármacos analgésicos**

### **4.3.1 Carbamazepina (CBZ)**

Foi observado que o tratamento com CBZ (0,3-30mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo ( $p=0,002$ ) indicando efeito analgésico.

Em 75 minutos houve aumento de 197,58%, 199,99%, 190,93% e 202,11% nos grupos de 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg e 30mg/kg respectivamente ( $p<0,05$ ) comparados com o grupo controle.

Em 105 minutos houve aumento de 211,11%, 210,47%, 206,66% e 218,41% nos grupos de 1mg/kg ( $p<0,01$ ), 3mg/kg ( $p<0,01$ ), 10mg/kg ( $p<0,01$ ) e 30mg/kg ( $p<0,001$ ) respectivamente comparados com o controle (Figura 19).

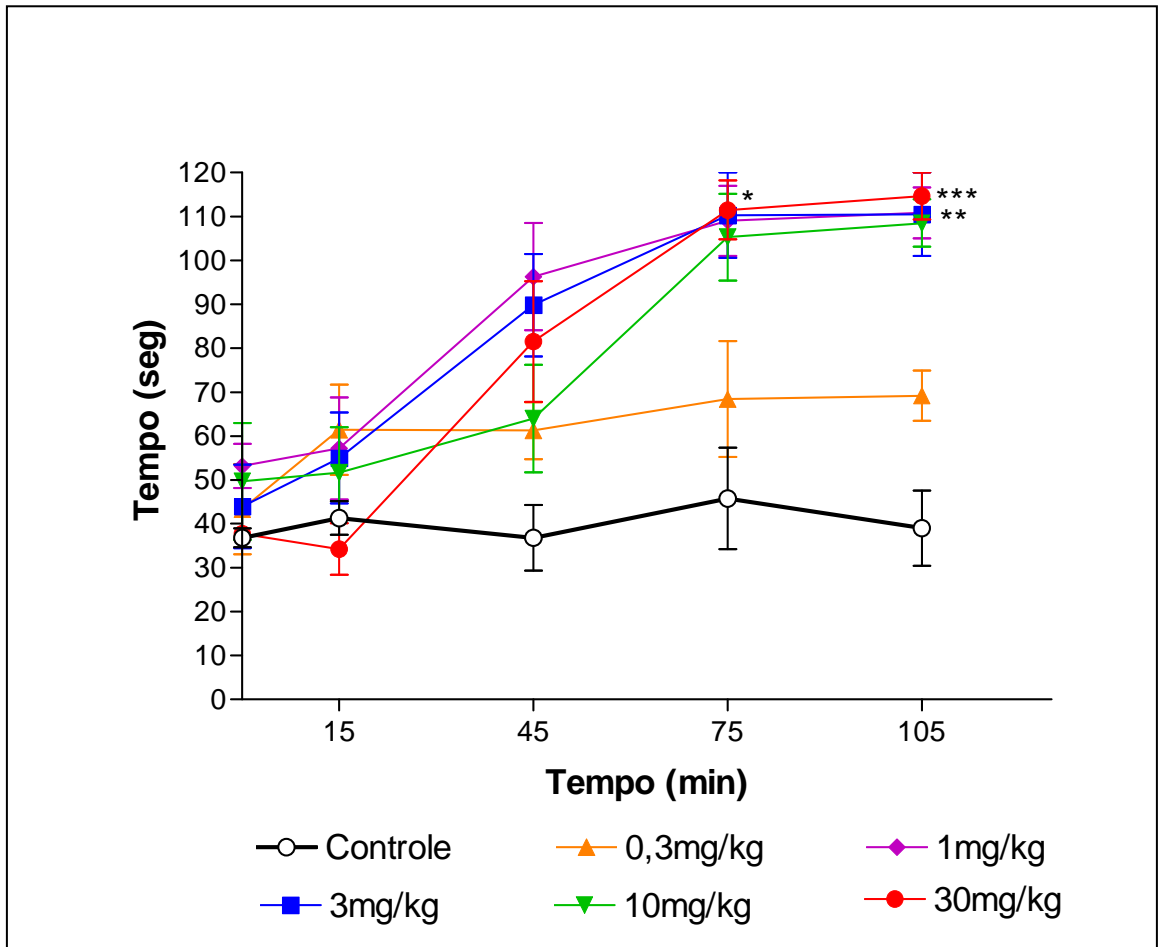
### **4.3.2 Oxcarbazepina (OZP)**

Foi observado que o tratamento com OZP (0,3-100mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo ( $p<0,003$ ) indicando efeito analgésico.

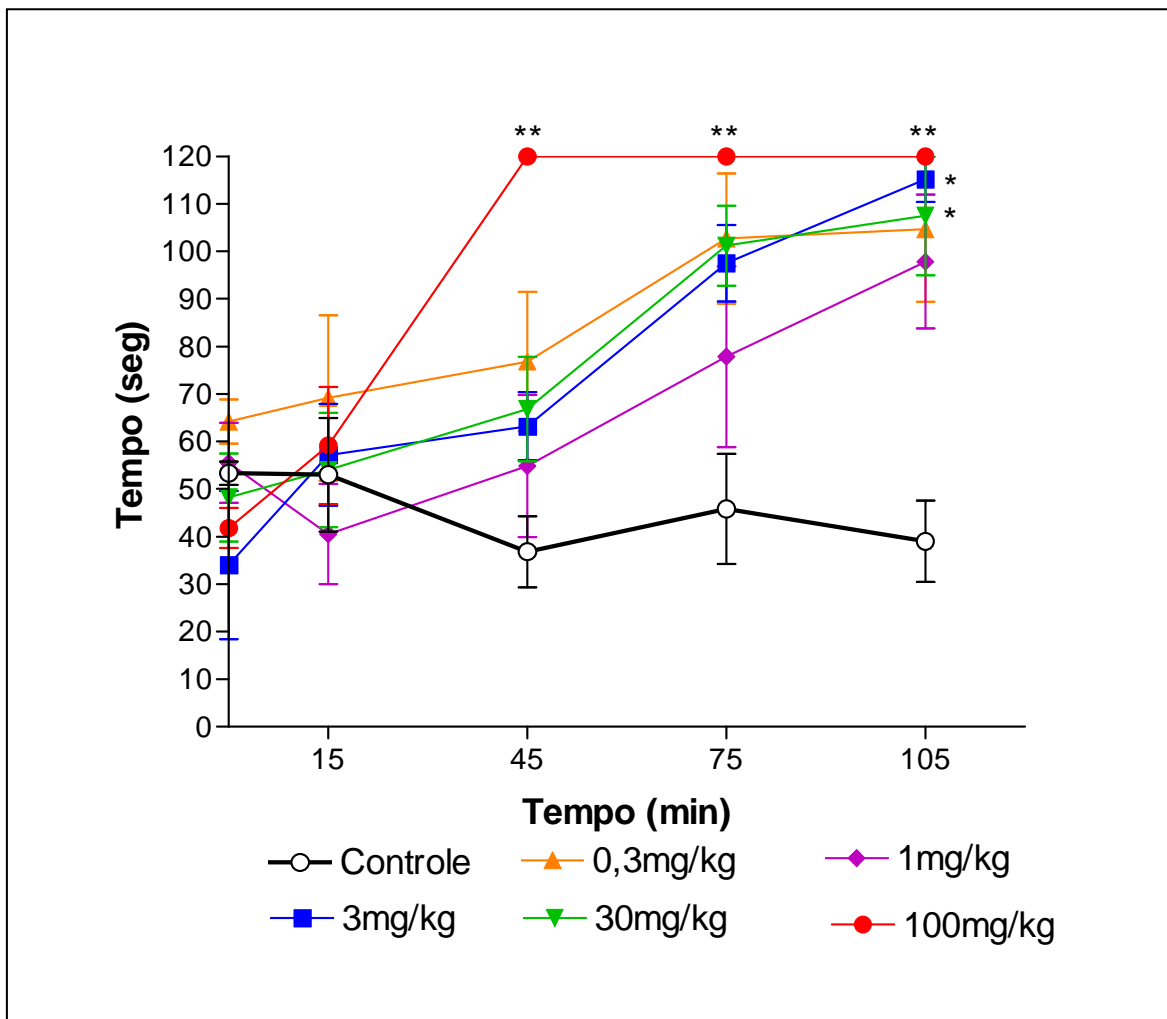
Em 45 minutos houve aumento do limiar em 236,84% no grupo de 100mg/kg ( $p<0,01$ ) comparado com o grupo controle.

Em 75 minutos houve aumento de 217,52% no grupo de 100mg/kg ( $p<0,01$ ) comparado com o grupo controle.

Em 105 minutos houve aumento de 219,36%, 204,76% e 228,57% nos grupos de 3mg/kg ( $p<0,05$ ), 30mg/kg ( $p<0,05$ ) e 100mg/kg ( $p<0,01$ ) respectivamente comparados ao grupo controle. Os grupos não são medianamente diferentes (Figura 20).



**Figura 19 - Efeito do anticonvulsivante carbamazepina (CBZ) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina (1mg/kg).** Oxaliplatina (1mg/kg, n=6) foi administrada por via EV durante 4 semanas. Cada animal recebeu oito injeções. CBZ (0,3mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg e 30mg/kg; n=6) ou veiculo (Controle, n=6) foram administrados por VO. O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda a 10°C) foi realizado durante 105 minutos em intervalos de 30 minutos. Os pontos representam a média ± EPM do tempo de retirada da cauda em segundos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\* p<0.05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001; ANOVA e teste de Bonferroni).



**Figura 20 - Efeito do anticonvulsivante oxcarbazepina (OZP) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina (1mg/kg).** Oxaliplatina (1mg/kg, n=6) foi administrada por via EV durante 4 semanas. Cada animal recebeu oito injeções. OZP (0,3mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 30mg/kg e 100mg/kg; n=6) ou veículo (Controle, n=6) foram administrados por VO durante 4 semanas. O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda a 10°C) foi realizado durante 105 minutos em intervalos de 30 minutos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM do tempo de retirada da cauda em segundos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\*  $p < 0.05$  e \*\* $p < 0,01$ ; ANOVA e teste de Bonferroni).

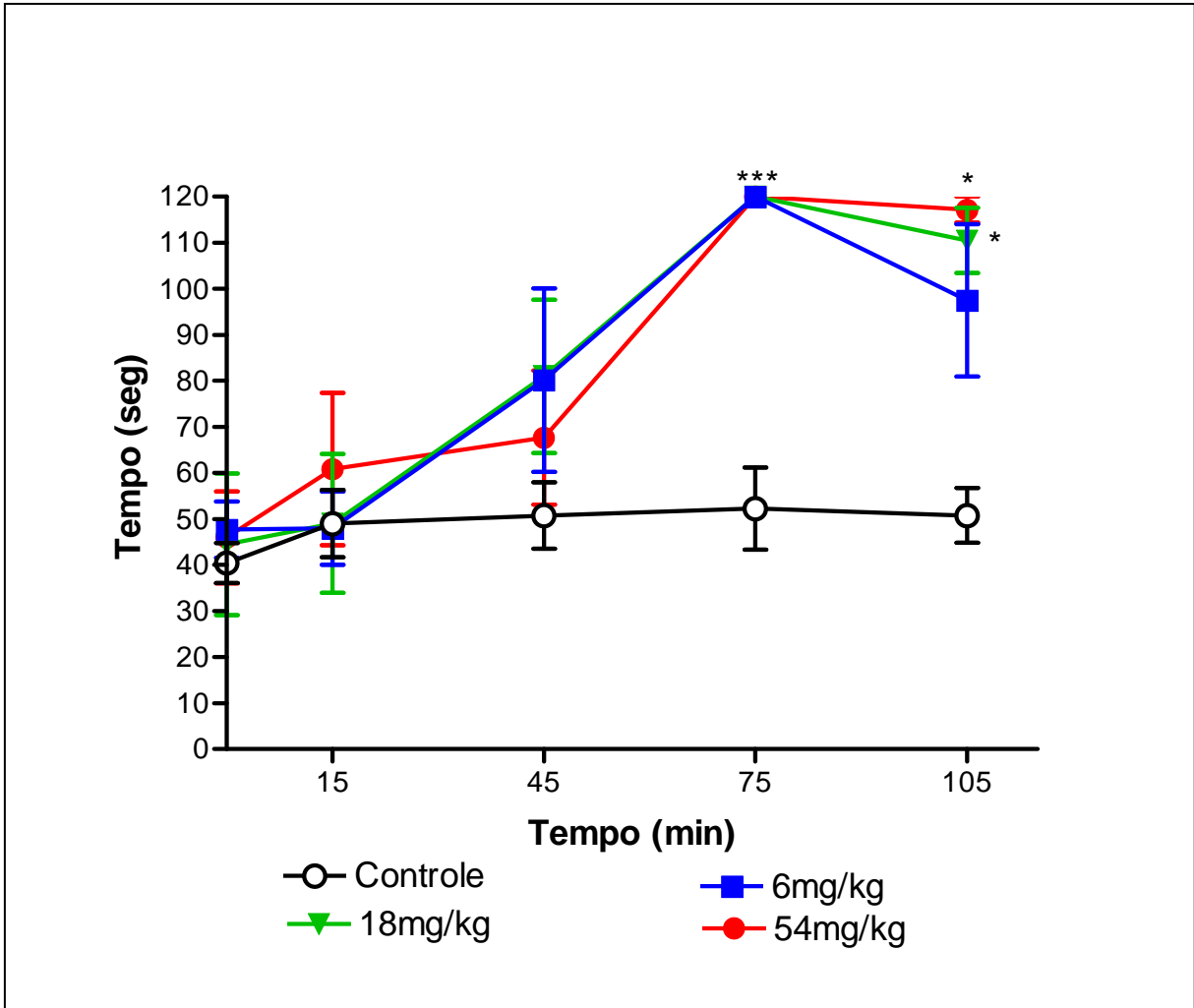


### **4.3.3 Gabapentina (GABAP)**

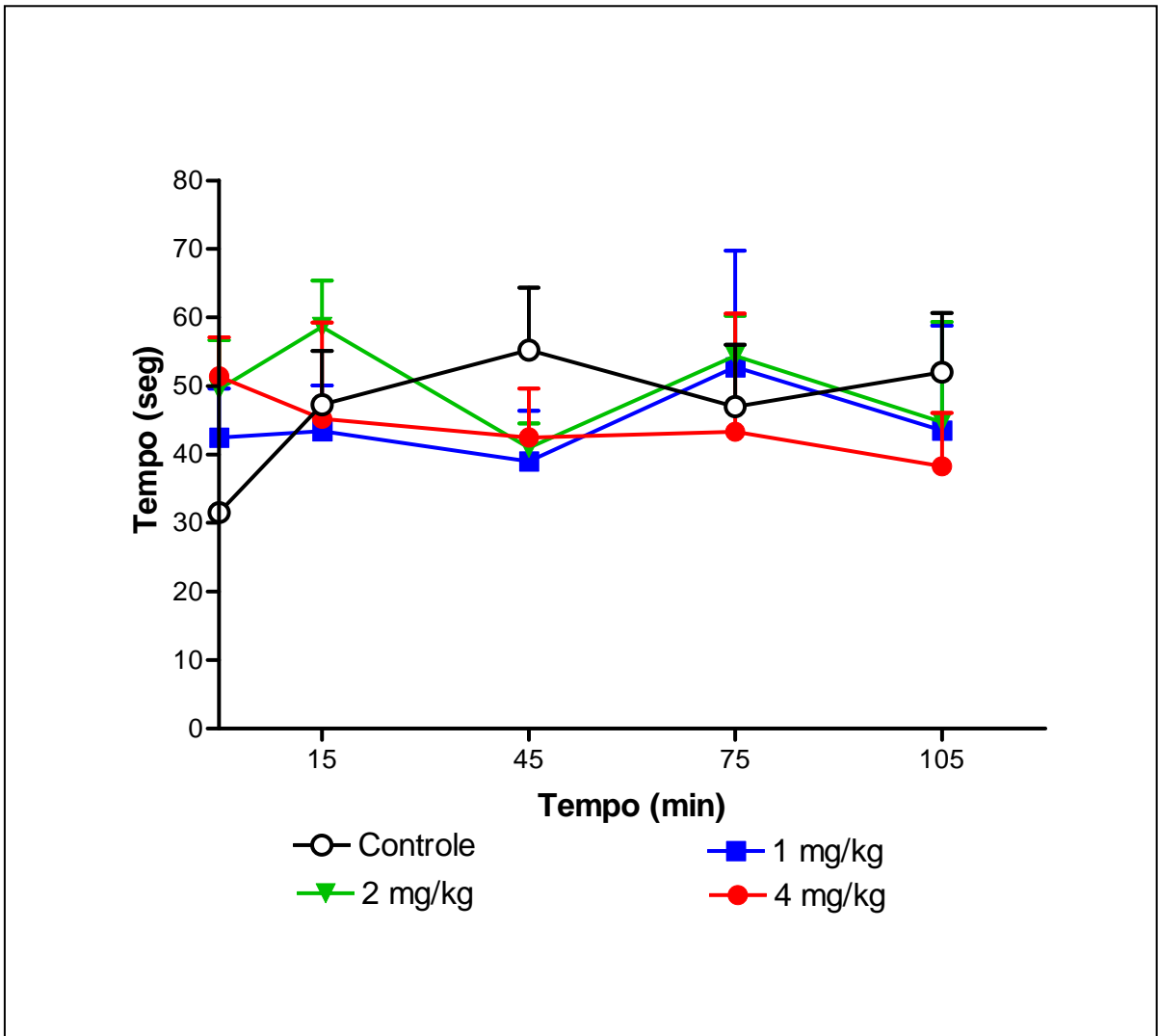
Foi observado que o tratamento com GABAP (6-54mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo ( $p < 0,0001$ ), indicando efeito analgésico. Em 75 minutos houve aumento de 187,50% nas doses de 6mg/kg ( $p < 0,001$ ), 18mg/kg ( $p < 0,001$ ) e 54mg/kg ( $p < 0,001$ ) comparado com o controle. Em 105 minutos houve aumento de 166,58% e 176,63% nas doses de 18mg/kg ( $p < 0,05$ ) e 54mg/kg ( $p < 0,05$ ) respectivamente comparados ao grupo controle (Figura 21).

### **4.3.4 Indometacina (INDO)**

Foi observado que o tratamento com INDO (1-4mg/kg) não demonstrou atividade analgésica nesse modelo comparado ao grupo controle (Figura 22).



**Figura 21 - Efeito do anticonvulsivante gabapentina (GABAP) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina (1mg/kg).** Oxaliplatina (1mg/kg, n=6) foi administrada por via EV durante 4 semanas. Cada animal recebeu oito injeções. GABAP (6mg/kg, 18mg/kg e 54mg/kg; n=6) ou veiculo (Controle, n=6) foram administrados por VO durante 4 semanas. O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda cauda a 10°C) foi realizado durante 105 minutos em intervalos de 30 minutos. Os pontos representam a média ± EPM do tempo de retirada da cauda em segundos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\* p<0.05 e \*\*\*p<0,001; ANOVA e teste de Bonferroni).

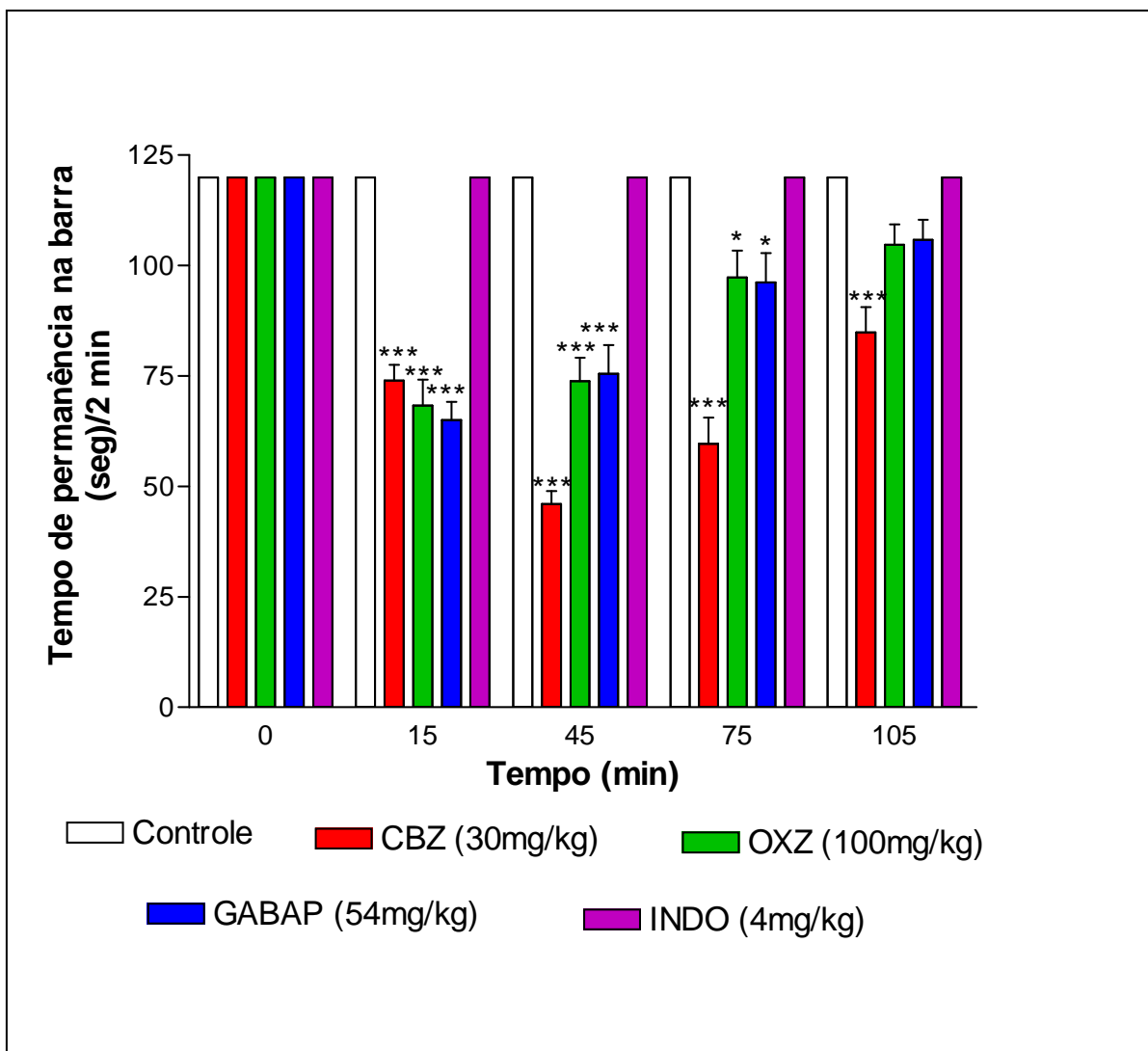


**Figura 22 - Efeito do anticonvulsivante indometacina (INDO) sobre a neuropatia sensitiva periférica já instalada induzida por oxaliplatina (1mg/kg).** Oxaliplatina (1mg/kg, n=6) foi administrada por via EV durante 4 semanas. Cada animal recebeu oito injeções. INDO (1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg; n=6) ou veiculo (Controle, n=6) foram administrados por IP durante 4 semanas. O teste nociceptivo (teste de imersão da cauda a 10°C) foi realizado durante 105 minutos em intervalos de 30 minutos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM do tempo de retirada da cauda em segundos. Não houve significância estatística (ANOVA e teste de Bonferroni).

#### **4.3.5 Estudo da atividade motora forçada, locomoção e equilíbrio analisando o efeito dos fármacos analgésicos**

Foi realizado o teste de Rota Rod com 5,5 RPM entre o grupo controle e os grupos com de diferentes fármacos nas maiores doses administradas: CBZ (30mg/kg, VO), OZP (100mg/kg, VO), GABAP (54mg/kg, VO) e INDO (4mg/kg, IP), cada animal recebeu oito injeções de OXL (1mg/kg, EV).

A partir de 15 minutos foi observada variação significativa entre o grupo de CBZ ( $p < 0,001$ ) e o grupo controle. Em 75 min foi observada variação significativa entre o grupo de OXZ ( $p < 0,05$ ) e GABAP ( $p < 0,05$ ) e o grupo controle como mostra a figura 23.



**Figura 23 - Avaliação do efeito da carbamazepina, oxcarbazepina, gabapentina e indometacina sobre a coordenação motora e equilíbrio de camundongos tratados com oxaliplatina no teste do Rota Rod.** Inicialmente cada animal recebeu oito injeções de oxaliplatina (1mg/kg, EV). No dia do teste do Rota Rod veículo (controle) ou carbamazepina (30mg/kg, VO); oxcarbazepina (100mg/kg, VO); gabapentina (54mg/kg, VO) ou indometacina (4mg/kg, IP) foram administrados com uma única injeção nas doses citadas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo dos animais no aparelho de Rota Rod durante 2 minutos. Foram utilizados 6 animais por grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle (\*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ; ANOVA e teste de Bonferroni).

#### **4.4 Análise histopatológica da pele das patas traseiras**

Foi analisado a nível macroscópico e a nível microscópico (através de análise histopatológica) se haveria alguma alteração morfológica. Porém nenhuma diferença foi constatada, não foram observados sinais inflamatórios, nem áreas de necrose e, também nenhuma alteração do tecido conjuntivo, epitelial e nem alterações de receptores sensoriais, visíveis ao microscópio óptico, como corpúsculo de Meissner ou de Paccini (Figura 24)

#### **4.5 Análise de mediadores periféricos por imunohistoquímica**

Como outro passo foi investigado a possível participação de neuropeptídios, receptores e mediadores inflamatórios que poderiam estar presentes e atuando a nível periférico, através da análise por imunohistoquímica.

Após as administrações de OXL (1mg/kg, EV) foi realizado o sacrifício dos animais seguindo os esquemas cronológicos de 24h, 7, 14, 21 e 28 dias e a retirada da pele das patas traseiras para parafinização e posterior realização de imunohistoquímica para neuropeptídeos como SP e CGRP, receptores periféricos do tipo NMDA e VR1 além do principal mediador inflamatório, a citocina TNF.

A imunohistoquímica demonstrou que houve um aumento da expressão dos mediadores CGRP, SP e NMDA, o que não foi observado com TNF e VR1.

Ao analisar a imunohistoquímica com o anticorpo CGRP da pele das patas traseiras dos camundongos tratados com OXL observou-se que houve um aumento da expressão a partir de 24h atingindo o pico máximo em 7 dias, regredindo até o 28º dia quando comparado ao grupo controle (Figura 25).

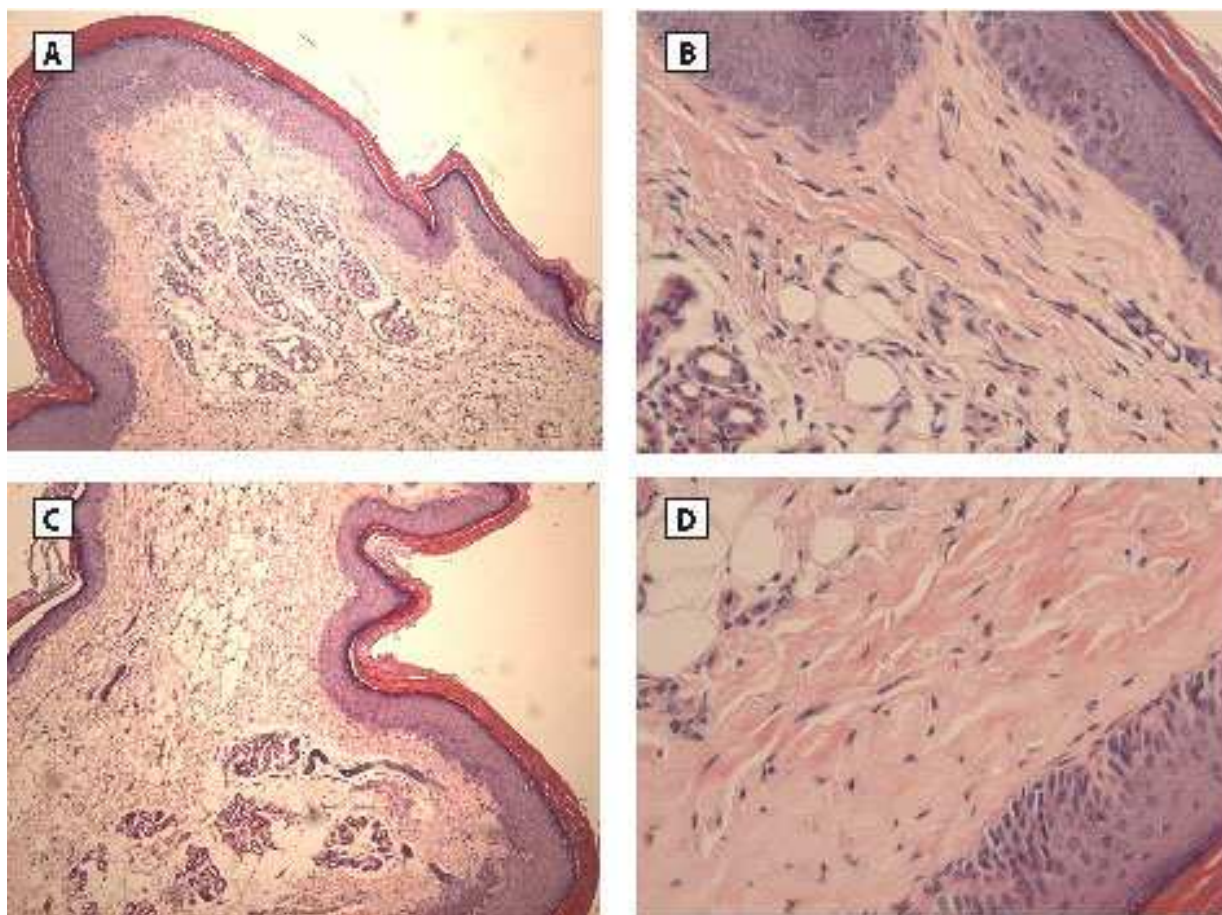
Na imunohistoquímica para SP da pele das patas traseiras dos camundongos tratados com OXL observou-se que houve expressão a partir de 24h atingindo o pico máximo em 7 e 14 dias, regredindo até o 28º dia quando comparado ao grupo controle (Figura 26).

Ao analisar a imunohistoquímica com o anticorpo NMDA da pele das patas traseiras dos camundongos tratados com OXL observou-se leve expressão em 7

dias atingindo o máximo em 21 dias, regredindo até o 28º dia quando comparado ao grupo controle (Figura 27).

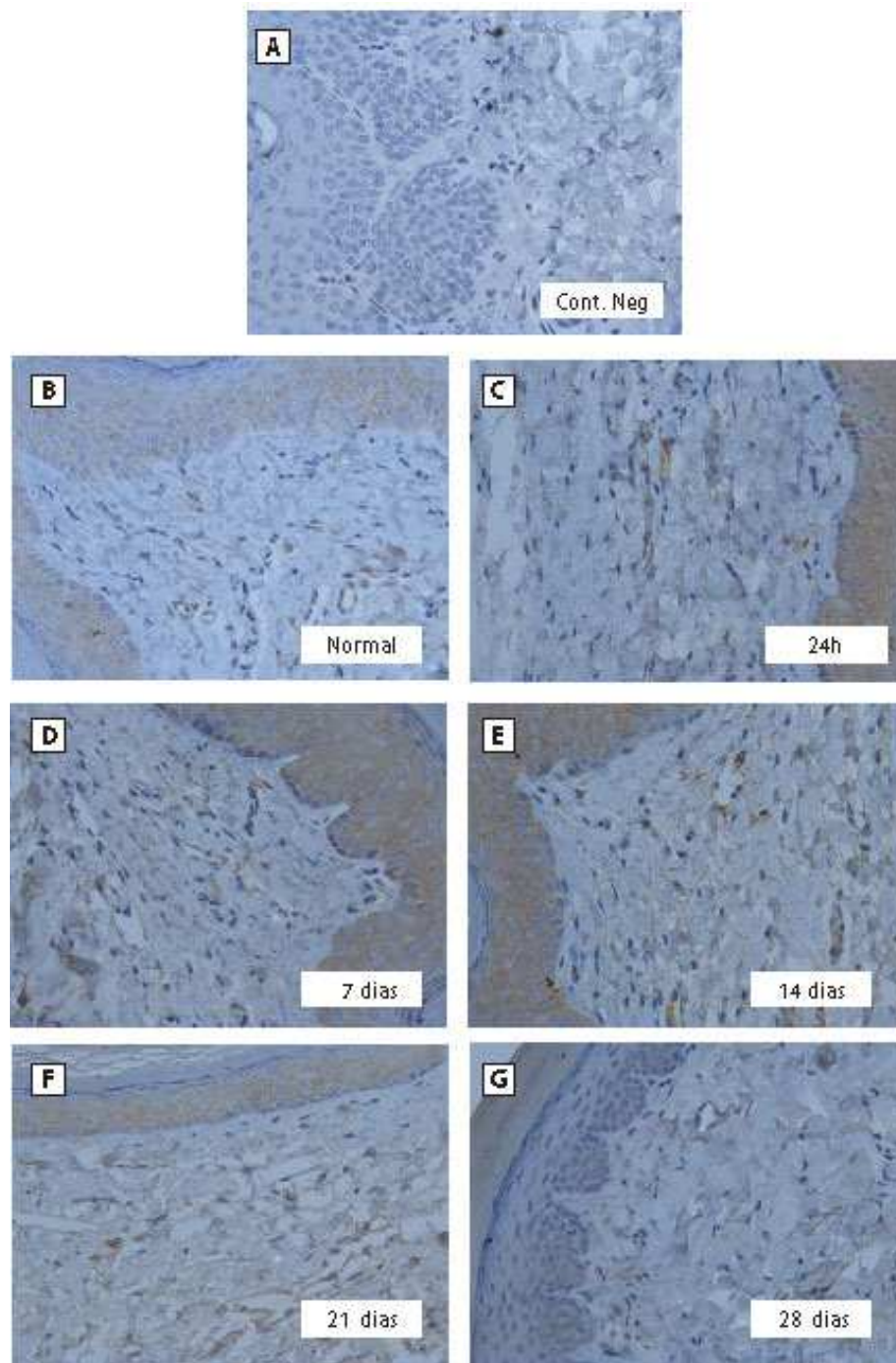
Já ao analisar os anticorpos TNF e VR1 não houve alteração da expressão quando comparado ao grupo controle, como observado nas figuras 28 e 29 respectivamente.

Foi realizada, também, a imunomarcção para nitrotirosina, onde houve somente discreto aumento a partir do 7º dia até o 21º quando comparado ao grupo controle, sendo observado principalmente em células da derme (Figura 30).

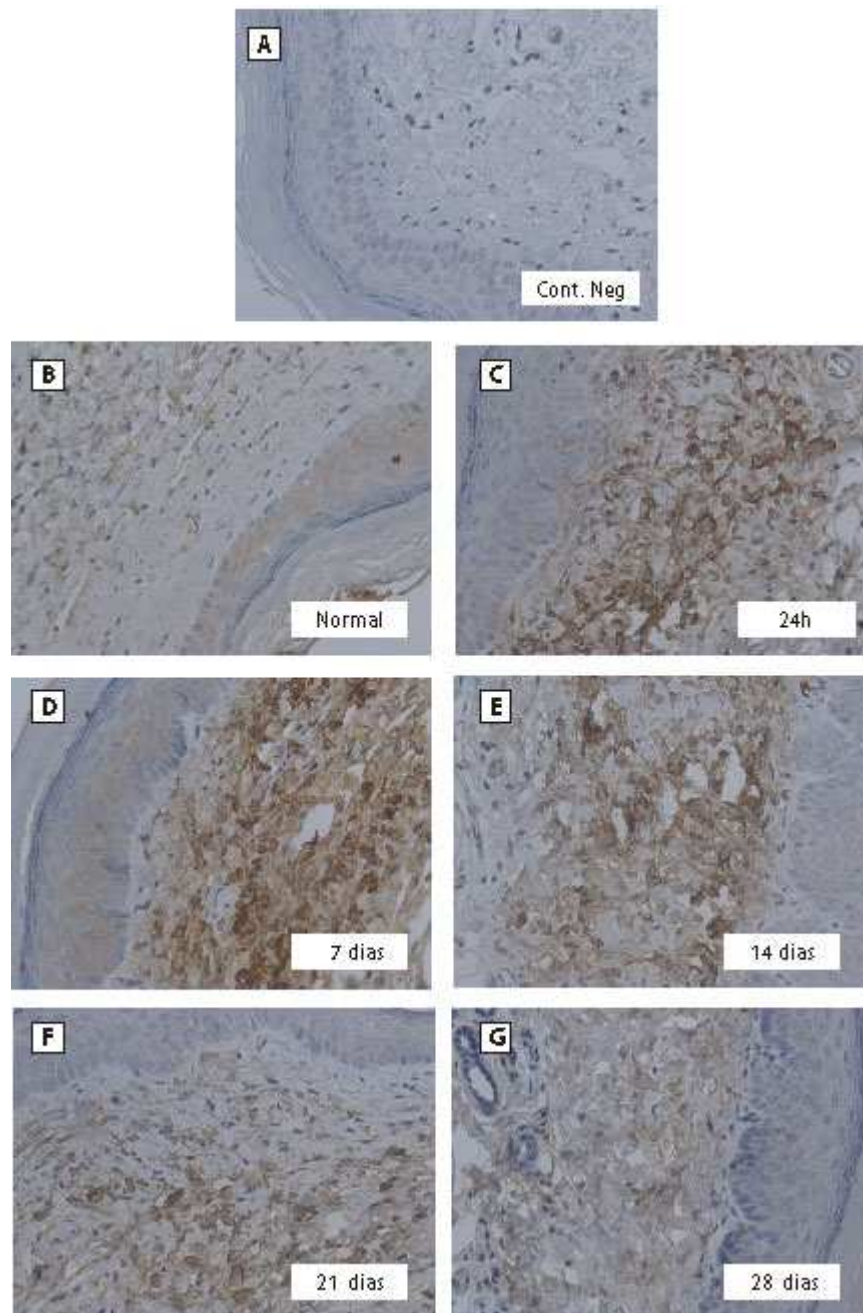


**Figura 24. Análise histopatológica de pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina.** A e B: Controle Normal; C e D: Oxaliplatina (1 mg/kg), após as 8 injeções. Não houve diferenças entre o grupo controle e o tratado com oxaliplatina. Coloração hematoxilina-eosina (painéis A e C 100x; painéis B e D 400x).

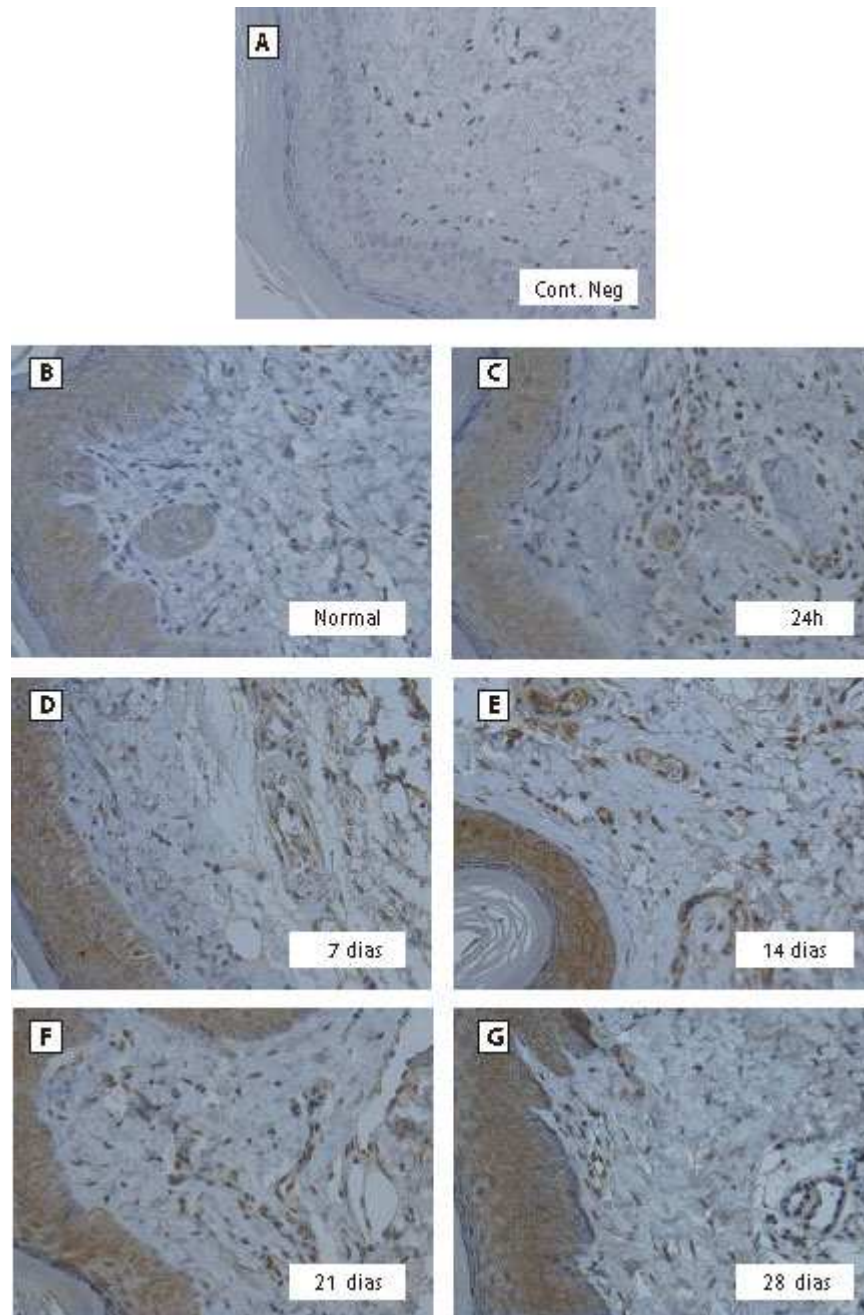




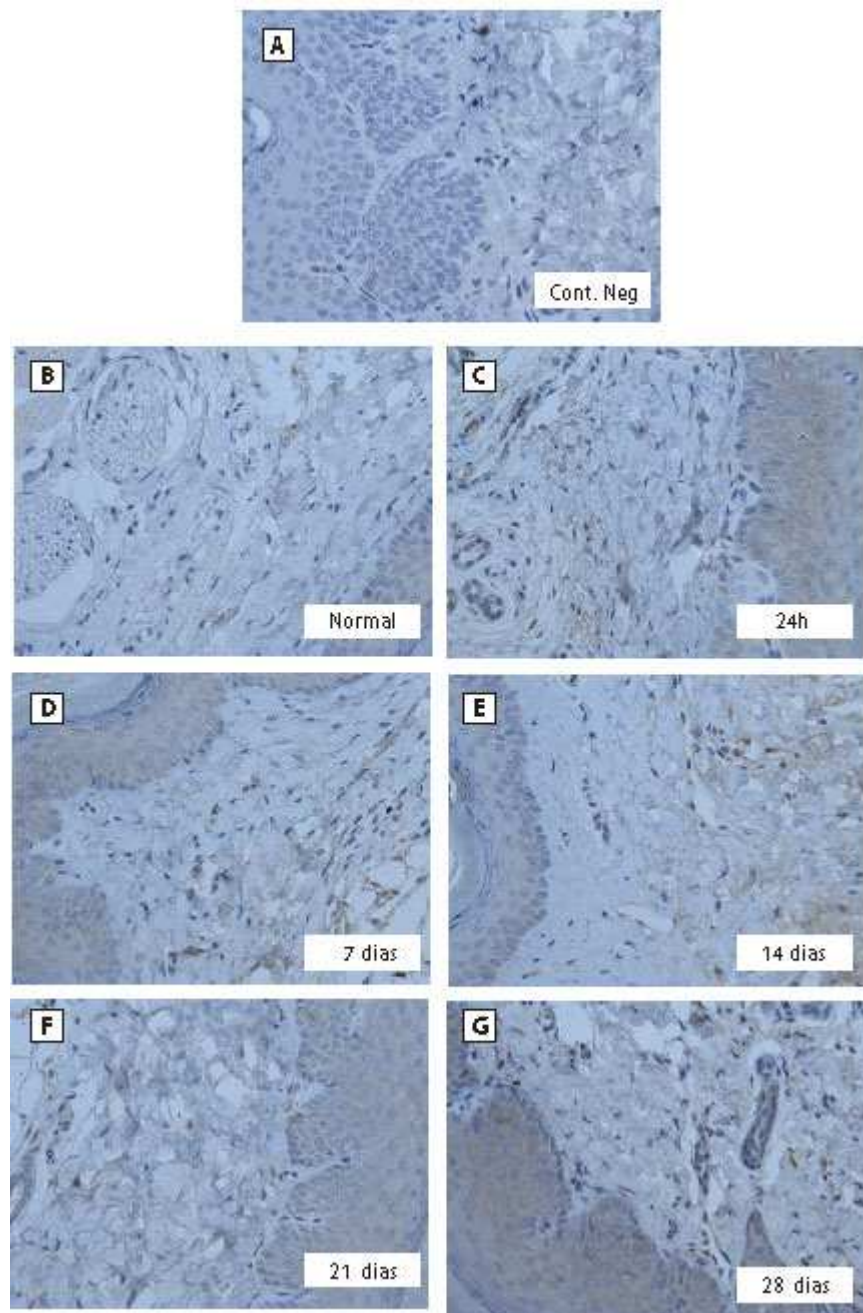
**Figura 25. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para CGRP em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina.** Os animais foram tratados com oxalipaltina (OXL; 1 mg/kg; EV), a cada semana e foi retirada da pele das patas traseiras para realização de imunohistoquímica, seguindo o esquema cronológico de 24h, 7,14 21 e 28 dias. O protocolo de 2 injeções por semana foi seguido, com exceção do grupo 24h que recebeu apenas 1 injeção 24h antes da eutanásia. A: Controle negativo (Cont. Neg) pele da pata colhida com 7 dias de animais injetados com OXL na ausência do anticorpo primário. B: O grupo controle (normal) recebeu o veículo. C a G: O restante das fotos são animais injetados com OXL e estão indicadas com os respectivos dias de coleta (400x).



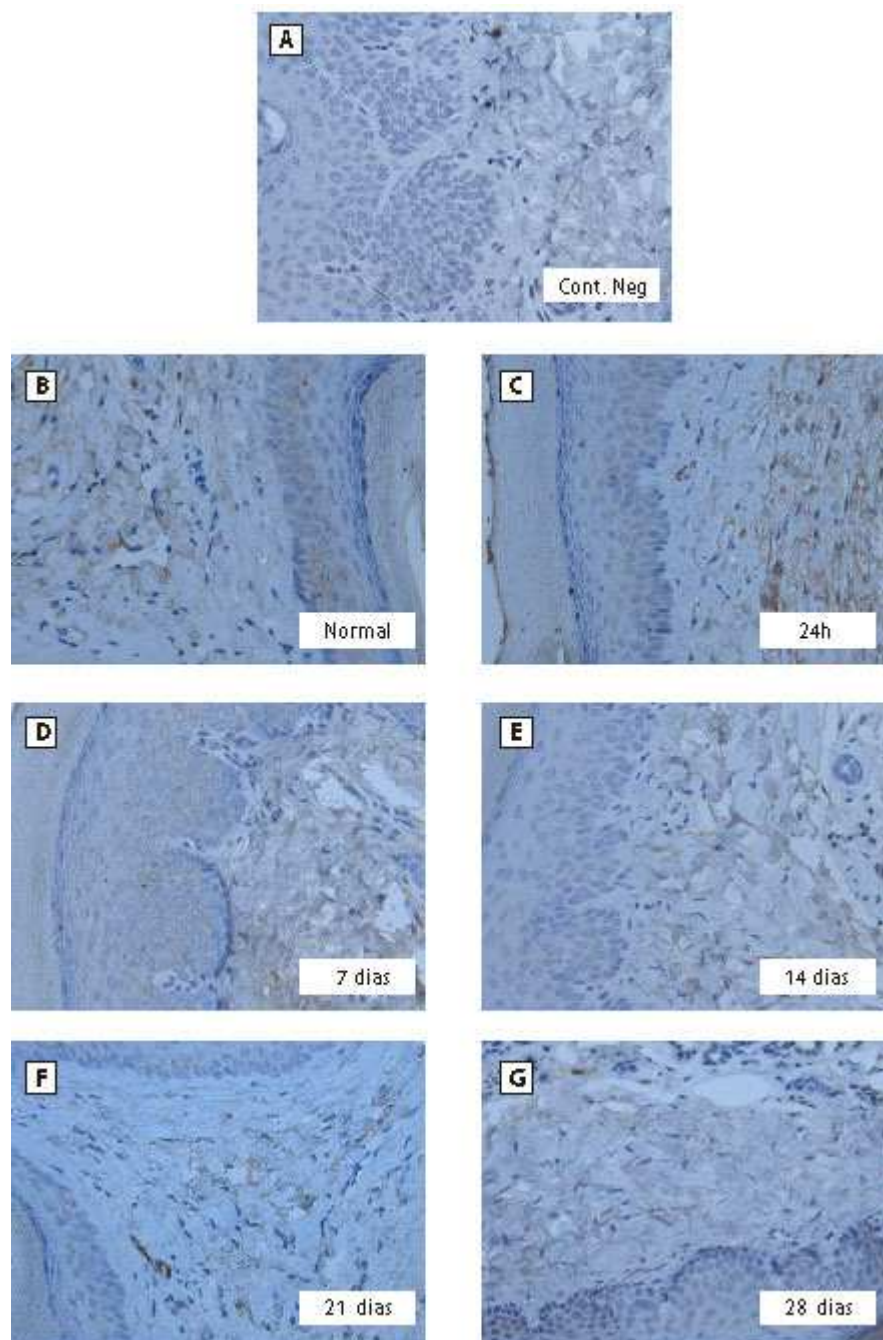
**Figura 26. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para SP em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina.** Os animais foram tratados com oxaliplatina (OXL; 1 mg/kg; EV), a cada semana e foi retirada da pele das patas traseiras para realização de imunohistoquímica, seguindo o esquema cronológico de 24h, 7,14 21 e 28 dias. O protocolo de 2 injeções por semana foi seguido, com exceção do grupo 24h que recebeu apenas 1 injeção 24h antes da eutanásia. A: Controle negativo (Cont. Neg) pele da pata colhida com 7 dias de animais injetados com OXL na ausência do anticorpo primário. B: O grupo controle (normal) recebeu o veiculo. C a G: O restante das fotos são animais injetados com OXL e estão indicadas com os respectivos dias de coleta (400x).



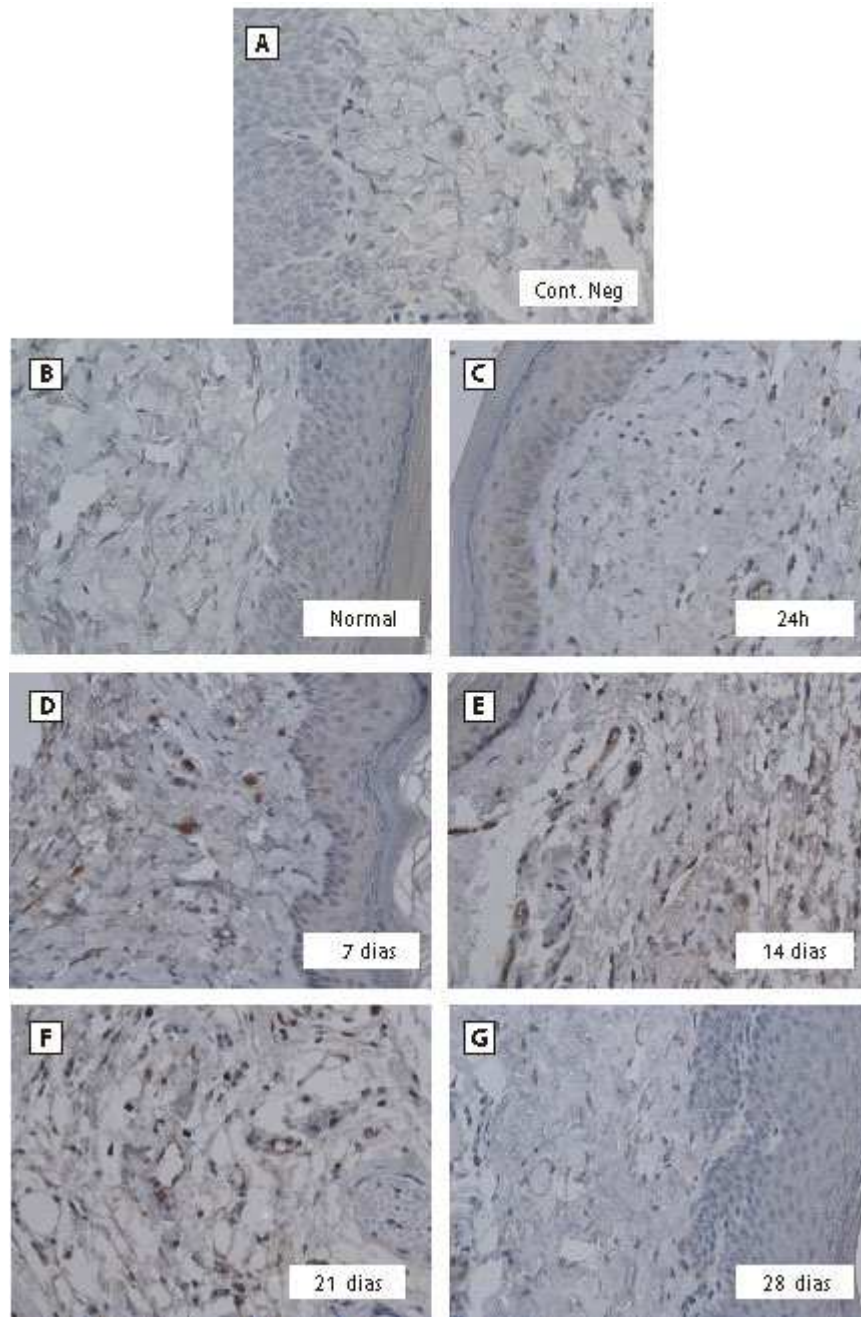
**Figura 27. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para NMDAR em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina.** Os animais foram tratados com oxaliplatina (OXL; 1 mg/kg; EV), a cada semana e foi retirada da pele das patas traseiras para realização de imunohistoquímica, seguindo o esquema cronológico de 24h, 7, 14, 21 e 28 dias. O protocolo de 2 injeções por semana foi seguido, com exceção do grupo 24h que recebeu apenas 1 injeção 24h antes da eutanásia. A: Controle negativo (Cont. Neg) pele da pata colhida com 7 dias de animais injetados com OXL na ausência do anticorpo primário. B: O grupo controle (normal) recebeu o veículo. C a G: O restante das fotos são animais injetados com OXL e estão indicadas com os respectivos dias de coleta (400x).



**Figura 28. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para TNF em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina.** Os animais foram tratados com oxaliplatina (OXL; 1 mg/kg; EV), a cada semana e foi retirada da pele das patas traseiras para realização de imunohistoquímica, seguindo o esquema cronológico de 24h, 7,14 21 e 28 dias. O protocolo de 2 injeções por semana foi seguido, com exceção do grupo 24h que recebeu apenas 1 injeção 24h antes da eutanásia. A: Controle negativo (Cont. Neg) pele da pata colhida com 7 dias de animais injetados com OXL na ausência do anticorpo primário. B: O grupo controle (normal) recebeu o veículo. C a G: O restante das fotos são animais injetados com OXL e estão indicadas com os respectivos dias de coleta (400x).



**Figura 29. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para VR1 em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina.** Os animais foram tratados com oxaliplatina (OXL; 1 mg/kg; EV), a cada semana e foi retirada da pele das patas traseiras para realização de imunohistoquímica, seguindo o esquema cronológico de 24h, 7,14 21 e 28 dias. O protocolo de 2 injeções por semana foi seguido, com exceção do grupo 24h que recebeu apenas 1 injeção 24h antes da eutanásia. A: Controle negativo (Cont. Neg) pele da pata colhida com 7 dias de animais injetados com OXL na ausência do anticorpo primário. B: O grupo controle (normal) recebeu o veículo. C a G: O restante das fotos são animais injetados com OXL e estão indicadas com os respectivos dias de coleta (400x).



**Figura 30. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica para nitrotirosina em pele de pata de camundongos submetidos ao tratamento com oxaliplatina.** Os animais foram tratados com oxaliplatina (OXL; 1 mg/kg; EV), a cada semana e foi retirada da pele das patas traseiras para realização de imunohistoquímica, seguindo o esquema cronológico de 24h, 7,14 21 e 28 dias. O protocolo de 2 injeções por semana foi seguido, com exceção do grupo 24h que recebeu apenas 1 injeção 24h antes da eutanásia. A: Controle negativo (Cont. Neg) pele da pata colhida com 7 dias de animais injetados com OXL na ausência do anticorpo primário. B: O grupo controle (normal) recebeu o veículo. C a G: O restante das fotos são animais injetados com OXL e estão indicadas com os respectivos dias de coleta (400x).

**DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Desde 1960, uma grande quantidade de análogos Pt tem sido sintetizada com o intuito de aumentar a atividade antitumoral ou prevenção do câncer, como por exemplo a cisplatina, carboplatina e OXL.

Marshall (2004) cita que especificamente a OXL (trans-1-diaminociclohexano-L-OH) foi desenvolvida em 1970 como uma das dezenas de 1,2-DAOH composto Pt. Testes clínicos mais de uma década depois revelaram sua magnífica atividade antitumoral.

A OXL é a terceira geração de agentes Pt tendo demonstrado um amplo espectro de atividade antitumoral e toxicidade diferente da cisplatina e das drogas de segunda geração como carboplatina. Por se distribuir em todas as células dos tecidos, exibe uma potente atividade citotóxica em linhas de células cancerosas humanas, incluindo câncer colorretal, ovariano e pulmonar.

A toxicidade da OXL difere de outros compostos Pt, dentre eles está o laringoespasma, náuseas, vômitos, diarreia, reações de hipersensibilidade, fadiga, fibrose pulmonar e neuropatia periférica, que é objeto desse estudo.

Drogas quimioterápicas como paclitaxel, cisplatina, vincristina e OXL são conhecidas por ter como principal efeito adverso a ocorrência de neuropatias periféricas. Nesse sentido, diversos autores vêm demonstrando esses efeitos através de modelos experimentais animais no intuito de estudar o mecanismo pelo qual esses efeitos aparecem. Segundo Peltier e Russell (2002), a respeito da neuropatia por vincristina e por paclitaxel já estão bem documentados na literatura modelos desenvolvidos para o seu estudo. No entanto, a neuropatia induzida por OXL ainda é pouco estudada a nível experimental e existindo poucos modelos animais para o estudo.

A neurotoxicidade da OXL pode se manifestar em duas síndromes distintas, uma síndrome aguda e transitória que pode aparecer durante ou após a infusão do quimioterápico e uma síndrome de neuropatia periférica sensorial DLT.

A neurotoxicidade aguda e transiente observada com a administração de OXL, nos estudos de Saif e Reardon (2005), ocorre rotineiramente em muitos pacientes e consiste de uma toxicidade de início rápido ocorrendo nas primeiras



horas de infusão. Os sintomas são peculiares e geralmente são induzidos ou agravados pela exposição ao frio. Pode haver manifestações de toxicidade motora e sensitiva. As sensitivas incluem parestesias e/ou disestesias nas extremidades distais e/ou região perioral. Cerca de 1 a 2% dos pacientes experimentam uma disestesia laringofaríngea, causando a sensação de dificuldade respiratória. Alguns sintomas motores, mais raramente, podem acompanhar os sintomas sensitivos como espasmos tetânicos, fasciculações e contrações musculares prolongadas. Os sintomas são parecidos com os observados para cisplatina, entretanto a ototoxicidade parece ser rara com a OXL. Geralmente persistem entre os ciclos de quimioterapia e aumentam de intensidade com doses cumulativas. Alguns sintomas motores podem ocorrer como ataxia sensorial e déficit na coordenação motora sensitiva.

Assim para Hwang (2004), uma síndrome aguda consiste também em parestesia perioral e distal, disestesia faringolaríngea que com a suspensão da OXL esses sintomas são revertidos em poucas horas ou dias. Já a forma crônica é puramente sensorial, neuropatia axonal como a NSP e altas doses de OXL que são fortemente associadas com a ocorrência de dano neural. Os sintomas da síndrome crônica podem ser severos a ponto de limitar a realização de atividades diárias pelos pacientes.

Recentemente foi publicado um trabalho de Ling et al. (2007a), onde se desenvolveu um modelo de neuropatia sensitiva induzido por OXL em ratos. Esse modelo avaliou o comportamento de animais recebendo um tratamento crônico com OXL mediante a estímulos mecânicos e térmicos, assim como o efeito de drogas comumente utilizadas em doenças neuropáticas como CBZ, GABAP, anestésicos locais, cálcio e magnésio.

De posse desses dados da literatura, achamos que seria válido também criar um modelo experimental para o estudo da neuropatia por OXL em camundongos, visto que são a espécie mais utilizada no desenvolvimento de animais geneticamente modificados. Além disso, modelos experimentais com camundongos são mais econômicos, tanto no que diz respeito à quantidade de drogas e reagentes gastos no estudo, quanto aos gastos com a manutenção dos animais. Nesse sentido, desenvolvemos um modelo de NSP por OXL em camundongos, baseando-se no modelo descrito na literatura para ratos de Ling et al. (2007a).

Alguns fatores tornaram essa pesquisa dispendiosa como, por exemplo, o elevado custo da droga, o número de animais necessários para cada grupo experimental, já que o fenômeno estudado é de difícil avaliação devido ao caráter subjetivo e por ser fenômeno doloroso crônico (dias-semanas). Estas dificuldades iniciais foram superadas, visto que a grande maioria dos trabalhos usa ratos ao invés de camundongos, fato que levou a trabalhar com doses bem menores facilitando a condição da pesquisa.

Muitos estudos clínicos e investigações epidemiológicas usam machos ao invés de fêmeas devido às respostas comportamentais. Devido a estes fatos, decidimos utilizar camundongos machos nos experimentos.

Sabe-se que a NSP de camundongos apresenta semelhanças com a de humanos, podendo, portanto, ser utilizada em estudos experimentais. Em geral, ao término da pesquisa, nenhuma deterioração clínica foi observada nos animais, nem na pele, pelos e cauda.

Antes da primeira administração de OXL nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados e o controle. Após a nona administração de OXL dois camundongos morreram um no grupo controle e outro na dose de 1mg/kg nos testes térmicos após dose acumulada de 36mg/kg. Semelhantemente nos estudos de Ling et al. (2007a) dois ratos morreram depois da oitava injeção (EV) de OXL e dois ratos morreram depois da nona no grupo da dose de 4mg/kg quando acumulou a dose de 32mg/kg. Doses mais altas no estudo de Cavaletti et al. (2001) que injetou (IP) 2-3mg/kg duas vezes por semana, onde três animais morreram durante os experimentos.

Três hipóteses primárias para as causas da NSP foram propostas: nos estudos de fase I de Wilson et al. (2002) através do estudo da condução nervosa e eletromiografia (EMG), no de Grolleau et al. (2001) que sugeriram indução por hipersensibilidade nervosa, ou por impacto de canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependente ou por quelação de  $\text{Ca}^{+2}$  e Luo, Wyrick e Chaney (1999) que propuseram a teoria por agregação de Pt no DRG.

Freudenrich (2007) ressalta que as vias ascendentes da dor na medula espinhal dorsal podem ser disparados pela dor neuropática induzida por danos aos nervos periféricos, espinha dorsal e o próprio cérebro. Contudo, a extensão do dano pode limitar a reação das vias descendentes do cérebro. No caso de dores crônicas, que persiste um mês além da evolução habitual de uma lesão, Caillet (1999) atribui

os mecanismos periféricos responsáveis à persistência do fenômeno. Argumento evidenciado em nosso estudo visto que as respostas aos testes deram significância estatística mesmo após um mês de administração de OXL.

Ta, Low e Windebank (2009) explicam que os modelos em camundongos também podem ser úteis em mostrar as terapêuticas para tratar dor neuropática. Contudo os animais responderam significativamente ao estímulo frio e mecânico. Essa alteração comportamental é semelhante à resposta observada nos pacientes tratados com OXL.

Schmoll (2002) esclarece quanto às características clínicas e eletrofisiológicas que a OXL causa um espectro raro de toxicidades neurológicas agudas que não foram observadas em pacientes recebendo cisplatina nem carboplatina. Os sinais e sintomas podem começar durante a infusão ou dentro de 1–2 dias de administração de OXL. Clinicamente, o autor complementa dizendo que alterações sensoriais são mais proeminentes, particularmente induzidas pelo frio e parestesias perioral. Pode haver respiração curta ou dificuldade em engolir, mas sem qualquer evidência objetiva de angústia respiratória.

Dados clínicos de estudos de Machover et al. (1996) envolvendo mais de 1000 pacientes mostraram que a incidência de NSP induzida por OXL aguda é muito alta. Nesses estudos, OXL foi administrada em várias doses variando de 85 a 130 mg/m<sup>2</sup>, enquanto a severidade de NSP induzida por OXL foi classificada pelo CTCINC como a neuropatia periférica induzida por OXL aguda ocorrendo na maioria dos pacientes tratados, com índices de incidência, variando de 65% a 98% (a incidência de NSP induzida por OXL crônica normalmente é relacionado a vários fatores de risco, inclusive horário de tratamento, única dose por curso, dose cumulativa, tempo de infusão e neuropatia periférica preexistente).

De Gramont et al. (2000) ressaltam que a NSP induzida por OXL também pode ser desencadeada por cirurgia. O nível 3 de toxicidade neurosensorial ocorreu em 18,2% pacientes selecionados aleatoriamente. Toxicidade total de alteração neurosensitiva foi observada em 68% destes pacientes. A incidência de nível 2 e 3 de neuropatia, respectivamente, calculada para pacientes expostos a OXL, alcançou 10% depois de 3 e 9 ciclos, 25% depois de 8 e 12 ciclos e 50% depois de 10 e 14 ciclos. Isto pode ser atribuído à acumulação de doses de OXL, desde que é documentado que em doses cumulativas que alcançam 800 mg/m<sup>2</sup>, a ocorrência de NSP induzida por OXL é altamente possível, enquanto severamente (classificação 3)

de NSP induzida por OXL ocorreu em 15% depois de doses cumulativas de 750–850 mg/m<sup>2</sup> e 50% depois de uma dose total de 1170 mg/m<sup>2</sup>.

No estudo de Andre et al. (2004) o FOLFOX6 induziu neurotoxicidade envolvendo 94% dos pacientes com 20% de casos nos níveis 3 e 4. No cenário de adjuvantes, resultados de um teste mosaico envolvendo um total de 2246 pacientes com etapa II ou III de câncer de cólon mostrou que em pacientes atribuídos ao FOLFOX4, a incidência de nível 3 de neuropatia sensorial foi de 12,4% durante o tratamento, diminuindo a 1,1% em 1 ano; classificação 2 de neuropatia foi de 31,5% durante tratamento, diminuindo 5% em 1 ano e classificação 1 de neuropatia foi de 48,1% durante o tratamento, diminuindo a 24% em 1 ano. Esse estudo mostrou que o índice informado (64%) de pacientes que manifestaram NSP induzida por OXL depois da administração do regime de FOLFOX4 ser bastante semelhante ao que foi previamente informado em vários estudos.

Andre et al. (2004), como em outras publicações prévias, afirmam ainda que a maioria desses pacientes experimentou suave ou moderada (classificação 1 ou 2) NSP induzida por OXL. O nível 3 de neurotoxicidade foi observado em 8% dos pacientes, um índice bastante semelhante ao que foi observado no teste do tipo mosaico, enquanto foi mais baixo que o observado em outros estudos. Diferenças na natureza dos estudos e a metodologia aplicada podem explicar as discrepâncias entre os resultados. A maioria de todos os outros estudos avaliou a eficácia, tolerabilidade geral e perfil de segurança do FOLFOX4. Nesse estudo foi focalizado fazer o controle neurológico da NSP induzida por OXL, baseado em escalas clínicas validadas e gravações longitudinais de eletrofisiologia.

Em um estudo envolvendo 214 pacientes com câncer colorretal metastático, nível 3 e 4 de neuropatia, Kemeny et al. (2004) apresentaram a ocorrência só em 6% de pacientes designados a serem tratados com o regime de FOLFOX4. O índice de sintomas sensoriais totais foi de 82% (65% de qualquer neuropatia aguda e 57% de neuropatia cumulativa). A neuropatia persistente (durando acima de 14 dias) se classificam em 2 ou 3 foi visto em 18% e 3% no grupo FOLFOX4. Depois que a exposição ao regime de FOLFOX6, nível 3 e 4 de NSP foi observado em 16% do total de 60 casos. Por causa dessa e de outras toxicidades, só 36% desses pacientes receberam igual ou acima de 90% da dose-intensidade. O mesmo grupo informou subseqüentemente que 97% dos pacientes apresentaram neurotoxicidade

depois da administração do FOLFOX7. Nesse levantamento em estudo em humanos pode-se observar a importância clínica da OXL em induzir a NSP.

Visto que os sintomas são claramente apresentados nos estudos tanto em humanos como em animais buscou-se produzir um modelo que pudesse demonstrar resultados mais precisos para que na terapêutica clínica os pacientes pudessem realizar a terapia completa com uso da OXL sem que com isso acarretasse em NSP.

No presente trabalho foi avaliada principalmente a síndrome crônica de neuropatia periférica, já que esta pode limitar a continuação do esquema quimioterápico e é mais difícil de prevenir do que a síndrome aguda, como foi exposto anteriormente. Com a administração semanal de OXL (2 vezes por semana) pudemos observar um aumento cumulativo da sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos, ou seja, que iam aumentando de intensidade conforme os ciclos de injeções iam se repetindo. Dessa forma observou-se um desenvolvimento de hiperalgesia e alodínia tanto por estímulos térmicos como mecânicos.

Para Millan (1999) o estudo da NSP é o estudo da alodínia que é um sintoma típico das alterações sensitivas observadas nas neuropatias periféricas juntamente com as disestesias e parestesias sendo descrita como dor a um estímulo que normalmente não provoca dor.

A demonstração de alodínia e de hiperalgesia mecânica vem sendo realizada comumente pelo teste com filamentos de Von Frey, onde o animal é colocado e mantido sobre uma superfície vazada, tipo grade e filamentos de diversos calibres são empurrados contra a superfície plantar das patas traseiras até que o animal retire a pata e realize o movimento característico de sacudida ou *flinch* acompanhado ou não de lambedura da mesma, como citado por Von Frey (1896), Kim e Chung (1992), Omote et al. (2001) e Sousa e Prado (2001).

No presente estudo realizamos os testes de hiperalgesia e alodínia mecânicos com o Von Frey eletrônico, visto que diferente do Von Frey filamentos, o Von Frey eletrônico realiza o mesmo procedimento, entretanto o experimentador não precisa fazer a troca de filamentos de calibres diferentes, pois o aparelho registra os diversos níveis de pressão como uma força em gramas que aparece no visor do aparelho assim que o animal retira a pata em contato com o sensor. Cabe ao experimentador interpretar se a retirada da pata foi uma reação de comportamento nociceptivo ou não, o que depende da forma como ele retira a pata. Em nosso

estudo o mesmo pesquisador realizou a avaliação desse teste em todas as fases dos experimentos.

Assim como no teste com filamentos, onde alguns filamentos são utilizados preferencialmente para avaliar alodínia, o Von Frey eletrônico ao registrar valores muito baixos como 1-4 g também pode servir como método de avaliação de alodínia mecânica como foi demonstrado em ratos por Möller, Johansson e Berg (1998) e Cunha et al. (2004) utilizando o aparelho Von Frey eletrônico (analgesímetro digital) demonstrou o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica inflamatória em camundongos.

Cunha e colaboradores (2004) mostraram que camundongos injetados com substâncias inflamatórias demonstraram um comportamento de hipernocicepção (conhecido clinicamente como hiperalgesia) a partir da primeira hora após a administração de carragenina ou de prostaglandina E<sub>2</sub>. Essas duas substâncias são classicamente conhecidas como indutoras de hipernocicepção/hiperalgesia em ratos e camundongos. Nos animais injetados o limiar de retirada da pata baixou 8 vezes a partir da 1ª hora. Foi constatado no nosso estudo que camundongos hígidos normalmente respondem a uma pressão em gramas em torno de 13 a 15 g, removendo a pata e geralmente realizando movimentos de *flinch* com lambertura. Após a administração de OXL esse limiar começa a baixar chegando a 1-4g nos últimos dias de experimentação.

A alodínia mecânica em ratos foi testada no estudo de Ling et al. (2007a) com os filamentos de Von Frey no qual houve diminuição máxima de -87% do limiar no grupo de 1mg/kg. Ainda citando Ling et al. (2007a) no teste de hiperalgesia mecânica os grupos de 2 e 4mg/kg tiveram redução máxima de -36% e -48% respectivamente comparados com o grupo controle. No nosso estudo, foi observado um aumento significativo no limiar nociceptivo a partir do 14º dia atingindo o máximo na dose de 2mg/kg, contudo houve aumento significativo também nas doses de 1mg/kg e 4mg/kg.

Ta, Low e Windebank (2009) concluíram que os ratos tratados com OXL exibiram hiperalgesia ao frio (-4,2°C) e mecânica (filamentos de Von Frey) como em nosso estudo. Leonard (2005) afirma que mais de 80% dos pacientes em sua pesquisa tratados com OXL desenvolveram hiperalgesia, dor e disestesia como observado nos animais.

Outro parâmetro que comumente é levado em consideração nos estudos envolvendo neuropatias sensitivas é a sensibilidade a estímulos térmicos. É rotineiro o uso de duas temperaturas distintas para avaliar os fenômenos de alodínia e hiperalgesia. Para Millan (1999) a hiperalgesia térmica normalmente é testada com temperaturas definidas como nocivas, ou seja, acima de 45°C ou abaixo de 5°C. Por outro lado, para testes de alodínia térmica são utilizadas temperaturas entre 40 e 44°C e entre 6 a 10°C por serem consideradas não nocivas.

Baseado nesses conceitos realizamos testes térmicos para avaliar o desenvolvimento de hiperalgesia e alodínia térmica em animais tratados cronicamente com OXL. As temperaturas utilizadas foram extraídas do trabalho de Authier et al. (2003) e Ling et al. (2007a). Inicialmente pensamos em utilizar o teste da placa quente para avaliar a hiperalgesia e alodínia, entretanto o teste apresentou alguns inconvenientes como o condicionamento dos animais (com a periodicidade dos experimentos os animais aprendiam a sair da placa saltando) e também por não ser permitido o teste em temperaturas frias.

Optamos, então, pelo teste de imersão da cauda que permite tanto o uso de estímulos quentes como frios. Assim ficou mais conveniente na hora de comparar qual tipo de estímulo térmico os animais tratados com OXL respondem com maior intensidade. Fizemos uma modificação do modelo original no qual os animais são imobilizados na mão do experimentador. Depois de fazermos várias tentativas de registro do limiar nociceptivo normal de cada animal com esse tipo de imobilização, percebemos que a imobilização pelo experimentador causa um certo desconforto ao animal que fica durante um bom tempo tentando fugir, causando reações falso-positivas. Decidimos lançar mão de um outro método de imobilização utilizando um contensor de acrílico transparente. Com essa metodologia conseguimos realizar registros de limiar mais fidedignos e que se repetiam.

Observamos que com o contensor de acrílico os animais, depois de alguns minutos, se acostumavam e desistiam de tentar escapar ficando com a cauda imóvel, o que permitiu melhores resultados. As temperaturas foram constantemente mantidas e monitorizadas através do uso de caixas isolantes de isopôr e termômetros.

Tanto os testes térmicos quentes e frios, assim como o teste mecânico foram realizados em grupos de animais diferentes, de modo que cada animal foi submetido

somente a um tipo de teste, tentando minimizar o nível de estresse. Procuramos também evitar que os testes fossem feitos no mesmo dia das injeções de OXL.

Observando todos esses cuidados, bem como o local de experimentação silencioso e com exaustão e iluminação adequadas podemos garantir que nossos resultados são fidedignos e com o mínimo de variáveis possíveis para um experimento de comportamento.

De posse do registro do limiar nociceptivo de cada animal, para cada temperatura testada, foi observado que as doses cumulativas de OXL produzem um aumento da sensibilidade tanto para as temperaturas de hiperalgesia (4°C e 46°C) assim como para temperaturas não nocivas de alodínia (10°C e 42°C). Entretanto, analisando de uma forma mais comparativa entre essas temperaturas, observa-se que a intensidade das respostas foi mais significativa para as temperaturas de alodínia, principalmente a alodínia pelo frio.

Nesse sentido, a dose de OXL que demonstrou melhores resultados foi a de 1 mg/kg para os testes de alodínia e hiperalgesia térmicos pelo frio e a de 2mg/kg nos testes de hiperalgesia mecânica.

Em um estudo agudo, Ling et al. (2007b) mostraram que uma única injeção de OXL em ratos não desenvolve hipersensibilidade no teste de imersão da cauda em água a 46°C, entretanto desenvolvem hipersensibilidade ao frio a 4°C e 10°C. No estudo crônico de Ling et al. (2007a) em ratos uma rápida diminuição dos limiares nociceptivos ao frio (4°C) foi observada em todas as doses tratadas, com uma máxima redução do limiar nociceptivo de -89% depois da quarta ou sexta injeção. Em resposta aos estímulos quentes (42 e 46° C) uma máxima redução foi observada na dose de 2mg/kg depois da sexta a oitava injeção semelhante ao nosso modelo.

No teste de alodínia térmica foi observado uma diminuição significativa no limiar nociceptivo atingindo o máximo na dose de 1mg/kg comparado ao grupo controle nas temperaturas de 10 e 42°C. Também se notou uma redução significativa do limiar nociceptivo na dose de 1mg/kg que se mostrou estatisticamente diferente da dose de 2mg/kg na temperatura de 10°C. Resultado semelhante ao estudo de Joseph et al. (2008) onde houve redução significativa nos limiares de alodínia.

No teste de hiperalgesia térmica foi observado uma diminuição significativa no limiar nociceptivo atingindo o máximo na dose de 4mg/kg e 1mg/Kg em 4°C e na de 4mg/kg em 46°C comparados ao grupo controle. Ta, Low e Windebank (2009), no



modelo em ratos, mostraram diferenças de respostas dolorosas (térmicas e mecânicas). A DLT utilizada foi de 30mg/kg, diferente do nosso estudo que foi em camundongos com dose acumulada de 9 a 36mg/kg, porém essas diferenças nas respostas podem ser observadas em pacientes tratados com OXL.

Em estudo mais recente, Ta, Low e Windebank (2009) utilizando camundongos C57BL6J demonstraram o surgimento de hiperalgesia térmica para temperaturas altas e baixas com a dose cumulativa de 30mg/kg. Esse estudo comparou o efeito da OXL e cisplatina. Os mesmos autores observaram que OXL induz hiperalgesia ao frio que é mais intensa nas primeiras semanas e menos intensa nas últimas semanas, enquanto que os camundongos não desenvolvem hiperalgesia a estímulos quentes. Estranha foi a temperatura utilizada por esses autores (-4.2°C), a qual elícita nocicepção mesmo em animais hígidos. Ainda no mesmo trabalho os testes foram apenas de hiperalgesia térmica e alodínia mecânica onde a OXL demonstrou atividade apenas para estímulo frio e mecânico. Entretanto não foi realizado testes de alodínia térmica, o que normalmente é averiguado quando o estudo envolve dor neuropática, outro ponto também não discutido pelos autores.

Apesar de ser um trabalho de avaliação de neurotoxicidade da OXL em camundongos vários pontos diferem do nosso estudo, a começar (1) pelo tipo de camundongo: C57BL6J versus swiss; (2) via de administração: IP versus EV; (3) esquema de quimioterapia: dois ciclos de 5 injeções com intervalo de 5 dias versus 2 injeções por semana durante 4,5 semanas; (4) temperatura dos testes térmicos - 4.2°C x 4°C e 50°C x 46°C; (5) ausência da avaliação de alodínia pelo frio e quente. Os nossos resultados mostram que a OXL parece induzir com mais intensidade um quadro de alodínia do que hiperalgesia.

No que se referem ao comprometimento motor nossos dados mostram que OXL não alterou a função motora, o equilíbrio e a força nos animais tratados nem mesmo com a maior dose, demonstrado através do teste de Rota Rod. O Rota Rod é um equipamento que mede atividade motora demonstrando alterações de equilíbrio e coordenação e é utilizado para avaliar danos nos gânglios basais, cerebelo ou para avaliar efeito de drogas que afetam a função motora. Corroborando com nossos achados e utilizando outro tipo de teste, o teste de força de preensão (grip strenght test), Ling et al (2007a e b) demonstraram em ratos e Ta, Low e Windebank (2009) demonstraram em camundongos que a OXL não causa

impedimento da função motora pelo menos nas doses utilizadas por esses autores, sugerindo-se que a neurotoxicidade periférica da OXL parece ser primariamente em fibras sensitivas.

Na NSP induzida por OXL em ratos, Ling et al. (2007a), utilizaram a dose de 2mg/kg (IP) para os testes farmacológicos para testar drogas analgésicas. Os nossos resultados mostraram, entretanto, que a dose de 1mg/kg (EV) de OXL foi capaz de induzir a NSP em camundongos. De posse da dose da OXL de efeito máximo (1mg/kg) passamos a utilizá-la nos experimentos seguintes.

Como controle do estado clínico do animal, o peso corporal foi medido antes de cada administração de OXL e até o final dos testes onde não se observou diferença estatística entre o grupo controle e os grupos tratados. Fato semelhante foi constatado no estudo de Ling et al. (2007a) onde não houve diferença significativa entre os grupos com uma leve diminuição do peso nos grupos de 2mg/kg e 4mg/kg (-11% e -18% respectivamente). Como, também, os achados de Ta, Low e Windebank (2009) onde não houve diferença significativa no peso dos animais (ratos) tratados com OXL com DLT de 30mg/kg e cisplatina (DLT de 23mg/kg).

Contrariamente, Cavaletti et al. (2001) demonstrou que em ratos houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com 2,25 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e 3mg/kg ( $p < 0,001$ ) com decréscimo de peso ao final do experimento. Essa controvérsia entre os autores pode ser devido à diferença entre vias de administração da OXL. A via IP foi utilizada ao invés de EV. Em nosso estudo, por ser crônico demos preferência à via EV.

O tratamento dessa neurotoxicidade não é satisfatório e ainda é um desafio. Alguns casos persistem mesmo após sucessivas tentativas de tratamento e com o interrompimento da quimioterapia. São utilizadas na clínica atualmente as drogas anticonvulsivantes como CBZ, GABAP, OXZ, assim como também infusões de  $Ca^{2+}$  e magnésio antes da quimioterapia. Entretanto isso não é garantia de prevenção e nem cura desse efeito colateral da OXL.

Muitos fatores influenciam a resposta comportamental à dor incluindo as diferenças entre as espécies, a genética e o tipo de dor. A prática clínica é capaz de propor mudanças de estratégias para prevenir ou tratar neurotoxicidade induzida por OXL vias terapias de dor convencional como morfina, lidocaína, CBZ, GABAP, clomipramida ou venlafaxina como citam os autores Carrato, Gallego e Diaz-rubio (2002), Gamelin et al. (2002), Ling et al. (2007a) e Screnci et al. (2000) e o uso de

cálcio ou magnésio citados por Cersosimo (2005), Durand et al. (2005) e Ling et al. (2007a).

Em nosso estudo a resposta comportamental ao estímulo de frio, os animais responderam no teste antinociceptivo ao efeito de drogas comumente utilizadas na clínica de dor para o tratamento de neuropatias sensitivas. Assim foram testados os seguintes fármacos: CBZ, OXZ e GABAP e também foi utilizada a INDO como um controle negativo, pois sendo um anti-inflamatório não esteroidal não apresenta efeito analgésico comprovado em neuropatias sensitivas.

Os nossos dados mostram que tanto a CBZ, GABAP como a OXZ foram eficazes em inibir os sintomas de alodínia ao frio, entretanto a INDO, como esperado, não exerceu efeito inibitório nem mesmo na maior dose utilizada. Ling e colaboradores (2007a) obtiveram os mesmos resultados para a GABAP, mas curiosamente a CBZ não demonstrou atividade analgésica significativa, apenas uma tendência a inibir. Os mesmos autores não chegaram a testar a OXZ e nem a INDO. Esses mesmos autores obtiveram resultados analgésicos com a morfina, apesar de não ser a droga de escolha pra tratar neuropatias e também com o antidepressivo venlafaxina e com  $Mg^{2+}$ . Porém, não testaram se as doses utilizadas produziram algum tipo de alteração motora. Adelsberger et al. (2000) sugerem que a OXL pode bloquear canais de  $Na^+$  voltagem-dependente, assim como a CBZ que por sua vez deu melhor resultado nos testes.

Grothey (2003) e Argyriou et al. (2008) esclarecem que a OXL age em canais de  $Na^+$  fazendo uma rápida quelação do  $Ca^{+2}$  porque é capaz de alterar os canais de  $Na^+$  voltagem-dependentes através da via que envolve o  $Ca^{+2}$ . Conforme sugerem Macdonald e Kelly (1995), Saif e Reardon (2005), Gamelin et al. (2002) e Eckel et al. (2002), a OXL afeta canais de  $Na^+$  voltagem-dependente levando ao uso de CBZ para prevenir a neuropatia induzida por OXL. A CBZ diminui as frequências de repetições dos potenciais de ação por aumentar canais de  $Na^+$  inativos. Grothey (2003) e Argyriou et al. (2008) propuseram efeito profilático da CBZ em neuropatia induzida por OXL.

Diferentemente no estudo de Ling et al.(2007a) com uma única administração IP de CBZ não houve produção de efeito significativo nas três doses administradas.

Já ao administrar OZP, outro anticonvulsivante, foi observado que com o tratamento nos camundongos aumentou-se o limiar nociceptivo na melhor dose de 100mg/kg comparado com o grupo controle conforme Argyriou et al. (2008) no seu

estudo piloto com 32 pacientes que após o uso da OZP o tratamento foi eficaz da neuropatia induzida por OXL.

Grothey (2003) e Wong et al. (2005) definem a GABAP como um anticonvulsivante mais bem tolerado que a CBZ e que melhor resolve os sintomas da dor neuropática. Na pesquisa de Grothey (2003) pacientes foram tratados com GABAP assim que os sintomas neuropáticos iniciaram e continuaram fazendo o uso de GABAP até o final do tratamento não interrompendo o esquema de OXL por causa da neurotoxicidade.

Como aponta Argyriou et al. (2008) a GABAP é um anticonvulsivante promissor por sua eficácia em síndromes dolorosas neuropáticas contrariamente o que Wong et al. (2005) encontrou em seu estudo com 115 pacientes na qual a GABAP não reverteu a dor e os sintomas agudos da neuropatia por OXL. Porém, Mariani, Garonne e Granetto (2000) em seu estudo piloto com 15 pacientes tiveram resultado positivo e em uma abordagem diferente Mitchell et al. (2006) que cita que a GABAP foi ineficaz. O que pode ter diferenciado seria a dose administrada de  $85\text{mg}/\text{m}^2$  e  $100\text{mg}/\text{m}^2$  respectivamente.

Para Ling et al. (2007a) a administração oral única de GABAP aumentou o período de latência nas doses de 100 e 300mg/kg depois de 150min induzindo efeito anti-alodínico nos ratos.

Nas obras de Chapman et al. (1998) e Fox et al. (2003) descrevem efeitos de GABAP (30-100mg/kg, IP) como atenuante da alodínia ao frio em outros modelos de injúria nervosa e em diferentes estímulos térmicos por elucidar diferentes respostas. Mariani, Garonne e Granetto (2000) ressaltam a eficiência de GABAP em prevenção e tratamento da neurotoxicidade de OXL. No nosso estudo, em animais, foi observado que o tratamento com GABAP (VO) aumentou o limiar nociceptivo, indicando efeito analgésico, sendo a dose de maior efeito a de 54mg/kg a partir de 75min comparado ao grupo controle.

Foi observado que o tratamento com INDO não demonstrou atividade analgésica nesse modelo comparado ao grupo controle, visto que INDO não é capaz de tratar dor neuropática devido sua ação ser de anti-inflamatório não-esteroidal cuja ação consiste em inibir a atividade da enzima cicloxigenase para diminuir a formação de precursores de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico.

No presente trabalho foi feita a avaliação do impedimento motor e/ou sedação promovida pelas maiores doses das drogas testadas. Foi visto que existe uma diferença significativa no grupo que recebeu CBZ no teste de Rota Rod realizado em animais neuropáticos tratados com esse fármaco. Isso sugere que talvez na dose máxima (30 mg/kg) o aumento exagerado do limiar nociceptivo com reversão total do quadro de alodínia pode ter sido devido à sedação e indução de ataxia, comumente observado em pacientes que utilizam essa droga principalmente nas suas primeiras administrações.

Seaf e Reardon (2005) citam que há evidências de acúmulo de OXL no DRG com administração IP. Em sua obra Ta et al. (2006) trataram de mostrar que os mecanismos dos quimioterápicos de compostos Pt ainda não são completamente conhecidos, assim como as reações de neurotoxicidade seletiva e a sensibilidade ao frio induzida por OXL. Neurônios sensoriais periféricos podem ser mais vulneráveis aos compostos Pt porque eles não são protegidos pela barreira sanguínea cerebral. Tem se mostrado que o acúmulo de neurônios no DRG tem níveis de compostos Pt em DNA

Grolleau et al. (2001) citam que a neurotoxicidade da OXL ainda não tem mecanismo seguramente esclarecido, entretanto, tem sido reportada como uma consequência da diminuição do metabolismo celular e transporte axonal, resultado do acúmulo de compostos de Pt sobre as células da raiz dorsal da medula espinhal. O dano mitocondrial induzido por OXL também foi sugerido ser o causador da neuropatia como mostrou Argyriou et al. (2008). O dano do consumo celular de oxigênio mitocondrial é uma medida de citotoxicidade da droga. Em estudo *in vitro*, o consumo celular de oxigênio mitocondrial foi comparado entre a cisplatina, OXL e carboplatina e apesar de uma diferença de acúmulo de Pt no DNA entre cisplatina e OXL, essa exibiu citotoxicidade semelhante ou maior, indicando que essas lesões de OXL são mais potentes que lesões de cisplatina.

Recentemente Jamieson et al. (2005) sugeriram uma nova hipótese para o dano neuronal causado pela OXL. Parece que ela afeta uma subpopulação de neurônios do DRG causando atrofia, mas não morte celular.

Em 2008 surgiu um estudo de Joseph et al. demonstrando que a OXL seletivamente danifica **nociceptores** do tipo IB4 positivos, onde é sugerido que o mecanismo inicial de dano neural seria diretamente por estresse oxidativo. Contudo, os estudos realizados pelo referido autor são com doses únicas de OXL e não

mimetizam o dano cumulativo crônico, mas servem de pista e pode ser um promissor caminho no sentido de buscarmos novas e eficazes terapias para o problema.

Em resposta a estímulo mecânico, nos estudos de Marinković et al. (2009), neuropeptídeos foram liberados de terminais periféricos de neurônios sensoriais aferentes primários, alterando na pele as funções imunes de célula e a permeabilidade vascular crescente, causando inflamação neurogênica. Os autores sugerem que ao distender a pele há alteração da fisiologia da célula estimulando a expressão de neuropeptídeos e que a força mecânica repetitiva eficaz pode estar estimulando nociceptores mecanosensitivos ou mecanorreceptores celulares, havendo uma grande expressão de SP e CGRP na epiderme e derme papilar.

Baseando-se nessas novas evidências que apontam para o problema como um fenômeno **que inicialmente acomete fibras aferentes primárias na periferia** e não a nível medular, procuramos investigar de forma piloto a existência de alterações a nível tecidual nas patas dos animais tratados com OXL.

Para isso, inicialmente tentamos analisar se existia alguma alteração morfológica a nível macroscópico e a nível microscópico, esse através de análise histopatológica. Nesse sentido nenhuma diferença foi constatada. Não foram observados sinais inflamatórios, nem áreas de necrose. Nenhuma alteração do conjuntivo, epitélio ou alterações de receptores sensoriais, visíveis ao microscópio óptico, como corpúsculo de Meissner ou de Paccini foram observados. Então procuramos investigar a possível participação de neuropeptídeos, receptores e mediadores inflamatórios que poderiam estar presentes e atuando a nível periférico. Foi investigada a participação de neuropeptídeos como SP e CGRP, receptores periféricos do tipo NMDA e VR1 (TRPV1) além do principal mediador inflamatório, a citocina TNF, que vem sendo apontada como mediador químico em alguns tipos de neuropatias periféricas.

Pons (2007) explica que a SP foi o primeiro neuropeptídeo identificado, pertencente à família das taquicininas, é pequeno com uma sequência de 11 aminoácidos. Apesar disso se localiza em todas as terminações nervosas do corpo humano e sua presença é mais significativa nas zonas imunológicas, complementa Katzung (2005) que é um undecapeptídeo que tem na estrutura Arg-Pro-Lys-Pro-Gin-Phe-Gly-Leu-Met. Gênese (2009) cita que é sintetizada nos ribossomos como

uma grande proteína sendo convertida enzimaticamente em um peptídeo ativo, esse peptídeo é distribuído no SNC e SNP onde atua como neurotransmissor.

Na definição de Katzung (2005) a SP está presente no SNC, onde é um neurotransmissor e no trato gastrointestinal (TGI) onde pode agir como transmissor no sistema nervoso entérico (SNE) e como hormônio local. É um potente vasodilatador devido ao seu efeito inibitório direto do peptídeo sobre o músculo liso arteriolar, esta ação é mediada por receptores específicos que diferem daqueles que medeiam às ações de outros vasodilatadores. E, também, produz uma ação hipotensiva acentuada em seres humanos e em várias espécies de animais. A SP estimula a contração do músculo liso venoso, intestinal e brônquico, causa secreção nas glândulas salivares, diurese e natriurese nos rins e vários efeitos no SNC e SNP.

Para Gusman et al. (1997) a SP contribui para sensibilizar os receptores nociceptivos diretamente na periferia ou na membrana pós-sináptica ou através da interação com outros elementos algogênicos. Por exemplo, a SP promove vasodilatação e liberação de histamina do interior dos mastócitos, que é liberada num ambiente tecidual e resulta em permeação dos vasos sanguíneos.

Jamieson et al. (2005) argumentam que mudança na expressão do neuropeptídeo SP tem sido mostrada em modelos animais. Foi demonstrado que a SP e o CGRP tem estado presentes em fibras tratadas com cisplatina e OXL.

Mantyh et al. (1997) citam que a transmissão de sinais nociceptivos está associada com a liberação de SP e CGRP das terminações centrais de nociceptores peptidérgicos que terminam na lamina I e II do CDME. McMahon, Bennett e Bevan (2006) relatam que esses neurônios também liberam os mesmos peptídeos na periferia pra induzir inflamação neurogênica em vários tecidos-alvo.

Chin et al. (2009) explicam que a liberação de SP e CGRP também vêm sendo demonstrada não só por estímulos que causam inflamação neurogênica, mas também em locais de injúria tecidual, como é o caso da injúria por estiramento na pele demonstrado em camundongos através de imunohistoquímica. Nesse estudo as fotomicrografias revelam a imunomarcagem para SP aumentada em pele de camundongos submetidos à distensão mecânica, entretanto não são demonstrados sinais histopatológicos de inflamação neurogênica. Em outro estudo, Marinković et al. (2009) demonstram que pacientes com neuralgia do trigêmeo expressam SP em axônios periféricos do ramo sensitivo do nervo trigêmeo, avaliado em cortes

histológicos por imunohistoquímica também sem evidência de inflamação neurogênica.

Em outro estudo, Trevisani et al. (2007), demonstraram que a SP é liberada na periferia por estimulação de receptores TRPV1 (VR1) através de estresse oxidativo. Quando espécies reativas de oxigênio peroxidam os fosfolípidios da membrana em resposta a injúria tecidual, inflamação ou estresse oxidativo, o 4-Hidroxinonenal, um aldeído endógeno é produzido. O estudo mostra que quando essa substância é injetada em patas de camundongos, provoca nocicepção e liberação de SP e CGRP por ativação dos receptores TRPV1.

Corroborando com os achados da literatura, quando realizamos o ensaio de imunohistoquímica na pele das patas retiradas dos animais em quimioterapia com OXL, encontramos um aumento expressivo da imunomarcagem para SP a partir de 24 horas com pico no 7º e 14º dias. A marcação foi observada principalmente na derme papilar, região logo abaixo da epiderme, coincidindo com a área ricamente innervada por mecanorreceptores de fino calibre. Esse mesmo perfil imunohistoquímico da expressão de SP em pele de rato já foi demonstrado em outros modelos de Axelsson et al. (2009) e Chin et al. (2009) e também a demonstração por imunofluorescência, essa inclusive mostra a co-localização com CGRP e receptores TRPV1.

Brain et al. (1985) e McCulloch et al. (1986) citam que o CGRP é um hormônio com 32 aminoácidos, sendo um membro da família dos peptídeos, que no homem existem em duas formas, CGRP- $\alpha$  e CGRP- $\beta$ . Para Rosenfeld et al. (1983) é um dos mais abundantes peptídeos produzidos em ambos os neurônios periféricos e centrais. É o mais potente peptídeo vasodilatador e pode funcionar na transmissão da dor, desempenhar um papel na homeostase cardiovascular e nocicepção.

No estudo de Ling et al. (2007b) a imunomarcagem para CGRP na medula espinhal lombar 24h depois da administração IP de OXL (6mg/kg) foi semelhante do grupo de ratos tratados OXL e grupo controle mostrando que há expressão desse marcador com ou sem a administração de OXL.

Entretanto evidências crescentes, principalmente de Carlton, Zhou e Coggeshall (1996), vêm mostrando que há um envolvimento da SP e CGRP na periferia na gênese e manutenção da dor neuropática. Ou seja, há uma liberação antidrômica periférica de SP e CGRP pelas fibras nociceptivas aferentes durante o desenvolvimento de quadros de dor neuropática. Esses peptídeos são encontrados



normalmente em fibras C e A delta ( $\delta$ ) e podem ser liberados de modo antidrômico quando essas fibras são estimuladas.

Já estão bem documentados na literatura por Christensen e Hulsebosch (1997) e Malmberg e Basbaum (1998) que a SP e o CGRP estão envolvidos na mediação da dor crônica neuropática e que há um aumento tanto do receptor NK1, SP e CGRP no CDME em estados neuropáticos. Cahill e Coderre (2002) e Bennett, Chastain e Hulsebosch (2000) citam que o tratamento com antagonistas NK1 e CGRP1 a nível medular diminui a hiperalgesia em modelos de dor neuropática em roedores.

Também, Carlton, Zhou e Coggeshall (1996) e Nakamura-craig e Gill (1991) mostram que a ativação de receptores NK1 e CGRP1 periféricos pelos agonistas correspondentes resulta em resposta nociceptiva, o que é bloqueado pelo uso de antagonistas apropriados. Dessa forma é sugerido que SP e CGRP são liberadas na periferia por impulsos causados pela injúria neural e devem contribuir para a dor neuropática. Isso foi bem demonstrado por Jang et al. (2004) em modelo neuropático de ligadura de nervo espinhal, onde a administração prévia de antagonistas dos receptores NK1 e CGRP1 na pata ipsilateral à lesão diminuiu a hiperalgesia induzida pela lesão neural.

Já quando os mesmos antagonistas eram administrados após a instalação da lesão o antagonista CGPR1, mas não o NK1, como no estudo de Jang et al. (2004) havia diminuição da intensidade de hiperalgesia induzida. Dessa forma, os autores concluíram que para a instalação do quadro neuropático a liberação periférica de ambos os peptídeos é importante, entretanto para a manutenção da hiperalgesia no estado neuropático o CGRP é mais importante do que SP.

Nossos achados condizem com a literatura no sentido que foi observado um aumento da imunomarcagem para CGRP na pele das patas dos animais que receberam OXL quando comparado ao controle, principalmente no 7º dia.

Outro aspecto investigado, por Tominaga et al. (1998), foi à presença de TRPV1, conhecido como receptor de capsaicina, que está presente tanto a nível central no CDME como a nível periférico, nos terminais dos neurônios sensoriais aferentes exercendo funções integrativas de estímulos físicos e químicos relacionados à dor.

Para Liddle e Nathan (2004) o TRPV1 foi caracterizado como canal iônico não seletivo, estando localizados em fibras de pequeno e médio diâmetros, que

correspondem as fibras C e A $\delta$  tipo II. Esses neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina estão envolvidos não somente com a percepção da dor de origem somática e visceral, mas também possuem funções efetoras sensoriais, onde promovem a liberação dos estoques neuronais de neuropeptídios, SP e CGRP através de um mecanismo dependente de Ca<sup>2+</sup>.

Com relação ao receptor TRPV1 ou VR1 que está bastante relacionado com a liberação de SP e CGRP nós não observamos diferenças na imunomarcação no mesmo tipo de tecido em nenhum dos dias em que as peles foram coletadas. Isso sugere que OXL provavelmente não deve estar aumentando a expressão desses receptores. Contudo esse achado não descarta a participação desses receptores no processo de liberação de SP e CGRP pelas fibras periféricas.

Apesar de SP causar degranulação mastocitária causando vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, do CGRP ser um potente vasodilatador e ambas estarem relacionadas à inflamação neurogênica, não foi constatado sinais inflamatórios no tecido coletado avaliado através da análise histopatológica. Corroborando com esses dados o fato da pesquisa por imunohistoquímica da produção de TNF, citocina pivô do cenário inflamatório, não ter demonstrado aumento da marcação para essa citocina. Talvez a ausência de TNF e de evidências histopatológicas seja devido ao protocolo de injeção e coleta. As peças histológicas sempre eram coletadas de 24 a 30h depois da injeção de OXL, período onde provavelmente o cenário inflamatório já teria sido desfeito.

Katzung (2005) cita que o receptor NMDA é um receptor inotrópico ativado pelo ácido glutâmico glutamato/aspartato e seu agonista exógeno NMDA. A ativação dos receptores de glutamato resulta na abertura de um canal iônico não-seletivo para os cátions. Isso permite o fluxo de Na<sup>+</sup> e de pequenas quantidades de Ca<sup>2+</sup> para dentro da célula e de K<sup>+</sup> para fora da célula. Julga-se que o fluxo de Ca<sup>2+</sup> através desses receptores desempenhe um papel importante na plasticidade sináptica.

Carlton e Hargett (1995), Coggeshall e Carlton (1998) relatam que além de ser expresso a nível central o receptor NMDA é encontrado também na periferia e evidencia um papel modulador para o glutamato na nocicepção periférica. Bhave et al. (2001), Zhou, Bonasera e Carlton (1996) e Walker et al., (2001) citam que a ativação dos receptores periféricos pela injeção de glutamato ou de agonistas do receptor produz nocicepção que é bloqueada por antagonistas apropriados. Assim é

possível que o efeito analgésico produzido pela administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA pode ser resultado tanto da ação central como periférica dessas drogas.

Com esse propósito Jang et al. em 2004 demonstraram em um modelo de dor neuropática que tanto os receptores centrais como periféricos estavam envolvidos na gênese de hiperalgisia e alodínia associadas ao dano neural. Utilizando o modelo de ligadura de nervo espinhal, foi demonstrado que o receptor NMDA periférico é importante não somente para iniciar o processo como também para manter o estado de hiperalgisia após a lesão.

No presente estudo, não investigamos a participação dos receptores NMDA periféricos de uma forma direta, entretanto a marcação por imunohistoquímica realizada nas patas dos animais mostra que possivelmente há um aumento da população desses receptores, principalmente no 21º dia, visto que a imunomarcação foi mais intensa nesse dia. Contudo, somente com um estudo mais aprofundado, talvez utilizando técnicas de biologia molecular como PCR e Western blot poderíamos confirmar essa suspeita.

Joseph et al. (2008) sugerem que o mecanismo inicial de dano neural da OXL seria diretamente por estresse oxidativo, sendo inibido por substâncias antioxidantes como vitamina C e L-carnitina. Nesse sentido procuramos também através de ensaio imunohistoquímico investigar a expressão de nitrotirosina no tecido retirado das patas dos camundongos tratados, visto que como citam Craig et al. (2003) e Roman, Wendland e Polanczyk (2008) a expressão aumentada de resíduos de nitrotirosina provavelmente reflete o estresse oxidativo aumentado devido à nitração de proteínas causada pela presença de peroxinitrito ou a outra espécie nitrada relacionada. O que encontramos foi um discreto aumento de nitrotirosina, principalmente na derme, no intervalo do 7º ao 21º dia. Sozinho esse dado não nos permite concluir que o estresse oxidativo seja um fator determinante da toxicidade periférica da OXL. Isso merece uma investigação futura associada a outros métodos.

Enfim, o propósito do presente estudo, na verdade, foi o de desenvolver um modelo experimental para estudar o efeito colateral mais importante da OXL em camundongos. Com esse passo dado temos um longo caminho pela frente na tentativa de explicar o fenômeno e desvendar o verdadeiro mecanismo dessa lesão. Não sabemos ao certo se o início da lesão é periférico ou central e nem se a liberação de substâncias na periferia seria uma das causas ou apenas consequência

da sensibilização central. Ainda é preciso investigar alterações a nível medular e traçar paralelas com os eventos periféricos para entendermos a sequência da lesão. A possibilidade de uso de animais nocautes nos anima a também testar esse modelo em outras espécies de camundongos como o BLC57. O modelo ainda oferece a possibilidade de testarmos novas opções terapêuticas e sugerir um protocolo de tratamento.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo caracterizamos a neurotoxicidade induzida por OXL em camundongos, especificamente com alodínia e hiperalgisia térmica e mecânica.

Ratificamos os achados da literatura, pois mostramos que a OXL foi capaz de induzir NSP na fase crônica. Assim, conclui-se que:

- No teste de hiperalgisia mecânica plantar (Von Frey) a dose de melhor resposta foi de 2mg/kg a partir do 14<sup>o</sup> dia de administração de OXL;
- O modelo permitiu estudar as respostas aos testes térmicos obtendo a melhor dose de 1mg/kg nas temperaturas de 4,10 e 42°C e de 4mg/kg na temperatura de 46° C;
- Ao utilizar fármacos para tratar a dor neuropática a CBZ (30mg/kg), a OZB (100mg/kg) e a GABAP (54mg/kg) obtiveram efeito analgésico em 105min.
- Ao teste mecânico do Rota Rod a CBZ (30mg/kg) produziu melhor resposta em 5,5RPM.
- Existe a participação provável de SP, CGRP, NMDA periféricos e nitrotirosina;

Portanto, a OXL induz neuropatia periférica em camundongos, essa neuropatia parece ser predominantemente sensitiva. Ao desenvolver esse modelo experimental de hiperalgisia e alodínia térmica e mecânica foram obtidos como resultados que a dose que produz melhor resposta à neuropatia periférica induzida pelo agente antitumoral OXL foi a dose de 1mg/kg comprovado pelos testes térmicos e o teste mecânico comprovou ausência de resposta mecânicas ratificando alteração neuropática e que os sintomas sensitivos são inibidos por fármacos que normalmente são usados na clínica de dor neuropática.

O uso de agentes neuromoduladores e neuroprotetores deve ser mais bem explicado para prevenção da neurotoxicidade crônica com o objetivo da não interrupção do tratamento com OXL. No curso temporal, foi observado em nosso modelo, a neurotoxicidade periférica lembrando a toxicidade dos pacientes tratados com OXL.

Os resultados obtidos depois dos diferentes experimentos realizados indicaram que a neurotoxicidade da OXL depende primariamente da dose acumulada e das administrações.

Esses resultados podem ser utilizados para estudos futuros com OXL e sugerem que em um longo período a NSP ao ser instalada poderá ser tratada. Finalmente, o uso de camundongos e do diferente método de administração da OXL (EV) pode ser utilizado em modelos futuros viabilizando o uso do fármaco para tratamento do câncer, principalmente o colorretal, com todo o esquema terapêutico sem que a NSP interfira nas atividades do paciente tratado.

## **REFERÊNCIAS**



## REFERÊNCIAS

ADELSBERG, H. et al. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na ( $\pm$ ) channel kinetics on rat sensory neurons. **Eur J Pharmacol**, 406:25-32, 2000.

AL-SARRAF, M.; FLETCHER, W.; OISHI, N.; PUGH, R.; WEWLETT, J. S.; BALDUCCI, L.; MCCRACKEN, J.; PADILLA, F.; **Cancer Treat. Rep.** 1982, 66, 31., 1997.

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

AMIR, R.; DEVOR, M. Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. **J. Neurosci.** v.16, n.15, p.4733-4741, 1996.

ANDRE et al. For the 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.** 350(23), 2343-2351, 2004.

ARGYRIOU et al. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. **Cancer Treatment Reviews.** 34, 368-377, 2008.

AUTHIER, et al. A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. **Neurotoxicology**, 24:797-805, 2003.

AXELSSON et al. Transient receptor potential vanilloid 1, vanilloid 2 and melastatin 8 immunoreactive nerve fibers in human skin from individuals with and without norrbottnian congenital insensitivity to pain. **Neuroscience.** 162. 1322–1332, 2009.

BAKER, M.; BOSTOCK, H. Ectopic activity in demyelinated spinal root axons of the rat. **J. Physiol.**, v.451, p. 539-552, 1992.

BANKONJA, M.M. Defining neuropathic pain. **Anesth. Analg.**, v.97, n.3, p.785-790, 2003.

BEHLING, E.B. **Efeito de doses múltiplas de quercetina na redução da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos.** Dissertação de mestrado,

2004. 115 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Centro de Saúde. UNESP. Araquara, 2004.

BENNETT, G.J. Neuropathic pain: new insights, new interventions. **Hosp. Pract.** v.33, n. 10, p.95-98, 1998.

BENNETT, M. I.; BOUHASSIRA, D. Epidemiology of neuropathic pain: can we the screening tools? **Pain.** v.132, n.1-2, p.12-13, 2007.

BENNETT, A.D.; CHASTAIN, K.M.; HULSEBOSCH, C.E. Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP 8-37 in a rodent model of chronic central pain. **Pain.** 86.163–175, 2000.

BHAVE, G. et al. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. **Nat Neurosci** 4:417–423, 2001.

BRAIN, S.D. et al. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. **Nature.** 313: 54-6, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5) Acesso em: 16/01/2010.

BREIVICK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence impact on daily life, and treatment. **Eur. J. Pain.** v.10, n.4, p.287-333, 2006.

CAHILL, C.M.; CODERRE, T.J. Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- and post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. **Pain.** 95. 277–285., 2002.

CAILLET, R. **Dor: mecanismo e tratamento.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.

CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L. Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. **Neurosci Lett.** 198:115–118, 1995.

\_\_\_\_\_; ZHOU, S.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin, **Brain Res.** 734 103–108, 1996.

CARRATO, A.; GALLEGRO, J.; DIAZ-RUBIO, E. Oxaliplatin: results in colorectal carcinoma. **Crit Rev Oncol Hematol**, 44:29-44, 2002.

CAVALETTI et al. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. **Eur J Cancer**. 37:2457-2463, 2001.

CARVALHO et al. Os genes ERCC1 e RRM1 no carcinoma broncopulmonar. **Rev Port Pneumol** v.15 n.4 Lisboa, 2009.

CESORSIMO, R.J. Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. **Ann Pharmacother**: 39, 128-135, 2005.

CHAPMAN et al. Effects of systemic carbamazepine and gabapentin on spinal neuronal responses in spinal nerve ligated rats. **Pain**: 75, 261-272, 1998.

CHIN, M.S.; LANCEROTTO, L.; HELM, D.L.; DASTOURI, P.; PRSA, M.J.; OTTENSMEYER, M.; AKAISHI, S.; ORGILL, D.P.; OGAWA, R. Analysis of Neuropeptides in Stretched Skin. v. 124, n. 1. **Neuropeptides in Stretched Skin**, 2009.

CHOLLET, P. et al. Single agent activity of oxaliplatin in heavily pretreated advanced epithelial ovarian cancer. **Ann Oncol** . 7, 1065–1070, 1996.

CHRISTENSEN, M.D.; HULSEBOSCH, C.E. Chronic central pain after spinal cord injury, **J. Neurotrauma**. 14. 517–537, 1997.

CHU, E. et al. Oxaliplatin: the new member of the class. In: MARSHALL, J. **The Clinical use of oxaliplatin**: case studies and roundtable discussion. New York: Oncology, 2004.

CHUN, R.; GARRET, L.; MACEWEN, E.G. Cancer Chemotherapy In: WITROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology** . Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. p.92-118, 2001.

COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. **J Comp Neurol** .391:78–86, 1998

COLLEONI, M.; SACERDOTE, P. Murine models of human neuropathic pain. p. 10. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2009.

COTRAN, S; KUMAR, V; COLLINS, T. Robbins. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2000.

CRAIG, B. et al. The nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine decreases defibrillation-induced free radical generation. **Resuscitation**. 57. 101/108, 2003.

CUNHA, T.M. et al. Dual Role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **European Journal of Pharmacology**. v.590, p.127-135, 2004.

CUTSEM, V.; VERSLYPE. *Asco*. **Educ Book**, 2002.

CVITKOVIC, E.; BEKRADDA, M. Oxaliplatin: a new therapeutic option in colorectal cancer. **Semin. Oncol**. 26:647-662, 1999.

DAOUSI, C. et al. Chronic painful peripheral neuropathy in an urban community: a controlled comparison of people with or without diabetes. **Diabet. Med.**, v.21, n.9, p.976-982, 2004.

De GRAMONT et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol**. 18;2938-2947, 2000.

DEVOR, M. Responses of nerves to injury in relation to neuropathic pain. In: MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. **Wall and Melzack's textbook of pain**. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

DELLEMIJIN, P.L.; VAN DUIJN, H; VANNESTE, J.A. Prolonged treatment with transdermal fentanyl in neuropathic pain. **J.Pain Symptom Manage**, v.16, n.4, p. 220-229, 1998.

DOUILLARD et al. **Lancet**. 355:1041, 2000.

DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurologic deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Sci. Ed.**, v.46, p. 208-209, 1957.

DURAND et al. Clinical activity of venlafaxine and topiramate against oxaliplatin-induced disabling permanent neuropathy. **Anticancer Drugs**: 16, 587-591, 2005.

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

ECKEL et al. Prevention of oxaliplatin-induced neuropathy by carbamazepine. A pilot study. **Dtsch Med Wochenschr.** 127:78-82, 2002.

FERREIRA, S.H. **Entre a compreensão e a confusão**: alodínia e hiperalgesia. Editorial 31(3), 2003. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br>>. Acesso em: 10/06/2007.

FOX et al. Comparative activity of the anti-convulsants oxcarbazepine, carbamazepine, lamotrigine and gabapentin in a model of neuropathic pain in the rat and guinea-pig. **Pain**: 105, 355-362, 2003

FREUDENRICH, C. **Como funciona a dor**, 2007. Disponível em: <<http://saude.hsw.uol.com.br/dor6.htm>>. Acesso em: 21/03/2009.

GAMELIN et al. Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. **Semin Oncol.**, 29 (suppl 15), 21-33, 2002.

GENESE, 2009. Disponível em: <[http://www.gendiag.com.br/nossos\\_produtos/pesquisa/RB%20311](http://www.gendiag.com.br/nossos_produtos/pesquisa/RB%20311)> Acesso em: 30/05/2009.

GOLDBERG et al. **Proc Am Soc Clin Oncol.** 22:252, 2003.

GROLLEAU, F. et al. A possible explanation for a neurotoxic effect of anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. **Journal Neurophysiology**; 85: 2293-2297, 2001

GROTHERY, A. Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. **Elsevier.** 2003.

GUIRRO, E; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional.** 4 ed. São Paulo: Manole, 2004.

GUSMAN, A.C. et al. A dor e o controle do sofrimento. **Revista de psicofisiologia**. v.1. n.1 e 2, 1997.

HANSSON, P. Neuropsthic pain: clinical characteristics and diagnostic workup. **Eur. J. Pain**. v.6 p.47-50, 2002

HARDEN, N.; COHEN, M. Unnet needs in the management of neuropathic pain. **J. Pain Symptom Manage**, v.25, n.5, p.512-17, 2003.

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

HÖKFELT, T. et al. Central consequences of pheripheral nerve damage. In: MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. **Wall and Melzack's textbook of pain**. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

HOLLIS, L.S.; AMURDSEN, A.R.; STERM, E.W. **J Med Chem**. 32:128-136, 1989.

HURWITZ et al. **Asco**. Abstract 3646, 2003.

HWANG, J. Managing the toxicity of oxaliplatina. In: MARSHALL, J. **The Clinical use of oxaliplatina**: case studies and roundtable discussion. New York: Oncology, 2004.

INC. Instituto Nacional do Câncer, 2009. **Tratamento do câncer**. Disponível em: <[http://www.itcancer.com.br/index\\_arquivos/page0005.htm](http://www.itcancer.com.br/index_arquivos/page0005.htm)>. Acesso em: 05/06/2009.

INCA. **Controle do Câncer**: uma proposta de integração ensino-serviço. 2 ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Pro-Onco, 1993. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=100](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=100)> Acesso em: 30/05/2009.

INSIGHT. **Manual de Instruções de equipamentos científicos**: pesquisa e ensino, 2003.

JAMIESON et al. Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss. **Cancer Chemother Pharmacol**, 4:391-9, 2005.

JANG et al. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. **Neuroscience**. 360. 129–132, 2004.

JENSEN, T.S.; BARON, R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. **Pain**. v.102, n.1-2, p. 1-8, 2003.

JOSEPH et al. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. **Elsevier. The Journal of Pain**. v 9. 463-472, 2008.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2005.

KAWAMATA, M.; OMOTE, K. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. **Pain**. v.68, n.1,p. 85-96, 1996.

KEMINY, N. et al. Randomized multicenter phase II trial of bolus plus infusional fluorouracil/leucovorin compared with fluorouracil/leucovorin plus oxaliplatin as third-line treatment of patients with advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol**. 22: 4753-4761, 2004.

KIM, S.; CHUNG, J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**. 50: 355-363. 4., 1992.

LAIRD, J.M.; BENNETT, G.J. Dorsal root potentials and afferent input to the spinal cord in rats with an experimental peripheral neuropathy. **Brain Res**. v. 584, n.1-2, p.181-190, 1992.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Roca, cap. 4. p. 53-78, 2004.

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

LIDDLE, R.A.; NATHAN, J.D. Neurogenic inflammation and pancreatitis. **Pancreatology**. (6):551-9; nov 15, 2004.

LING et al. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. **Pain**, 128: 225-234, 2007a.

\_\_\_\_\_. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. **Toxicology**, 234: 176-184, 2007b.

LUO, F.R.; WYRICK, S.D.; CHANEY, S.G. Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root ganglia in vitro explant culture model. **Cancer Chemother Pharmacology**. 44: 29-38. 1999.

MACDONALD, R.L; KELLY, K.M. Antiepileptic drug mechanisms of action. **Epilepsia**. 36 (Suppl 2) 2-12, 1995.

MACHOVER et al. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. **Ann Oncol**, 7 (1), 95-98, 1996.

MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates, **Pain**. 76 215–222, 1998.

MANTYH, P.W.; ROGERS, S.D.; HONORE, P.; ALLEN, B.J.; GHILARDI, J.R.; LI, J.; DAUGHTERS, R.S.; LAPPI, D.A.; WILEY, R.G.; SIMONE, D.A. **Science**. 278:275–279, 1997.

MARCHIORI, P.E.; HIRATA, M.T.A. Neuropatias Periféricas. In: NITRINI, R.; BACHESCHI, L.A. **A neurologia que todo médico deve saber**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003

MARIANI, G.; GARONNE, O.; GRANETTO, C. Oxaliplatin induced neuropathy: could gabapentin be the answer? **Proc Am Soc Clin Oncol**. 19: 609a, 2000.

MARINKOVIĆ, S.; GIBO, H.; TODOROVI, V.; ANTIĆ, B.; KOVAČEVIĆ, D.; MILISAVLJEVIĆ, M.; ČETKOVI, M. Ultrastructure and immunohistochemistry of the trigeminal peripheral myelinated axons in patients with neuralgia. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. 111, 795–800, 2009.

MARSHALL, J. **The Clinical use of oxaliplatin**: case studies and roundtable discussion. New York: Oncology, 2004.



MCCULLOCH, J. et al. Calcitonin gene-related peptide: Functional role in cerebrovascular regulation. **Proc Natl Acad Sci.** 83: 5731-5735, 1986.

MCMAHON, S.B.; BENNETT, D.; BEVAN, S. In: Textbook of Pain. MCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. **Elsevier.** Philadelphia, p. 49–72, 2006.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms.** 2 ed. Seattle: IASP, 1994.

MILLAN, M. J. The induction of pain: na integrative review. **Prog Neurobiol.** Jan; 57(1): 1-164. 1999.

MITCHELL et al. Addition of gabapentin to a modified FOLFOX regimen does not reduce oxaliplatin-induced neurotoxicity. **Clin Colorectal Cancer.** 6:146-51, 2006.

MÖLLER, K.Ä.; JOHANSSON, B.; BERG, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods,** 84: 41-47. 9., 1998.

NAKAMURA-CRAIG, M. GILL, B.K. Effect of neurokinin A, substance P and calcitonin gene related peptide in peripheral hyperalgesia in the rat paw, **Neurosci. Lett.** 124. 49–51., 1991.

NECKER, R.; HELLON, R.F. Noxious thermal input from the rat tail: modulation by descending inhibitory influences. **Pain.** 4:231-242, 1978.

NUNN, J. et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol.** 39:115-29, 2003.

OMOTE, K. et al. The effects of peripheral administration of a novel selective antagonist for prostaglandin E receptor subtype EP (1), ONO-8711, in a rat model of postoperative pain. **Anesthesia and Analgesia,** 92: 233-238.5., 2001.

OMS. **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE.** 2009. Disponível em: <<http://www.hwo.int>.> Acesso em: 31/10/2008.

PARK, S.B. et al. Acute abnormalities of sensory nerve function associated with oxaliplatin-induced neurotoxicity. **Journal of Clinic Oncology**. v 27. n. 8. march, 2009.

PONS, L. Papel fisiológico de los neuropeptidos cutâneos: presencia y actividades de SP y CGRP. Actualidad científica. **Cosmética al día**. v 26, n 6, 2007.

PELTIER, A.C.; RUSSELL, J.W. Recent advances in drug-induced neuropathies. **Curr Opin Neurol**.15(5):633–8, 2002.

RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmac. Res**. 3: 263-269, 1996.

RAYMOND, E. et al. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. **Mol Cancer Ther**. 227-235, 2002.

ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Myeloperoxidase and Coronary Arterial Disease: From Research to Clinical Practice. **Arq Bras Cardiol**. Jul; 91(1):e11-9, 2008.

READY, L.B. **International association for the study of pain task force on chronic pain**. Seattle: IASP publication, 1992.

ROSENFELD, M., et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. **Nature**, 304 129-135, 1983.

ROWBOTHAM, M.C. Treatment of neuropathic pain: perspectives on current options. In: JUSTINS, D.M. **Pain: an update review**. Refresher Course Syllabus. Seattle: IASP, 2005.

SAIF, M.W.; REARDON, J. Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **Ther Clin Risk Manag**. v 1(4); dec, 2005.

SALTZ et al. **N Engl J Med**. 343:905, 2000.

SANTOS, M.O et al. Estimate Brazilian Cancer Incidence. **Instituto Nacional do Câncer**, 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 05/06/2009.

SCHMOLL, H.J. The role of oxaliplatin in the treatment of advanced metastatic colorectal cancer: prospects and future directions. **Semin Oncol.** 29(5 Suppl 15), 34-39, 2002.

SCRENCI et al. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. **Br J Cancer.** 82: 966-972, 2000.

SELTZER, Z.; DEVOR, M. Ephaptic transmission in chronic damage peripheral nerves. **Neurology.** v.29, n.7, p.1061-1064, 1979.

SPENCE, R, J; JOHNSTON P, G. **Oncologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

SOUSA, A.M. PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research,** 897: 9-19.6., 2001.

TA, L.E. et al. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion correlates with platinum-DNA binding. **Neurotoxicology.** 6:992-1002, 2006.

TA, L.E.; LOW, P.A.; WINDEBANK, A.J. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. **Molecular pain.** 5:9, feb, 2009.

TAYLOR, C.P. et al. A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. **Epilepsy Res.** v29, n.3, p.233-249, 1998.

TEIXEIRA, M.J.; FIGUEIRÓ, A.B. **Dor:** epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001.

TOMINAGA et al. **Neuron.** 21:531–543, 1998.

TREEDE, R.D.; JENSEN, T.S.; CAMPBELL, J.N.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY, J.O.; GRIFFIN, J.W.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J. Neuropathic pain, **Neurology.** 70, 1630–1635, 2008.

TREVISANI et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **PNAS.** August 14, v. 104, n. 33, p.13519–13524, 2007.

VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, 23: 175-266.2., 1896.

WALKER, K.; REEVE, A.; BOWES, M.; WINTER, J.; WOTHERSPOON, G.; DAVIS, A.; SCHMID, P.; GASPARINI, F.; KUHN, R.; URBAN, L. mGlu5 receptors and nociceptive function: II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurons mediate inflammatory hyperalgesia. **Neuropharmacology**. 40:10–19, 2001.

WILSON, R.H. et al. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. **Journal Clinical Oncology**. 20:1767-1774, 2002.

WONG, G.Y., et al... A phase III double-blinded, placebo controlled, randomized trial of gabapentin in patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a North Central Cancer Treatment Group Study, 23:8001. **J clin Oncol**, 2005.

WU, G. et al. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. **J. Neurosci**. v.21, n.21, p.RC140, 2001.

ZHOU, S. BONASERA, L. CARLTON, S.M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. **Neuroreport**. 7:895–900, 1996.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol**. 429, 23–37, 2001.